

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

**Auswirkungen der in der Geburtshilfe verwendeten Medikamente
Betamethason, Indometacin und Fenoterol auf den Aktivierungszustand
von neonatalen und maternalen Monozyten**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stefanie Hogger

2022

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

**Auswirkungen der in der Geburtshilfe verwendeten Medikamente
Betamethason, Indometacin und Fenoterol auf den Aktivierungszustand
von neonatalen und maternalen Monozyten**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stefanie Hogger

2022

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Birgit Seelbach-Göbel

2. Berichterstatter:

PD Dr. Ludwig Deml

Tag der mündlichen Prüfung:

08.08.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Neonatales Immunsystem.....	3
1.2	Die Rolle der Monozyten im Immunsystem	5
1.3	Problematik der Frühgeburten und neonatale Sepsis	6
1.4	Betamethason als RDS-Prophylaxe	7
1.5	Medikamente zur Tokolyse	8
1.6	Ziele der Dissertation	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Material	11
2.1.1	Untersuchungsmaterial	11
2.1.2	Reagenzien.....	13
2.1.3	Puffer und Medien.....	13
2.1.4	Medikamente	14
2.1.5	Antikörper.....	14
2.1.6	Reaktionskits.....	15
2.1.7	Geräte	15
2.1.8	Verbrauchsmaterial	16
2.1.9	Software.....	17
2.2	Methoden.....	18
2.2.1	Studiendesign.....	18
2.2.2	Isolation mononukleärer Zellen	19
2.2.3	Bestimmung der Zellzahl.....	20
2.2.4	Stimulationsversuch	21
2.2.5	Durchflusszytometrische Analyse.....	22
2.2.6	Durchführung der FACS-Analyse und statistische Auswertung	24
2.2.7	Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	24
3	Ergebnisse	27
3.1	Einfluss der Medikamente auf den Aktivierungszustand der Monozyten	27
3.1.1	Neonatale Monozyten.....	27
3.1.2	Maternale Monozyten.....	30
3.1.3	Adulte Monozyten.....	33

3.2	Zytokinfreisetzung	36
3.2.1	Interleukin-6.....	36
3.2.2	Interleukin-10.....	37
3.2.3	Tumornekrosefaktor- α	38
4	Diskussion.....	39
4.1	Einfluss von Betamethason auf Stoffwechsel und Immunsystem des Neonaten	39
4.2	Wirkung von Betamethason auf maternale Zellen.....	45
4.3	Effekt von Indometacin und Fenoterol.....	47
4.4	Vergleich der neonatalen und maternalen Zellen mit adulten Zellen	49
5	Zusammenfassung	51
6	Vorzüge und Limitationen	52
7	Anhang	53
7.1	Oberflächenmarker ohne signifikante Ergebnisse	53
7.1.1	Neonatale Monozyten.....	53
7.1.2	Maternale Monozyten.....	54
7.1.3	Adulte Monozyten.....	55
7.2	Tabellenverzeichnis	56
7.3	Abbildungsverzeichnis	56
8	Literaturverzeichnis	57

1 Einleitung

1.1 Neonatales Immunsystem

Das neonatale Immunsystem weist viele Unterschiede zu dem eines Erwachsenen auf. Wichtig für die zelluläre Immunantwort sind die Antigenpräsentierenden Zellen (APCs) zu denen dendritische Zellen und Monozyten gehören. Toll-Like-Rezeptoren sind notwendig für die Erkennung von Pathogenen (1). Diese sind auf neonatalen APCs in gleicher Menge vorhanden wie auf adulten APCs (2). Jedoch unterscheidet sich die Reaktion auf die Stimulation dieser Rezeptoren deutlich, was zur unreifen Reaktion des neonatalen Immunsystems beiträgt (3). Monozyten und dendritische Zellen sind im neonatalen Immunsystem weniger vorhanden als in dem eines Erwachsenen und exprimieren weniger der typischen Rezeptoren MHC-2, CD80, CD86 und des Zytokins IL-12p70, was zur ineffizienten Aktivierung von antigenspezifischen T- und B-Zell- Reaktionen führt (4,5). Einen weiteren essenziellen Teil des angeborenen Immunsystems stellen auch die neutrophilen Granulozyten dar. Im Vergleich zum Erwachsenen, der eine konstante Anzahl an Neutrophilen im Blut hat ($4,4 \times 10^9$), schwanken die Zellzahlen beim Neugeborenen zwischen $1,5$ und 28×10^9 (6). Auch die Speicherung von neutrophilen Granulozyten und die Entwicklung der Vorläuferzellen sind im Vergleich zum Erwachsenen verringert, dies führt zu einer dadurch verminderten Immunabwehr gegenüber Bakterien (7). Neonatale Granulozyten exprimieren weniger der Oberflächenproteine L-Selectin und Mac-1. Somit haften sie schlechter am Gefäßendothel und können keine feste Bindung mit diesem eingehen (8,9). Die Migration entlang des Endothels und das Eintreten zum Ort der Infektion in das subendotheliales Gewebe ist dadurch gestört (10). Neonatale neutrophile Granulozyten zeigen außerdem eine um 60% reduzierte Antwort gegenüber chemotaktischen Reizen und haben unter „Stress“ schlechtere Fähigkeiten zur Phagozytose als adulte Zellen (11,12). Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) werden von APCs und Zytokinen aktiviert (13). Sie sind Effektor-Lymphozyten, die der Kontrolle von verschiedenen Tumoren und mikrobiellen Infektionen dienen, indem sie ihre Ausbreitung und die nachfolgende Gewebeschädigung begrenzen (14). Im Blut von Neonaten sind mehr NK-Zellen vorhanden als beim Erwachsenen (15). Die Kapazität zur Lyse und die Eigenschaft zur Degranulation von Zielzellen sind bei neonatalen NK-Zellen herabgesetzt (16). CD-4 positive T-Zellen differenzieren zu TH1, TH2, TH17,

regulatorischen- oder folliculären T-Zellen (17,18). Das Verhältnis zwischen TH1 und TH2-Zellen ist bei Neonaten, anders als beim Erwachsenen, deutlich auf die Seite der TH2-Zellen verschoben. Prostaglandin E₂, Progesteron und IL-10 führen während der Schwangerschaft zur vermehrten Produktion von TH2-Zytokinen, was wiederum zur vermehrten TH2-Differenzierung führt (19–21). Außerdem ist der Locus für die Transkription von TH2-Zytokinen hypomethyliert und wird dadurch bevorzugt (22). Interferon-gamma (IFN- γ) wird hauptsächlich von TH1 Zellen produziert. Auch die IFN- γ -Produktion durch stimulierte Nabelschnur-TH1-Zellen ist um das 5- bis 10-fache reduziert im Vergleich zu adulten Zellen (23). TH17-Zellen sind wichtig für die Abwehr von extrazellulären Bakterien und Pilzen (24). Neonaten besitzen wenige bis keine TH17-Zellen (25). Das jeweilige Zytokinmilieu beeinflusst die Entstehung von TH17- Zellen oder von regulatorischen T-Zellen (Treg-Zellen). Es werden mehr TH17-Zellen produziert, wenn diese durch proinflammatorische Zytokine (IL-23, IL-6, IL-1 β) stimuliert werden (25). Treg-Zellen steuern die Immunantwort. Sie gewährleisten die Selbsttoleranz des Immunsystems, indem sie in bestimmten Situationen die Immunantwort unterdrücken (26). Im fetalen lymphoiden Gewebe ist die Zahl der Treg-Zellen im Vergleich zu der bei adultem Gewebe erhöht (27). Maternale Zellen, welche die Plazenta durchqueren, induzieren die Entstehung von Treg-Zellen. Diese sind während der Schwangerschaft wesentlich dafür verantwortlich, dass maternale Zellen nicht abgestoßen werden (28). Folliculäre T-Zellen (FTZ) spielen eine große Rolle in der Proliferation von B-Zellen, indem sie die Reifung im Keimzentrum, die Differenzierung zu Plasmazellen und den Antikörperklassenwechsel fördern (29). Im Neonaten sind weniger FTZ vorhanden als beim Erwachsenen (30).

Neonaten weisen auch Defizite bei der neonatalen Antikörperproduktion auf. Diese hängen von der B-Zell-Unreife, dem geringeren B-Zell-Repertoire und der reduzierten Signalstärke der B-Zell-Rezeptoren ab (31).

1.2 Die Rolle der Monozyten im Immunsystem

Monozyten gehören zur Gruppe der Leukozyten und sind Teil des unspezifischen und spezifischen Immunsystems (32). Sie machen ca. 2 - 8% der peripheren Leukozyten im Blut aus (33). Die Bildung erfolgt im Knochenmark aus der myeloischen Progenitorzelle (CMP), die neben Monozyten auch für die Entwicklung von Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten zuständig ist (34). Monozyten können ins Gewebe wandern und sich dort in Makrophagen und dendritische Zellen differenzieren. Jedoch wurde die langjährige Annahme, dass Gewebemakrophagen durchgehend von den Monozyten aus dem Knochenmark gespeist werden, widerlegt. Während der embryonalen Hämatopoese werden mehrere gewebsresidente Makrophagenpopulationen ausgesät, die sich unabhängig vom Knochenmark (KM) im Erwachsenenalter selbst erhalten (35). Auch dendritische Zellen stammen von verschiedenen KM-Vorläuferzellen ab (36). Die Funktion der Monozyten besteht also nicht nur in der einer Vorläuferzelle. Monozyten gehören zu den Hauptproduzenten von Entzündungsmediatoren und sind an der Regulation der angeborenen und adaptiven Immunantwort beteiligt. Zudem tragen sie zur Auflösung der Entzündung bei, indem sie einerseits entzündungshemmende Zytokine produzieren und andererseits proinflammatorische Pathogene, Zelltrümmer und apoptotische Zellen phagozytieren (37,38).

Monozyten können in drei Hauptgruppen unterteilt werden. „Klassische“ Monozyten sind CD14 positiv und CD16 negativ ($CD14^{++}CD16^{-}$) und machen 80 - 90% aller Monozyten aus. Die restlichen 10 - 20% bestehen einerseits aus den „intermediären“ CD14 stark positiv und CD16 positiven Zellen ($CD14^{++}CD16^{+}$) und andererseits aus „nicht klassischen“ Monozyten, welche CD14 schwach positiv und CD16 stark positiv sind ($CD14^{+}CD16^{++}$) (39). Die drei Untergruppen unterscheiden sich im Phänotyp und in ihrer Funktion. „Klassische“ Monozyten haben eine gute Phagozytosefähigkeit und sind als Fresszellen bekannt (40). „Intermediäre“ Monozyten produzieren reaktive Sauerstoffspezies, sind an der Antigenpräsentation, Stimulation und Proliferation von T-Zellen, an Entzündungsreaktionen und der Angiogenese beteiligt (40,41). „Nicht klassische“ Monozyten sind mobil, patrouillieren im Endothel auf der Suche nach Verletzungen und sind ebenfalls an der Antigenpräsentation sowie T-Zell-Stimulation beteiligt (42).

1.3 Problematik der Frühgeburten und neonatale Sepsis

Jedes Jahr gibt es weltweit etwa 15 Millionen Kinder, die zu früh geboren werden, also vor der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche. Das entspricht einem Prozentsatz von ca. 10,6% aller Geburten und diese Zahl steigt weiter an (43–45).

Die Mechanismen und Pathogenese einer Frühgeburt sind vielfältig und nicht endgültig verstanden. Unter anderem zählen dazu genetische Faktoren, Stress, präpartale Infektionen, mechanische Faktoren und Blutungen (46). Zu den Komplikationen einer Frühgeburt gehören das Atemnotsyndrom einhergehend mit einer möglichen bronchopulmonalen Dysplasie, die Sepsis, intraventrikuläre Blutungen, Zerebralparenzen und andere Formen von neurologischen Beeinträchtigungen (47).

Die Frühgeburt ist in fast allen Ländern mit mittlerem und hohem Einkommen die häufigste Todesursache bei Kindern. Neben den Komplikationen einer Frühgeburt gehören intrapartale Komplikationen, Meningitis und Sepsis zu den Haupttodesursachen von Neugeborenen (48). In einer Langzeitstudie von 2000 bis 2013 wurden die Todesfälle in der Neonatalperiode untersucht. 2013 verstarben immer noch 15% aller Neugeborenen an einer Sepsis (49). Zu den größten Risikofaktoren bei der Entwicklung einer Sepsis gehören wiederum die Frühgeburt und das niedrige Geburtsgewicht (50). Frühgeborene können ihrem Gewicht nach unterteilt werden in low birth weight (LBW) infants bei einem Geburtsgewicht von unter 2500 g, in very low birth weight (VLBW) infants bei unter 1500 g und in extremely low birth weight (ELBW) infants bei unter 1000 g (51). Die VLBW infants sind dabei besonders gefährdet an einer neonatalen Sepsis zu erkranken (52).

Neben der Frühgeburt sind andere Risikofaktoren für das Auftreten einer Sepsis präpartal bestehende Infektionen wie eine Chorioamnionitis, ein vorzeitiger Blasensprung, Fieber während der Geburt oder eine präpartale Kolonisation mit Gruppe-B-Streptokokken (GBS) (53). Durch die heutzutage durchgeführte Früherkennungsmaßnahme einer GBS-Besiedelung und der damit verbundenen prä- oder intrapartalen Antibiotikagabe kann das Risiko einer Early-Onset-Sepsis (EOS) durch GBS inzwischen reduziert werden (53). Dennoch gehört GBS zu den häufigsten Erregern, die zu einer EOS führen. Es gibt verschiedene Einteilungen der neonatalen Sepsis. Eine EOS kann definiert werden als eine innerhalb der ersten 72 Stunden nach Geburt auftretende Sepsis. Die Late-Onset Sepsis (LOS) tritt demnach frühestens nach 72 Stunden, aber innerhalb der ersten 28 Tage nach Geburt auf. (54,55). Eine andere Einteilung definiert das gesamte Auftreten innerhalb der ersten Woche nach der

Geburt noch als EOS (56). Neben GBS spielt *Escherichia coli* (*E.coli*) noch eine Rolle bei der Entstehung. Zusammen verursachen *E.coli* und GBS zwei Drittel aller EOS (57). Dabei sind die meisten Säuglinge mit einer GBS-Sepsis Reifgeborene und die, die eine *E.coli*-Sepsis entwickeln, Frühgeborene. *E.coli* hat also die größte Bedeutung bei Frühgeborenen und verursacht bei der EOS auch die meisten Todesfälle (58,59).

1.4 Betamethason als RDS-Prophylaxe

Das Respiratory Distress Syndrom (RDS), auch Atemnotsyndrom genannt, führt durch primären Surfactantmangel zu einer strukturell unreifen Lunge (60). Es gehört zu den schwerwiegenden Komplikationen nach einer Frühgeburt und war bis zur Einführung der Surfactant-Therapie und dem Einsatz von antenatalen Glukokortikoiden die Haupttodesursache bei Frühgeborenen (61).

Surfactant wird von den Alveolarepithelzellen Typ II gebildet und überzieht die gesamte Alveolaroberfläche. Es bewirkt damit eine Abnahme der Oberflächenspannung in den Alveolen und verhindert somit die Entstehung von Atelektasen (kollabierte Alveolenbereiche), die ansonsten nicht mehr am Gasaustausch teilnehmen könnten (62). Vor der 34. SSW kann Surfactant noch nicht ausreichend vom Fetus gebildet werden (63).

Deswegen wird der Schwangeren bei drohender Frühgeburt vor der abgeschlossenen 34. Schwangerschaftswoche (SSW) zwei Mal 12 mg Betamethason intramuskulär im Abstand von 24 Stunden verabreicht (64). Die pränatal verabreichten Kortikosteroide führen zu einer erhöhten Surfactant-Produktion in den Alveolen (65) und induzieren eine Ausdünnung der Alveolarwände, wodurch die Diffusionsbarriere für den Gasaustausch verringert wird (66).

Schon 1969 untersuchte Liggins erstmals die Anwendung von Kortikosteroiden bei Schafen. Er zeigte, dass frühgeburtliche Schafe, die in utero Kortikosteroide erhielten, ein längeres Überleben zeigten als diejenigen ohne Therapie (67). 1972 veröffentlichten Liggins und Howie dann die erste kontrolliert randomisierte Studie über Betamethason als Präventionsmedikament für die Entwicklung eines RDS bei Frühgeburten. Sie konnten zeigen, dass pränatale Kortikosteroide die Rate an RDS und neonataler Sterblichkeit senken (68). Seitdem gab es zahlreiche Studien, die diese Ergebnisse bestätigen. (69,70). Auch eine Metaanalyse von 2017 mit 30 eingeschlossenen Studien und fast 8000 Frauen zeigte, dass verabreichte Kortikosteroide das Risiko für perinatale und neonatale Mortalität und das

Auftreten eines RDS senken. Zusätzlich reduzieren Kortikosteroide das Risiko der Entstehung von intraventrikulären Blutungen, einer nekrotisierenden Enterokolitis, systemischen Infektionen in den ersten 48 Stunden und die Notwendigkeit einer mechanischen Beatmung nach der Geburt (71). Außerdem gibt es Hinweise dafür, dass pränatal verabreichte Kortikosteroide das Wachstum und die Reifung von kardiovaskulärem, endokrinen und renalem System fördern. (72)

Neben den positiven Aspekten der RDS-Prophylaxe mit Betamethason gibt es jedoch auch Nebenwirkungen auf Stoffwechsel, Geburtsgewicht und das Immunsystem (siehe **4.1**).

1.5 Medikamente zur Tokolyse

Vorzeitige Wehen sind in vielen Fällen das erste Anzeichen für eine drohende Frühgeburt.

Medikamente zur Wehenhemmung (Tokolytika) finden dann ihre Anwendung, um die Schwangerschaft zu verlängern. Sie werden mit dem Ziel eingesetzt, die Geburt um mindestens 48 Stunden zu verzögern (73). Dies soll einerseits Zeit geben, Kortikosteroide wie Betamethason zur Lungenreife zu verabreichen (siehe **1.4**), andererseits eine Verlegung der Patientin in ein Perinatalzentrum mit neonatologischer Intensivstation zu ermöglichen (64).

Ein Angriffspunkt für Tokolytika sind die β_2 -Rezeptoren. Die sogenannten Betasympathomimetika aktivieren die Adenylylcyclase und erhöhen so die Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Dadurch kommt es zu einer reduzierten Kinaseaktivität der regulatorischen leichten Ketten von Myosin. Das geschieht einerseits durch Phosphorylierung der Kinase selbst und andererseits durch Abnahme des intrazellulären Kalziums durch Erhöhung der Kalziumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum (74). Ein in der Geburtshilfe verwendetes Betasympathomimetikum ist Fenoterol. Es wird den Schwangeren entweder intravenös als Dauerinfusion oder als Bolus verabreicht (75). In Deutschland wird Fenoterol vorwiegend als Bolustokolytikum verwendet. International ist dieser Gebrauch jedoch weitgehend unbekannt (64). Oral verabreichte Betasympathomimetika werden nicht verwendet (76). Betasympathomimetika dürfen nur maximal 48 Stunden zur Tokolyse eingesetzt werden (77). Fenoterol erfordert unter den Tokolytika den größten Überwachungsaufwand und weist die meisten maternalen und fetalen Nebenwirkungen auf (73). Es kann bei der Schwangeren zu Tachykardie, Kopfschmerzen und Dyspnoe bis hin zum Lungenödem kommen (78). Diese Nebenwirkungen können dann auch

zu einem Therapieabbruch führen. Fenoterol kann außerdem die Plazenta passieren und dadurch zu fetaler Tachykardie, Hypoglykämien sowie zum Hyperinsulinismus nach der Geburt führen (79). Von der WHO werden Betasympathomimetika zur Tokolyse nicht mehr empfohlen (80).

In Deutschland wird zudem im Off-Label-Use Indometacin zur Wehenhemmung eingesetzt. Indometacin gehört zu den unselektiven Cyclooxygenase (COX) – Hemmern. Die Isoformen COX-1 und COX-2 sind wichtige Schlüsselenzyme zur Konvertierung von Arachidonsäure in Prostaglandine. Prostaglandine induzieren Uteruskontraktionen, indem sie die Bildung von Myometrium-Gap-Junctions verstärken und damit die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöhen sowie die Aktivität der Kinase der leichten Ketten von Myosin verstärken (81). Sie werden in der Geburtshilfe deswegen auch zur Geburtseinleitung verwendet. Eine Hemmung dieser Synthese hat also einen tokolytischen Effekt. Indometacin weist eine hohe Effizienz und dabei eine geringe Rate an Nebenwirkungen auf (73,82). Die Anwendung erfolgt entweder oral oder rektal (81). Es zeigt in zwei großen Metaanalysen eine bessere tokolytische Wirksamkeit verglichen mit den anderen Tokolytika (73,82). Allerdings zeigt sich in einer Metaanalyse von 2015 ein erhöhtes Risiko für intraventrikuläre Blutungen, nekrotisierende Enterokolitis und periventrikuläre Leukomalazie der Neugeborenen (83). Der COX-Hemmer wird aufgrund des Risikos eines vorzeitigen Verschlusses des Ductus arteriosus botalli nur bis zur 32. Schwangerschaftswoche verwendet (84).

Neben Fenoterol und Indometacin gibt es noch andere Tokolytika.

Ein weiteres Medikament, das im Off-Label-Use verwendet wird, ist der Kalziumantagonist Nifedipin (85). Es senkt den Blutdruck und wird in der Schwangerschaft auch zur Therapie einer Hypertonie verwendet (86,87). Nifedipin gehört zu den Dihydropyridinen und blockiert vorwiegend an der glatten Muskulatur des Gefäßsystems Kalziumkanäle vom L-Typ, verhindert somit einen Kalziumeinstrom und führt dadurch zu einer Vasodilatation (88). Hauptnebenwirkungen sind Hypotension, Kopfschmerzen, Synkopen, Schwäche, Schwindel und Palpitationen (89).

Ein weiteres in Deutschland zugelassenes Tokolytikum ist der Oxytocin-Antagonist Atosiban (90). Atosiban hat die gleiche Wirksamkeit wie Nifedipin oder Betasympathomimetika, weist dabei aber weniger Nebenwirkungen auf (91,92). Dazu gehören Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen und Angina pectoris (93).

Des Weiteren kann Stickstoffmonoxid (NO) als Tokolytikum eingesetzt werden. Es wirkt muskelrelaxierend auf den Uterus und kann somit vorzeitigen Wehen entgegenwirken

(94,95). Eine transdermale Verabreichung von NO in Form von Nitroglycerin ist im Vergleich zu Nifedipin gleich effektiv, allerdings zeigen sich mehr maternale Nebenwirkungen (96).

Die Wirkung von Magnesiumsulfat als Tokolytikum ist umstritten. Eine Metaanalyse von 2012 zeigt eine signifikante Wirkung im Vergleich zu Placebo (82). Demgegenüber steht ein Review von 2014, das wiederum keine erhöhte Wirksamkeit gegenüber Placebo zeigt (97). International wird Magnesiumsulfat zur Tokolyse nicht mehr empfohlen (98).

1.6 Ziele der Dissertation

Das Ziel dieser Studie war, den Einfluss von Betamethason, Indometacin und Fenoterol auf neonatale und maternale Monozyten nach einer in vitro Stimulation mit *E.coli* zu untersuchen. Wie schon erwähnt, wird Betamethason zur RDS-Prophylaxe während der Schwangerschaft bei drohender Frühgeburt eingesetzt. Damit genug Zeit bleibt, um die Kortikosteroide zu verabreichen, werden bei vorzeitiger Wehentätigkeit unter anderem die Tokolytika Fenoterol und Indometacin verwendet. Es ist jedoch wenig darüber bekannt, welche Auswirkungen diese Medikamente auf das neonatale und maternale Immunsystem haben und ob die Immunantwort bei gleichzeitig bestehender Infektion eingeschränkt ist. Zur Induktion einer entzündlichen Immunantwort wurden mononukleäre Zellen (MNC) mit *E.coli*-Lysat stimuliert und anschließend mit den Medikamenten inkubiert. Als Vergleichsgruppe wurden Zellen nichtschwangerer Frauen in gebärfähigem Alter (adult) verwendet. Um den Einfluss von Betamethason, Indometacin und Fenoterol auf die Monozyten zu evaluieren, wurden die Veränderungen der Oberflächenmarkerexpression und die Freisetzung der Entzündungsmarker IL-10, IL-6 und TNF- α untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Untersuchungsmaterial

In **Tabelle 1** ist die Auflistung des Untersuchungsmaterials dieser Studie zu sehen. Es wurde EDTA-Blut von insgesamt 19 Mutter/Kind-Paaren abgenommen und untersucht. Dabei handelte es sich um Reifgeborene nach Spontangeburt. Die Blutproben wurden direkt nach der Geburt gewonnen. Das neonatale Blut wurde dabei über die Nabelschnur abgenommen.

Tabelle 1 zeigt das Alter der Mütter in Jahren, die Schwangerschaftswoche bei Entbindung (Anzahl der Wochen plus einzelne Tage), das Blutvolumen in ml und die Gesamtzellzahl der MNC.

Tabelle 1: Liste der Neonaten und der korrespondierenden Mütter

Nr.	Alter Mutter (Jahre)	SSW	Blut-volumen Mutter (ml)	Gesamtzellzahl Mutter	Blutvolumen Neonat (ml)	Gesamtzellzahl Neonat
1	27	41+0	13	18,615x10 ⁶	15	78,285 x10 ⁶
2	36	40+5	15	18,75x10 ⁶	20	147,75x10 ⁶
3	29	40+2	9	24,098x10 ⁶	22,5	101,49 x10 ⁶
4	26	40+0	20	22 x10 ⁶	20	152,5 x10 ⁶
5	25	39+1	13	22,44 x10 ⁶	18	59,67 x10 ⁶
6	23	41+0	15	24,25 x10 ⁶	7,5	67,17 x10 ⁶
7	32	38+0	12,5	22 x10 ⁶	20	121,75 x10 ⁶
8	23	40+6	12,5	18,75 x10 ⁶	15	114 x10 ⁶
9	26	39+1	12,5	27,03 x10 ⁶	17,5	113,73 x10 ⁶
10	26	40+0	12,5	24,75 x10 ⁶	12,5	88,75 x10 ⁶
11	22	40+4	12,5	31,25 x10 ⁶	20	79,25 x10 ⁶
12	28	40+5	8	15 x10 ⁶	17,5	95,25 x10 ⁶
13	37	37+2	15	19,5 x10 ⁶	20	46 x10 ⁶
14	22	42+0	12,5	14,75 x10 ⁶	12,5	67 x10 ⁶
15	32	40+1	9,5	32,75 x10 ⁶	16	107,75 x10 ⁶
16	24	37+6	13	24,25 x10 ⁶	17,5	105,5 x10 ⁶

17	32	40+0	15	24 x10 ⁶	12,5	71,75 x10 ⁶
18	27	37+0	20	43,5 x10 ⁶	20	105,75 x10 ⁶
19	30	41+1	11	24,75 x10 ⁶	11	90,5 x10 ⁶

Tabelle 2 zeigt das Alter der Kontrollprobandinnen in Jahren, das Blutvolumen in ml und die jeweilige Gesamtzellzahl der MNC.

Tabelle 2: Liste der Kontrollgruppe (adult)

Nr.	Alter (Jahre)	Blutvolumen (ml)	Gesamtzellzahl
1	28	25	22x10 ⁶
2	21	25	45,5 x10 ⁶
3	26	22	27 x10 ⁶
4	33	22	32,75 x10 ⁶
5	23	13	24,25 x10 ⁶
6	24	22	27,25 x10 ⁶
7	26	22,5	32,25 x10 ⁶
8	34	22,5	42 x10 ⁶
9	24	25	48,45 x10 ⁶
10	25	25	52,02 x10 ⁶
11	30	22,5	42 x10 ⁶
12	28	23	38,25x10 ⁶
13	32	22,5	28,815 x10 ⁶
14	26	22,5	49,215 x10 ⁶
15	26	24	35,5 x10 ⁶
16	23	23	24,75 x10 ⁶
17	28	25	34,935x10 ⁶
18	25	24	30,09 x10 ⁶
19	23	16	29,5 x10 ⁶
20	30	15	23,25 x10 ⁶

2.1.2 Reagenzien

Tabelle 3: Reagenzien

Stoffe	Hersteller
Blutagarplatte	4% (w/v) Colombia Agar (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
Formaldehyd (37%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
H ₂ SO ₄ (Schwefelsäure 2M, 1 mol/l)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Humanes Serum	Wolfgang Ernst
Pancoll human (pH 6,5 – 7-5; Dichte:1,077 g/ml)	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
Phosphate buffered saline (PBS) (pH 7,4)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
RPMI 1640 L-Glutamine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Softasept [®] N 250ml Sprühflasche	Braun, Melsungen, Deutschland
Substrate Reagent Pack	R&D Systems, Minneapolis, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tween [®] 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HRP-Streptavidin	R&D Systems, Minneapolis, USA

2.1.3 Puffer und Medien

Tabelle 4: Puffer und Medien

Puffer & Medien	Zusammensetzung
EDTA Stock Lösung	0,5 M EDTA
FACS-Puffer	2 % (v/v) FKS, 2mM EDTA in PBS
Fixierlösung (2% Paraformaldehyd)	9,8 ml PBS, 0,6 ml Formaldehyd (36%)
PBS/EDTA	2mM EDTA in PBS
Reagent Diluent	1 % (w/v) BSA in PBS, steril filtriert

Waschpuffer	0,05 % (v/v) Tween in PBS
Zellmedium	10 % (v/v) FKS, 0,1% (v/v) Ampicillin in RPMI

2.1.4 Medikamente

Tabelle 5: Medikamente

Name	Wirkstoff	Hersteller
Celestan [®] Solub 4mg, 5 x 1ml	Betamethason dihydrogenphosphat, Dinatriumsalz	MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar, Deutschland
Liometacen [®] 50 mg/2ml	Indometacina Meglumina,	CHIESI Farmaceutici S.p.A., Parma, Italien
Partusisten [®] 5 x 10ml	Fenoterol hydrobromid	Boehringer Ingelheim Pharma, Ingelheim am Rhein, Deutschland

2.1.5 Antikörper

Tabelle 6: Aktivierung 4

Antikörper	Flouorchrom	Klon	Hersteller	Verdünnung
anti- human CD14	Pe / Cy 7	HCD14	BioLegend	1:50
anti- human HLA-DR	FITC	L243	BioLegend	1:50
anti- human CD71	Pe	CY1G4	BioLegend	1:50
anti- human CD69	APC	FN50	BioLegend	1:50
anti- human CD11b	Pacific Blue [™]	ICRF44	BioLegend	1:133
anti- human CD64	PerCP / Cy 5.5	10.1	BioLegend	1:50

Tabelle 7: Aktivierung 5

Antikörper	Flouorchrom	Klon	Hersteller	Verdünnung
anti- human CD14	Pe / Cy 7	HCD14	BioLegend	1:50
anti- human CD163	FITC	GHI/61	BioLegend	1:50
anti- human CD38	Pe	HIT2	BioLegend	1:50
anti- human CD192	APC	KO36C2	BioLegend	1:50
anti- human CD11c	Pacific Blue™	Bu15	BioLegend	1:50
anti- human CD32	PerCP / Cy 5.5	FUN-2	BioLegend	1:50

2.1.6 Reaktionskits

Tabelle 8: Reaktionskits

Human Il 10 DuoSet®	R&D Systems, Minneapolis, USA
Human Il 6 DuoSet®	R&D Systems, Minneapolis, USA
Human TNF-alpha DuoSet®	R&D Systems, Minneapolis, USA

2.1.7 Geräte

Tabelle 9: Geräte

Geräte	Hersteller
Accu-Jet pro	Brand, Wertheim, Deutschland
BD LSR II Flow Cytometer	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CO ₂ -Inkubator Heracell 240i	Thermo Scientific, Fremont, USA
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen, Deutschland
Eppendorf Reference® 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Reference® 10-100 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research® plus 0,5-10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research® plus 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research® plus 10-100 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Eppendorf Research [®] plus 20-200 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research [®] plus 2-20 µ	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Flüssigkeits-Absaugsystem BVC basic	Vacuubrand, Wertheim, Deutschland
Gefrierschrank (-20°C) comfort	Liebherr, Kirchdorf a.d. Iller, Deutschland
Gefrierschrank (-80°C) Forma 905	Thermo Scientific, Fremont, USA
Handzähler	Baumer IVO, Friedberg, Deutschland
Kühlschrank Premium	Liebherr, Kirchdorf a.d. Iller, Deutschland
Magnetrührer, Phoenix RSM10B	LabX, Midland, Kanada
Mehrfachdispenser, Handy Step S	Brand, Wertheim, Deutschland
Mikroplattenleser	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Mikroskop DM IL LED	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	HBG Precicolor, Deutschland
Sterilbank, Herasafe KS18	Thermo Scientific, Fremont, USA
Stoppuhr, TR118	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Transferpipette [®] S 20-200 µl	Brand, Wertheim, Deutschland
Vortexer, Vortexgenie 2	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Vortexer, Vortex V-1 plus	A. Hartenstein, Deutschland
Waage EMB 1000-2	Kern, Balingen, Deutschland
Waage, PCD 350-3	Kern, Balingen, Deutschland
Zentrifuge, Mikro	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge, Rotina 380R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge, Universal 320R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

2.1.8 Verbrauchsmaterial

Tabelle 10: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
24-Well Platte	Corning Incorporated, New York, USA
96-Well Platte	Corning Incorporated, New York, USA
Falcon™ Röhrchen (15ml, 50ml)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Filter System 500ml	Corning Incorporated, New York, USA

Filterspitzen (20µl, 200µl, 1000µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Glas-Pasteurpipetten 150mm	neoLab, Heidelberg, Deutschland
NeoTouch [®] Handschuhe S	Ansell, Yarra City, Australien
Pipettenspitzen (20µl, 200µl, 1000µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Plate Sealers, Polyester	Corning Incorporated, New York, USA
Präzisions Dispenser Tips	Brand, Wertheim, Deutschland
Premium Cardboard Freezer Box	Biologix Group, China
Röhre 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Safe Seal Reagiergefäß (1,5ml, 2ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette (5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette [®] 9ml K3 EDTA	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.1.9 Software

Tabelle 11: Software

BD FACSDiva	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Flow Jo	Flow Jo LLC, Ashland, USA
Graph Pad Prism	Graph Pad Software, La Jolla, USA
Microsoft Office 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA
SoftMax Pro Data Aquisition & Analysis Software	Molecular Devices, Sunnyvale, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Studiendesign

In einer in vitro Studie wurde experimentell der Einfluss von Betamethason, Indometacin und Fenoterol auf neonatale und maternale Monozyten untersucht.

Das Untersuchungsmaterial stammte von 19 spontan- und reifgeborenen Einlingen und deren Müttern (vgl. **Tabelle 1**). Die Teilnehmer wurden zufällig, nach Beachtung der Ein- und Ausschlusskriterien, ausgewählt. Die Blutentnahmen wurden von Mitarbeitern der Klinik St. Hedwig kurz nach Entbindung des jeweiligen Neugeborenen durchgeführt. Die anschließende experimentelle Untersuchung erfolgte im José-Carreras-Forschungsinstitut (Gebäude H1, Raum 13, AG Ernst) und wurde innerhalb von 12 Stunden nach Entnahme begonnen. Der Untersuchungszeitraum lag zwischen April und August 2017.

Einschlusskriterien:

- Komplikationslose Spontangeburt von Reifgeborenen (SSW ≥ 37)
- Keine erhöhten Entzündungsparameter im Labor vor der Geburt: C-reaktives Protein (CRP) ≤ 5 mg/l, Leukozytenkonzentration ≥ 4000 / μ l und ≤ 10000 / μ l
- Erfolgte Aufklärung und schriftliche Einverständniserklärung der Patienten vor der Entnahme

Ausschlusskriterien

- Erhöhte Entzündungszeichen im Labor (CRP > 10 mg/l, Leukozyten < 4000 / μ l und > 10000 / μ l)
- Frühgeborene (SSW $\leq 36+6$)
- Fehlende Einverständniserklärung
- Schlechte Qualität des Untersuchungsmaterials (teilweise geronnen)
- Entnahmezeitpunkt ≥ 12 Stunden
- SSW $> 42+0$

Das Blut der Neugeborenen wurde postpartal über die Umbilicalisgefäße der Nabelschnur abgenommen und in EDTA-Röhrchen gefüllt. Anschließend wurde der Mutter Blut

abgenommen. Es lagen jeweils 2 – 3 Röhrchen (vgl. **Tabelle 1**) vor, die dann bis zur Abholung im Kühlschrank bei 5 °C aufbewahrt wurden. Das Durchschnittsalter der Mütter lag bei 28 Jahren, dabei war die älteste 37 Jahre und die jüngste Gebärende 22 Jahre alt. Die Schwangerschaftswochen bei Entbindung lagen zwischen Woche 37+0 und 42+0.

Um die maternalen Zellen mit adulten Monozyten nichtschwangerer Frauen vergleichen zu können, wurde eine Kontrollgruppe mit 20 Frauen im gebärfähigen Alter (vgl. **Tabelle 2**) erstellt. Die Probandinnen waren zwischen 21 und 34 Jahren alt, der Durchschnitt lag bei 27 Jahren. Alle Teilnehmerinnen waren zum Zeitpunkt der Abnahme klinisch gesund. Es wurden jeweils 15 – 25 ml Blut entnommen und bis zum Beginn des Experiments, das spätestens 5 Stunden später begann, bei 5° C gelagert.

2.2.2 Isolation mononukleärer Zellen

Um die mononukleären Zellen (engl.: mononuclear cells, MNC) aus dem Blut zu isolieren, wurde die Methode der Dichtezentrifugation angewandt. Dazu diente Pancoll human (PanBiotech), das mit Hilfe von Größen- und Gewichtsunterschieden der zu trennenden Zellen einen Gradienten erstellt.

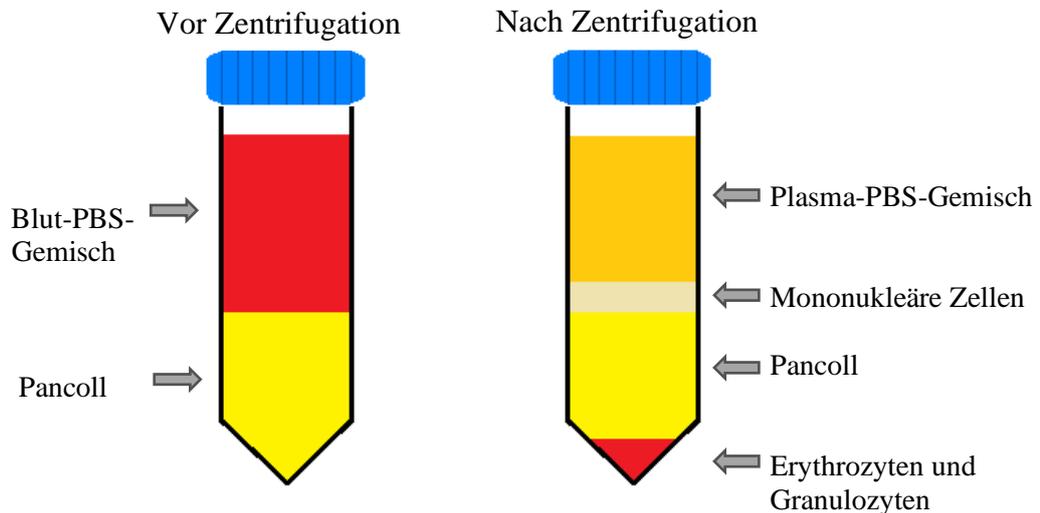
Zunächst wurde das Blut in einem 1:1 Gemisch mit phosphatgepufferten Salzlösung (engl.: phosphate buffered saline, PBS) (Sigma-Aldrich) in einem Falcon (BD Biosciences) verdünnt. 20 bis 35 ml davon wurden auf 15 ml der Trennflüssigkeit vorsichtig übergeschichtet. Danach wurde das Falcon mit dem Gemisch bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung (engl.: relative centrifugal force, rcf) von 600 g 30 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (Beschleunigung 5, Bremse 1).

Abbildung 1 zeigt schematisch den Unterschied zwischen den Falcons, vor und nach der Zentrifugation. Die verschiedenen Phasen sind deutlich erkennbar. Die Erythrozyten bilden Komplexe mit den Polysacchariden der Trennflüssigkeit und lagern sich mit den Granulozyten, deren Dichte höher ist als die von Pancoll, am Boden des Falcons ab.

Die MNC und Thrombozyten dringen nicht in die Trennflüssigkeit ein, da sie eine geringere Dichte als diese besitzen. Sie sind somit zwischen Pancoll und dem Serum-Plasma-Gemisch als eigene Schicht zu finden.

Nachdem 5 bis 10 ml des Überstandes abgesaugt wurden, wurden die MNC vorsichtig mit einer Pipette in ein Falcon überführt, in das vorher 25 ml PBS/EDTA (2 mM EDTA) vorgelegt wurden.

Abbildung 1: Dichtegradient



Es folgten zwei Waschschrte. Dazu wurde das MNC-PBS/EDTA-Gemisch bei 300 g, (Beschleunigung und Bremse von 8) 10 Minuten bei einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand des Zellpellets abgesaugt, die Zellen resuspendiert und erneut mit PBS/EDTA gewaschen.

Am Ende wurden die Zellen in 5 ml Zellmedium aufgenommen.

2.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzählung wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet. Dazu wurde aus 10 µl der Zellen eine 1:20 Verdünnung mit Trypanblau hergestellt. Trypanblau dringt in tote Zellen ein und färbt diese dunkelblau, lebendige heben sich dagegen weißlich von dem blauen Untergrund ab und sind somit gut voneinander zu unterscheiden. Da Trypanblau auch zytotoxisch wirkt, wurde die Zählung unmittelbar nach der Färbung an einem Lichtmikroskop (LeicaMicrosystems) durchgeführt.

Die Neubauer-Zählkammer besteht aus 4 Quadranten. Diese wurden einzeln ausgezählt und ein Mittelwert gebildet. Folgende Formel diente zur Berechnung der Zellzahl pro Milliliter:

$$\text{Mittelwert} \times \text{Kammerfaktor} (10^4) \times \text{Verdünnung} (20) = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}}$$

2.2.4 Stimulationsversuch

Die in vitro Stimulation erfolgte in einer 24-Well-Platte (Corning Incorporated). Die Negativkontrolle (-) setzte sich aus MNC und Zellmedium zusammen. In allen anderen Wells wurden die Zellen mit *E.coli*-Lysat stimuliert. Die Medikamente wurden zunächst einzeln eingesetzt (B, I, F) und die beiden Tokolytika jeweils zusätzlich mit dem Glukokortikoid Betamethason kombiniert (siehe **Tabelle 13**).

Um die Medikamente in ihrer physiologischen Konzentration einzusetzen, wurden diese vorverdünnt. **Tabelle 12** zeigt die jeweilige Ausgangskonzentration der Medikamente, die Verdünnung, die eingesetzte Menge und die daraus folgende Endkonzentration im Well.

Tabelle 12: Verdünnung der Medikamente und des Lysats für die Titration

	Ausgangs-konzentration	Verdünnung	Eingesetzte Menge	Endkonzentration im Well
MNC	Unterschiedlich	Auf 2×10^6 Zellen pro ml einstellen	1 ml	1×10^6 Zellen/ml
Betamethason	1 mg/ml	12 μl + 738 μl ZM = 750 μl	10 μl	80 ng/ml
Indometacin	1 mg/ml	25 μl + 100 μl ZM = 125 μl	10 μl	1 $\mu\text{g/ml}$
Fenoterol	50 $\mu\text{g/ml}$	4 μl + 1246 μl ZM = 1250 μl	10 μl	0,8 ng/ml
<i>E.coli</i> -Lysat	1×10^{10}	20 μl + 980 μl ZM = 1000 μl	10 μl	2×10^6

Es wurde zunächst 1 ml der MNC in jedes Well vorgelegt. Danach wurden jeweils 10 μl *E.coli*-Lysat und Medikamente dazugegeben und schließlich jedes Well mit Zellmedium auf 2 ml aufgefüllt (siehe **Tabelle 13**).

Die Ansätze wurden bei 37 °C im Inkubator (ThermoScientific) für eine Dauer von 24 Stunden inkubiert.

Tabelle 13: Pipettierschema für den Stimulationsversuch

	MNC (1x10 ⁶ Zellen/ml)	<i>E. coli</i> - Lysat	Betamethason (80 ng/ml)	Indometacin (1 µg/ml)	Fenoterol (0,8 ng/ml)	Zellmedium
-	1000 µl					1000 µl
+	1000 µl	10 µl				990 µl
B	1000 µl	10 µl	10 µl			980 µl
I	1000 µl	10 µl		10 µl		980 µl
BI	1000 µl	10 µl	10 µl	10 µl		970 µl
F	1000 µl	10 µl			10 µl	980 µl
BF	1000 µl	10 µl	10 µl		10 µl	970 µl

2.2.5 Durchflusszytometrische Analyse

Für die Untersuchung der Oberflächenmarkerexpression der Monozyten wurden die Zellen mit fluorochrommarkierten Antikörpern markiert. Diese binden die Proteine und lassen somit eine Aussage über die Häufigkeit der Expression zu. Es wurden insgesamt zwei Färbungen durchgeführt. **Tabelle 14** und **15** zeigen die verwendeten Antikörper, das jeweilige Fluorochrom und das Pipettierschema für den Mastermix.

Tabelle 14: Mastermix Färbung 1

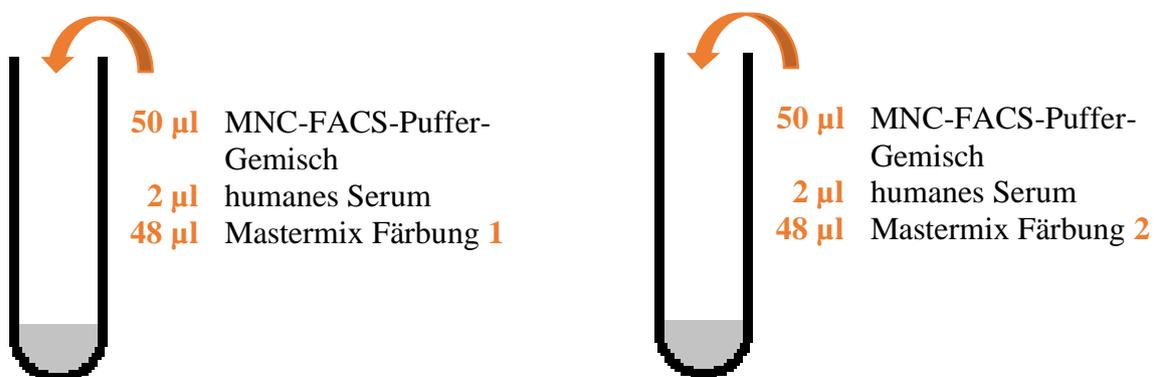
Antikörper	Fluorochrom	Pipettierschema
anti- human CD14	Pe / Cy 7	28 µl
anti- human HLA-DR	FITC	28 µl
anti- human CD71	Pe	28 µl
anti- human CD69	APC	28 µl
anti- human CD11b	Pacific Blue TM	10,5 µl
anti- human CD64	PerCP / Cy 5.5	28 µl
FACS-Puffer		521,5 µl

Tabelle 15: Mastermix Färbung 2

Antikörper	Flouorchrom	Pipettierschema
anti- human CD14	Pe / Cy 7	28 µl
anti- human CD163	FITC	28 µl
anti- human CD38	Pe	28 µl
anti- human CD192	APC	28 µl
anti- human CD11c	Pacific Blue™	28 µl
anti- human CD32	PerCP / Cy 5.5	28 µl
FACS-Puffer		504 µl

Die Zellen aus **2.2.4** wurden in 2 ml Reagiergefäße (Sarstedt) überführt. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren im Well wurde gewährleistet, dass auch die adhärennten Zellen aufgenommen wurden. Die Proben wurden bei 300 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, jeweils 500 µl, wurde in vier 1,5 ml Reagiergefäße gegeben und anschließend bei -70 °C eingefroren. Er diente der später durchgeführten Zytokinanalyse (siehe **2.2.7**). Zu dem Zellpellet wurden 150 µl FACS-Puffer gegeben und die Zellen darin resuspendiert. Für die beiden Färbungen wurden daraus nun jeweils 50 µl (entspricht ca. 2×10^5 Zellen) in 5 ml Röhrchen gegeben. Zu jeder Probe wurde zunächst 2 µl humanes Serum hinzugefügt, auf dem Vortexer (Carl Roth) kurz gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifischen Bindungen der Antikörper vorzubeugen. Anschließend wurden 48 µl des jeweiligen Mastermixes dazugegeben. Nach kurzem Mischen wurden diese für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. **Abbildung 2** dient zur Veranschaulichung.

Abbildung 2: Probe zur Analyse durch die Durchflusszytometrie



Es folgten zwei Waschschrirte. Dazu wurde in jedes R6hrchen 3 ml FACS-Puffer gegeben und die Proben bei einer rcf von 300 g, 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der 6berstand wurde dekantiert und der Vorgang wiederholt.

Abschlie6end wurden unter st6ndigem Mischen auf dem Vortexer 100 µl der Fixierl6sung (2 % Formaldehyd in PBS) hinzugegeben. Die Proben wurden bis zur FACS-Analyse im K6hlschrank bei 5 °C gelagert.

2.2.6 Durchf6hrung der FACS-Analyse und statistische Auswertung

Die Analyse durch das FACS-Ger6t fand im Institut f6r Immunologie in der Uniklinik Regensburg statt.

Die Proben wurden zun6chst auf dem Vortexer gemischt und dann in das BD LSR II Flow Cytometer (BD Biosciences) eingelesen. Zur Erfassung der Proben am Computer diente die Software BD FACSDiva (BD Biosciences).

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Graph Pad Prism (Graph Pad Software).

2.2.7 Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Der Einfluss von Betamethason, Indometacin und Fenoterol auf die Zytokinproduktion mononukle6rer Zellen wurde durch einen Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) gemessen. Dabei wurden zwei Antik6rper (*Capture* und *Detection*) verwendet, die an unterschiedlichen Epitopen am Antigen binden. Untersucht wurden die Zytokine Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 10 (IL-10) und der Tumornekrosefaktor (TNF- α). Als Testmaterial dienten die eingefrorenen 6berst6nde aus **2.2.5**. Es wurde jeweils eine Verd6nnung (IL-6 1:1000, IL-10 1:10 und TNF- α 1:20) eingesetzt mit einem Duplikat zu jeder Probe. Der Test wurde nach Angaben des Herstellers (R&D Systems) durchgef6hrt.

Zur Veranschaulichung der einzelnen Schritte dient **Abbildung 3**.

Im ersten Schritt wurde eine 96-Well Platte (Corning Incorporated) mit dem *Capture*-Antik6rper (R&D Systems) gecoatet. Dazu wurde der Antik6rper in PBS gel6st (Konzentration: 2µg/ml) und 100 µl in jedes Well pipettiert. Die Platte wurde mit einem Plate

Sealer (Corning) bedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörper sanken über Nacht ab und verankerten sich an der Oberfläche des Wells.

Am nächsten Tag folgten drei Waschschrirte. Der Inhalt der Platte wurde zunächst abgekippt und dann jedes Well mit 300 µl Waschpuffer (0,05 % Tween in PBS) gefüllt. Nach einer Inkubationszeit von ca. 3 Minuten wurde der Inhalt dekantiert und die Platte auf sauberen Papierhandtüchern ausgeklopft. Dieser Vorgang wurde zwei Mal wiederholt.

Um unspezifische Bindungen des *Detection*-Antikörpers zu verhindern, wurde vorher mit Reagent Diluent (1% BSA in PBS) geblockt. Dazu wurden 300 µl in jedes Well gefüllt und die Platte für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Daraufhin wurde, ausgehend von der höchsten Konzentration des Standards, eine serielle Verdünnungsreihe (1:2,5) mit Reagent Diluent erstellt (siehe **Tabelle 16**). Als Negativkontrolle diente der sogenannte Blank, der nur Reagent Diluent enthielt. Es wurden jeweils 100 µl des Standards und der verdünnten Proben (ebenfalls mit Reagent Diluent) in die verschiedenen Wells gegeben. Die 96-Well-Platte wurde entweder über Nacht bei 5 °C oder für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, damit die in der Probe befindlichen Zytokine von dem Capture-Antikörper gebunden werden konnten.

Tabelle 16: Verdünnungsreihe Standard

	IL-6 Konzentration (pg/ml)	IL-10 Konzentration (pg/ml)	TNF-α Konzentration (pg/ml)
Standard 1	600	2000	1000
Standard 2	240	800	400
Standard 3	96	320	160
Standard 4	38,4	128	64
Standard 5	15,36	51,2	25,6
Standard 6	6,144	20,48	10,24
Standard 7	2,457	8,19	4,096
Blank	0	0	0

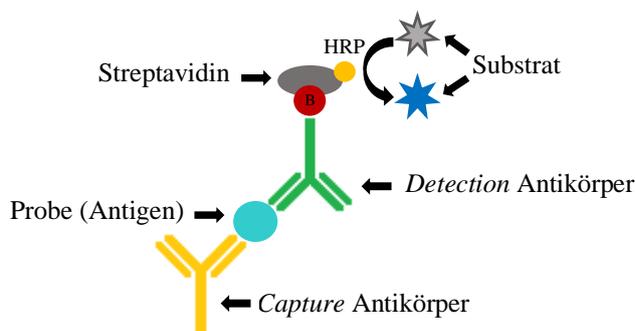
Die Platte wurde drei Mal gewaschen. Nun wurden jeweils 100 µl des biotinkonjugierten *Detection*-Antikörpers (50 ng/ml in Reagent Diluent) aufgetragen und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, damit dieser an die Zytokine binden konnte. Danach folgten wieder drei Waschschrirte, um den nichtgebundenen Antikörper auszuwaschen. Anschließend

wurden 100 µl Meerrettichperoxidase (engl.: horseradish-peroxidase, HRP) konjugiertes Streptavidin (1:40 verdünnt mit Reagent Diluent) hinzugefügt, das an das Biotin des *Detection*-Antikörpers band. Die Platte wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach weiteren drei Waschschrritten wurden nun 100 µl der Substrate Solution (1:1 Mischung aus Reagent A (Wasserstoffperoxid) und B (Tetramethylbenzidin)) hinzugegeben. Die Meerrettichperoxidase des Streptavidins setzte nun das Substrat um, was zu einem blauen Farbumschlag führte. Je nach Reaktionszeit wurde die Platte nach 8 bis 20 Minuten durch Zugabe von 50 µl Stop Solution (2 N H₂SO₄) abgestoppt. Durch die die Zugabe von 2 N Schwefelsäure wurde die Flüssigkeit im Well auf einen pH-Wert von 1 gesenkt, bei dem die katalytische Aktivität der Peroxidase nicht mehr vorhanden war. Außerdem gab es einen Farbumschlag vom blau gefärbten 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin-Radikalkation in das stabile gelbe 3,3', 5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenochinon-4,4'-diimoniumion.

Die Absorption des gelb gefärbten Ions wurde nun mit dem Mikroplattenleser (Molecular Devices) bei einer Wellenlänge von 450 und 540 nm photometrisch gemessen. Dies erfolgte innerhalb der ersten 20 Minuten nach dem Abstoppen. SoftMax (Molecular Devices) diente dabei als Lesesoftware.

Abbildung 3: Sandwich ELISA



3 Ergebnisse

3.1 Einfluss der Medikamente auf den Aktivierungszustand der Monozyten

Um die Einflüsse der Medikamente zu untersuchen, werden die Zellen, die mit den Medikamenten inkubiert wurden (Zellen + *E.coli*-Lysat + Medikamente), mit der Positivkontrolle (Zellen + *E.coli*-Lysat) verglichen.

3.1.1 Neonatale Monozyten

Abbildung 4 zeigt die signifikanten Auswirkungen der Medikamentenstimulation auf neonatale Monozyten.

Betamethason allein und in Kombination mit einem der beiden Tokolytika wirkt inhibierend auf die Expression von CD14 (siehe **Diagramm A, Abbildung 4**).

Betamethason allein und in Kombination mit jeweils einem der beiden Tokolytika wirkt inhibierend auf die Expression von CD32 (siehe **Diagramm G, Abbildung 4**).

Betamethason allein und in Kombination mit einem der beiden Tokolytika führt zu einer Hemmung der Expressionsänderung von HLA-DR (siehe **Diagramm C, Abbildung 4**).

Betamethason in Kombination mit Indometacin führt zu einer Hemmung der Expressionsänderung von CD11b (siehe **Diagramm D, Abbildung 4**).

Betamethason allein und in Kombination mit einem der beiden Tokolytika hat einen inhibierenden Effekt auf die Expressionsänderung von CD163 und führt dadurch zu einer Zunahme der Expression des Oberflächenmarkers (siehe **Diagramm F, Abbildung 4**).

Betamethason allein und in Kombination mit einem der beiden Tokolytika wirkt induzierend auf die Expression von CD38 (siehe **Diagramm E, Abbildung 4**).

Indometacin wirkt induzierend auf die Expression von CD69 (siehe **Diagramm B, Abbildung 4**).

Abbildung 4: Oberflächenmarker neonataler Monozyten

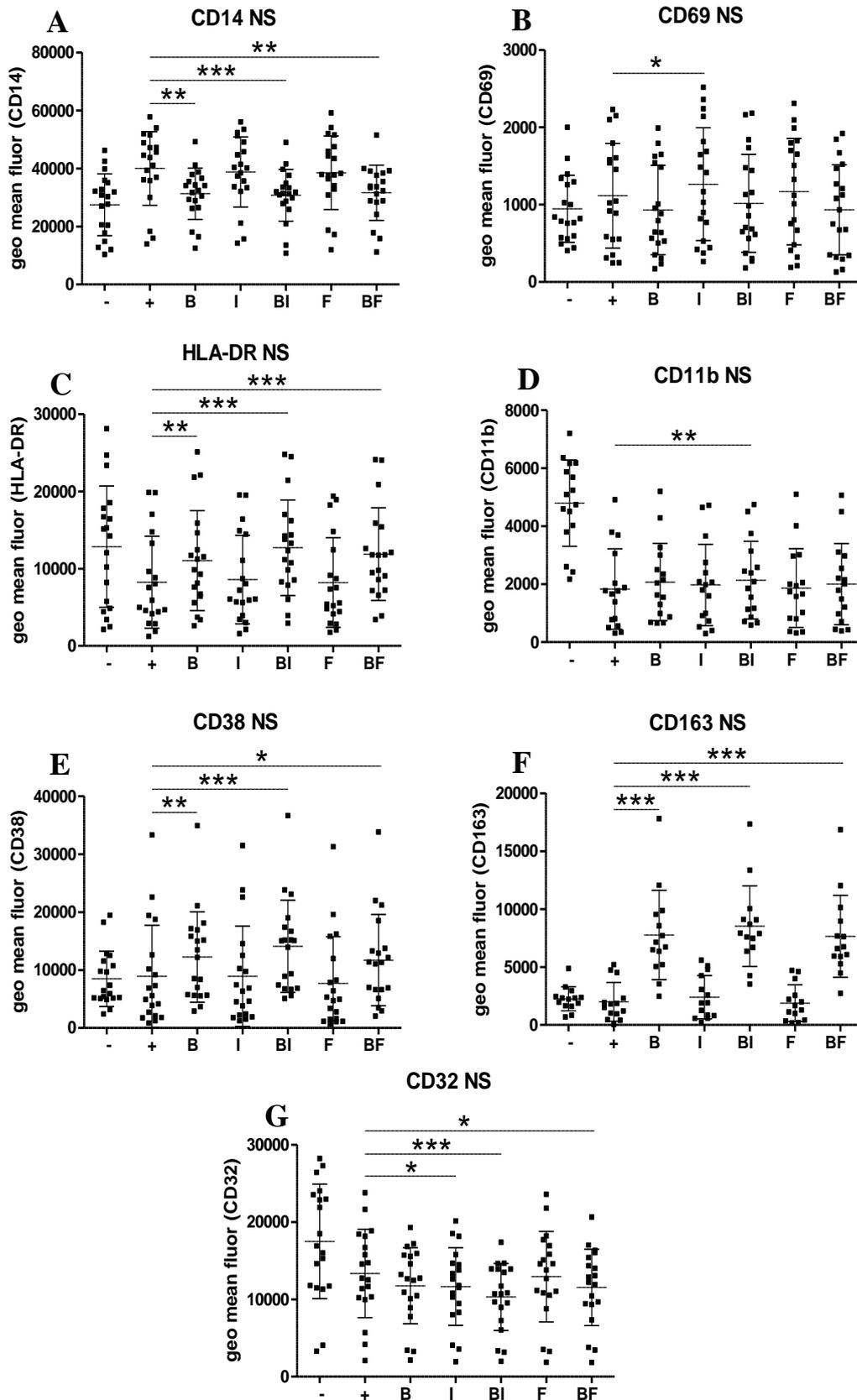


Abbildung 4 stellt die Expression der Oberflächenmarker neonataler Monozyten in Abhängigkeit der zugegebenen Medikamente Bethametason (B), Indometacin (I) und Fenoterol (F) und *E. coli* (+) dar. Alle Zellen wurden mit *E. coli* stimuliert mit Ausnahme der Negativkontrolle (-). Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Posttest. (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$)

Betamethason allein zeigt bei drei Oberflächenmarkern einen inhibierenden Effekt auf die Expressionsänderung (CD14, HLA-DR, CD163).

Betamethason in Kombination mit Indometacin zeigt bei vier Oberflächenmarkern (CD14, HLA-DR, CD11b, CD163) einen inhibierenden Effekt auf die Expressionsänderung.

Betamethason in Kombination mit Fenoterol zeigt bei drei Oberflächenmarkern (CD14, HLA-DR, CD163) einen inhibierenden Effekt auf die Expressionsänderung.

Betamethason allein und in Kombination mit jeweils einem der beiden Tokolytika zeigt einen induzierenden Effekt auf die Expressionsänderung von einem Oberflächenmarker (CD32).

Indometacin allein zeigt bei einem Oberflächenmarker (CD69) einen induzierenden Effekt auf die Expressionsänderung.

Fenoterol allein zeigt keine signifikanten Effekte auf die Oberflächenmarkerexpression.

3.1.2 Maternale Monozyten

Abbildung 5 zeigt die signifikanten Auswirkungen der Medikamentenstimulation auf maternale Monozyten.

Betamethason allein und in Kombination mit jeweils einem der beiden Tokolytika wirkt inhibierend auf die Expression von CD69 (siehe **Diagramm A, Abbildung 5**).

Betamethason in Kombination mit Indometacin wirkt inhibierend auf die Expression von CD32 (siehe **Diagramm F, Abbildung 5**).

Betamethason in Kombination mit jeweils einem der beiden Tokolytika führt zu einer Hemmung der Expressionsänderung von HLA-DR (siehe **Diagramm B, Abbildung 5**).

Betamethason in Kombination mit Indometacin führt zu einer Hemmung der Expressionsänderung von CD64 (siehe **Diagramm D, Abbildung 5**).

Betamethason allein und in Kombination mit einem der beiden Tokolytika führt zu einer Hemmung der Expressionsänderung von CD38 und CD163 und führt dadurch zu einer Zunahme der Expression des Oberflächenmarkers (siehe **Diagramm C und E, Abbildung 5**).

Abbildung 5: Oberflächenmarker maternaler Monozyten

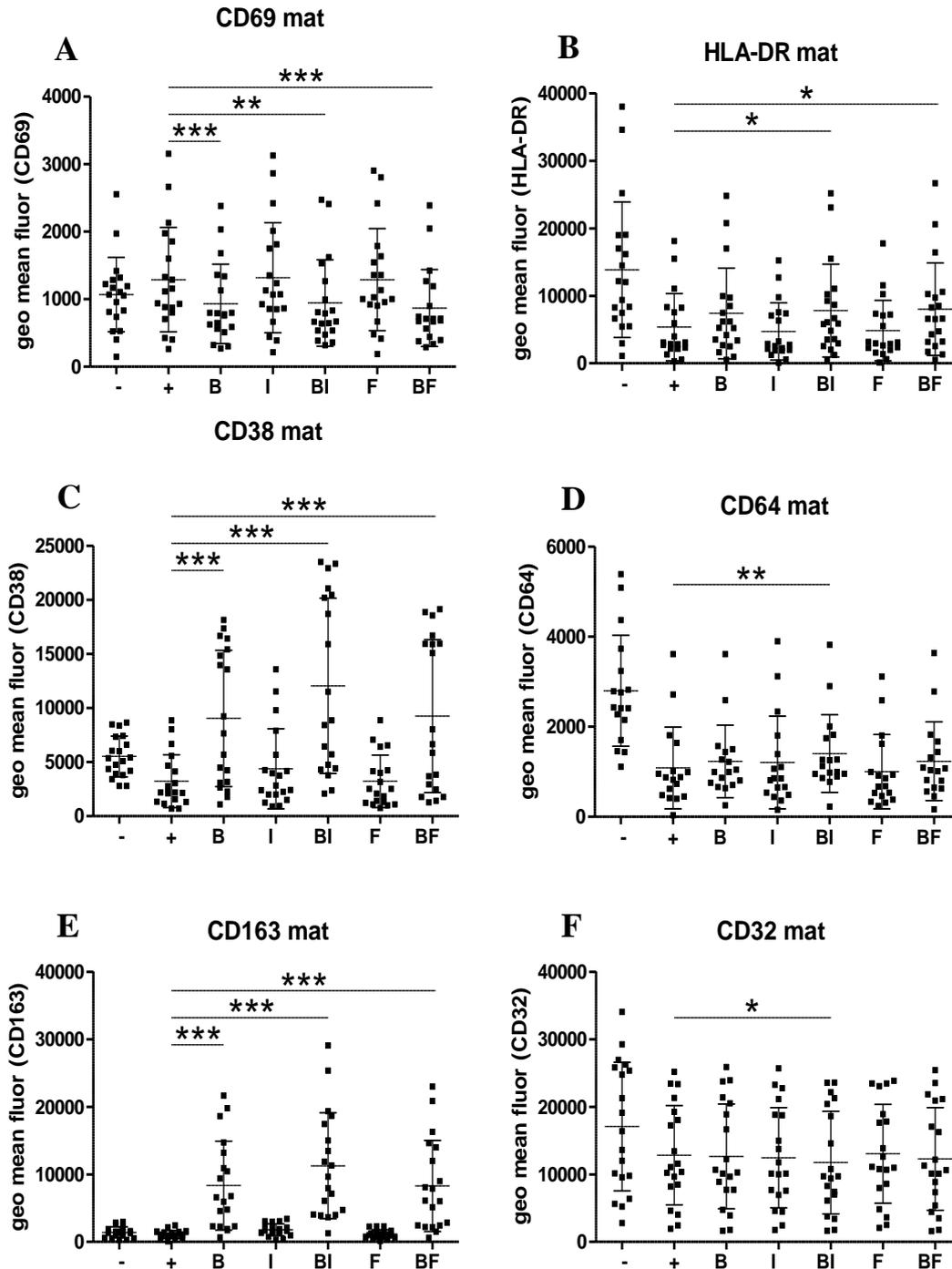


Abbildung 5 stellt die Expression der Oberflächenmarker maternaler Monozyten in Abhängigkeit der zugegebenen Medikamente Bethametason (B), Indometacin (I) und Fenoterol (F) und *E. coli* (+) dar. Alle Zellen wurden mit *E. coli* stimuliert mit Ausnahme der Negativkontrolle (-). Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Posttest. (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$)

Bei maternalen Monozyten zeigen sich bei 6 von 11 Oberflächenmarkern signifikante Effekte. Betamethason allein zeigt bei drei Oberflächenmarkern (CD69, CD38, CD163) einen inhibierenden Effekt auf die Expressionsänderung.

Betamethason in Kombination mit Indometacin zeigt bei fünf Oberflächenmarkern einen inhibierenden Effekt (CD69, HLA-DR, CD38, CD64, CD163) auf die Expressionsänderung.

Betamethason in Kombination mit Fenoterol zeigt bei vier Oberflächenmarkern (CD69, HLA-DR, CD38, CD163) einen inhibierenden Effekt auf die Expressionsänderung.

Indometacin in Kombination mit Betamethason zeigt bei einem Oberflächenmarker (CD32) einen induzierenden Effekt auf die Expressionsänderung.

Indometacin und Fenoterol allein zeigen keine signifikanten Effekte auf die Oberflächenmarkerexpression.

3.1.3 Adulte Monozyten

Abbildung 6 und 7 zeigen die signifikanten Auswirkungen der Medikamentenstimulation auf adulte Monozyten.

Betamethason in Kombination mit Fenoterol wirkt inhibierend auf die Expression von CD32 (siehe **Abbildung 6**).

Betamethason in Kombination mit Indometacin wirkt inhibierend auf die Expression von CD14 (siehe **Diagramm A, Abbildung 7**).

Betamethason allein und in Kombination mit Indometacin wirkt inhibierend auf die Expression von CD69 (siehe **Diagramm B, Abbildung 7**).

Betamethason in Kombination mit Indometacin führt zu einer Hemmung der Expressionsänderung von HLA-DR, CD11b und CD11c (siehe **Diagramm C, D und H, Abbildung 7**).

Indometacin allein und in Kombination mit Betamethason führt zu einer Hemmung der Expressionsänderung von CD38 und CD64 und führt dadurch zu einer Zunahme der Expression des Oberflächenmarkers (siehe **Diagramm E und F, Abbildung 7**).

Betamethason allein und in Kombination mit Indometacin führt zu einer Zunahme der Expression des Oberflächenmarkers CD163 (siehe **Diagramm G, Abbildung 7**).

Abbildung 6: CD32 adult

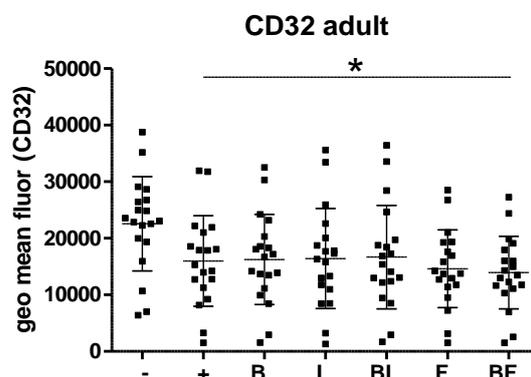


Abbildung 7: Oberflächenmarker adulter Monozyten

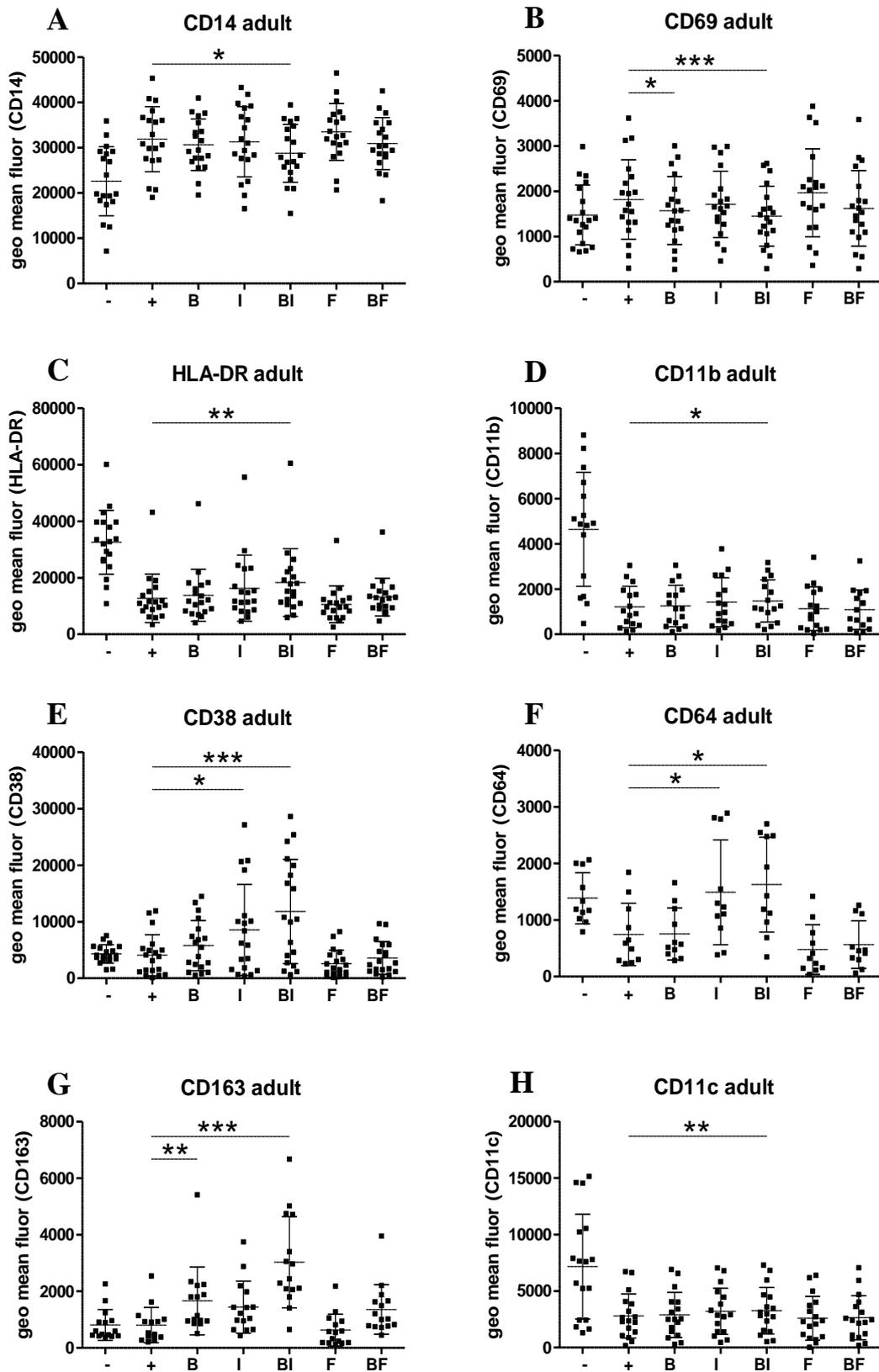


Abbildung 6 und 7 stellt die Expression der Oberflächenmarker adulter Monozyten in Abhängigkeit der zugegebenen Medikamente Bethametason (B), Indometacin (I) und Fenoterol (F) und *E. coli* (+) dar. Alle Zellen wurden mit *E. coli* stimuliert mit Ausnahme der Negativkontrolle (-). Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Posttest. (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$)

Bei adulten Monozyten zeigen sich bei 9 von 11 Oberflächenmarkern signifikante Effekte.

Betamethason allein zeigt bei einem Oberflächenmarker (CD69) einen inhibierenden Effekt auf die Expressionsänderung.

Betamethason in Kombination mit Indometacin zeigt bei sieben Oberflächenmarkern (CD14, CD69, HLA-DR, CD11b, CD38, CD64, CD11c) einen inhibierenden Effekt auf die Expressionsänderung.

Indometacin allein zeigt bei zwei Oberflächenmarkern (CD38, CD64) einen inhibierenden Effekt auf die Expressionsänderung.

Betamethason in Kombination mit Fenoterol zeigt bei einem Oberflächenmarker (CD32) einen induzierenden Effekt auf die Expressionsänderung.

Fenoterol allein zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die Oberflächenmarkerexpression.

Bei CD163 ist keine Veränderung der Oberflächenmarkerexpression durch die Stimulation mit *E.coli* sichtbar.

3.2 Zytokinfreisetzung

Im Folgenden werden die Auswirkungen der Medikamentenstimulation auf die Zytokinproduktion der MNC gezeigt. Der Einfluss der Medikamente (Zellen + *E.coli*-Lysat + Medikamente) wird dabei mit der Positivkontrolle (Zellen + *E.coli*-Lysat) verglichen.

3.2.1 Interleukin-6

Abbildung 8 zeigt die Auswirkung auf das Zytokin IL-6.

Betamethason allein und in Kombination mit Indometacin und Fenoterol reduziert signifikant die Freisetzung von IL-6 bei neonatalen und maternalen Zellen (**Diagramm A und B, Abbildung 8**).

Bei adulten Zellen zeigt kein Medikament einen signifikanten Einfluss auf die Freisetzung (**Diagramm C, Abbildung 8**).

Abbildung 8 Ausschüttung Zytokin IL-6

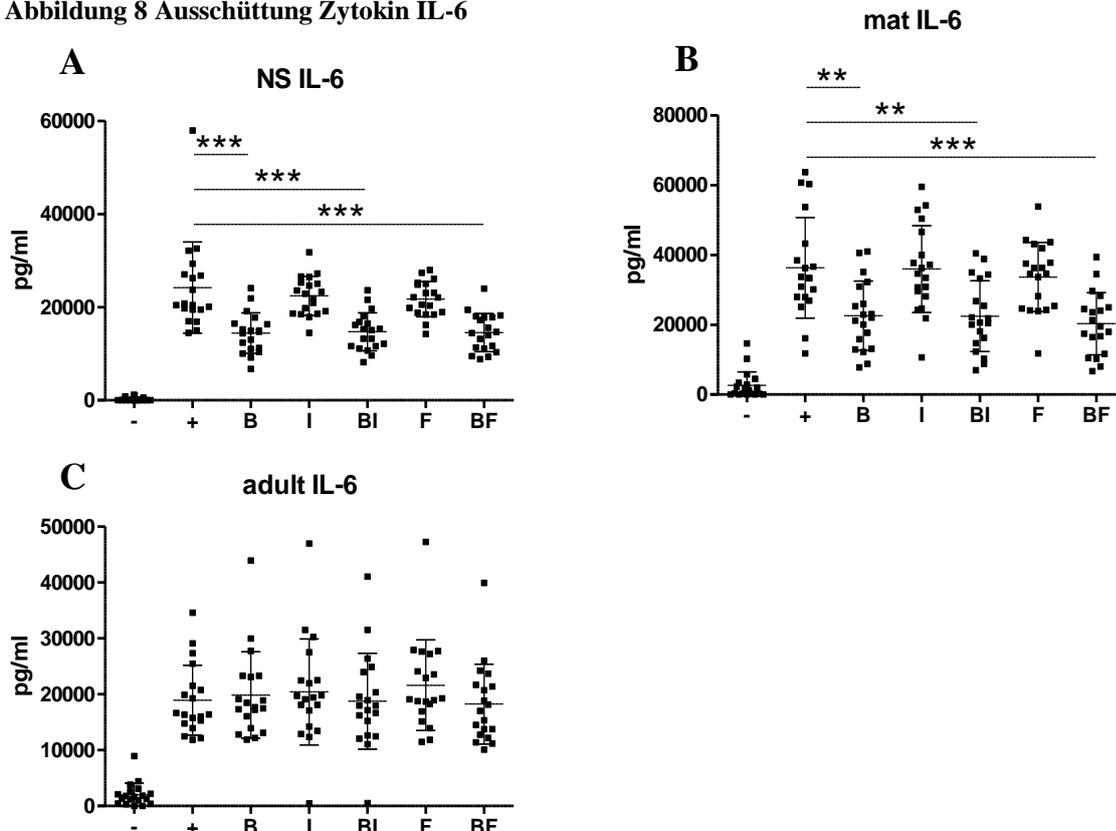


Abbildung 8 stellt die Ausschüttung des Zytokins IL-6 neonataler, maternaler und adulter MNCs in Abhängigkeit der zugegebenen Medikamente Bethametason (B), Indometacin (I) und Fenoterol (F) und *E. coli* (+) dar. Alle MNCs wurden mit *E.coli* stimuliert mit Ausnahme der Negativkontrolle (-). Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Posttest. (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$)

3.2.2 Interleukin-10

Abbildung 9 zeigt die Auswirkung auf das Zytokin IL-10.

Betamethason allein und in Kombination mit Fenoterol reduziert signifikant die Freisetzung von IL-10 bei maternalen Zellen (**Diagramm B, Abbildung 9**).

Bei neonatalen und adulten Zellen zeigt kein Medikament einen signifikanten Einfluss auf die Freisetzung von IL-10 (**Diagramm A und C, Abbildung 9**).

Abbildung 9 Ausschüttung Zytokin IL-10

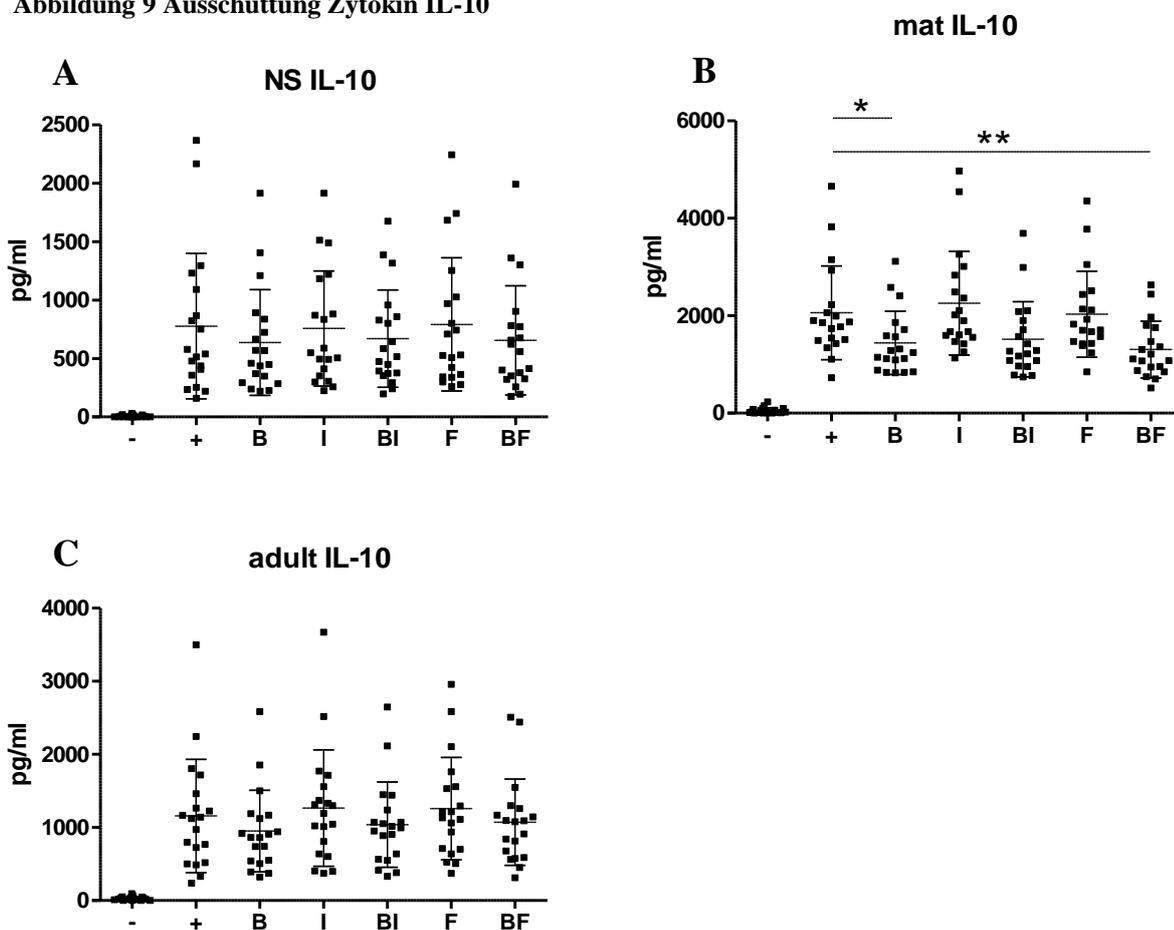


Abbildung 9 stellt die Ausschüttung des Zytokins IL-10 neonataler, maternaler und adulter MNCs in Abhängigkeit der zugegebenen Medikamente Bethametason (B), Indometacin (I) und Fenoterol (F) und *E. coli* (+) dar. Alle MNCs wurden mit *E. coli* stimuliert mit Ausnahme der Negativkontrolle (-). Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Posttest. (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$)

3.2.3 Tumornekrosefaktor- α

Abbildung 10 zeigt die Auswirkung auf das Zytokin TNF- α .

Fenoterol in Kombination mit Betamethason reduziert signifikant die Freisetzung von TNF- α bei neonatalen, maternalen und adulten Zellen (**Diagramm A, B und C, Abbildung 10**).

Indometacin zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Zytokinproduktion von TNF- α .

Abbildung 10 Ausschüttung Zytokin TNF- α

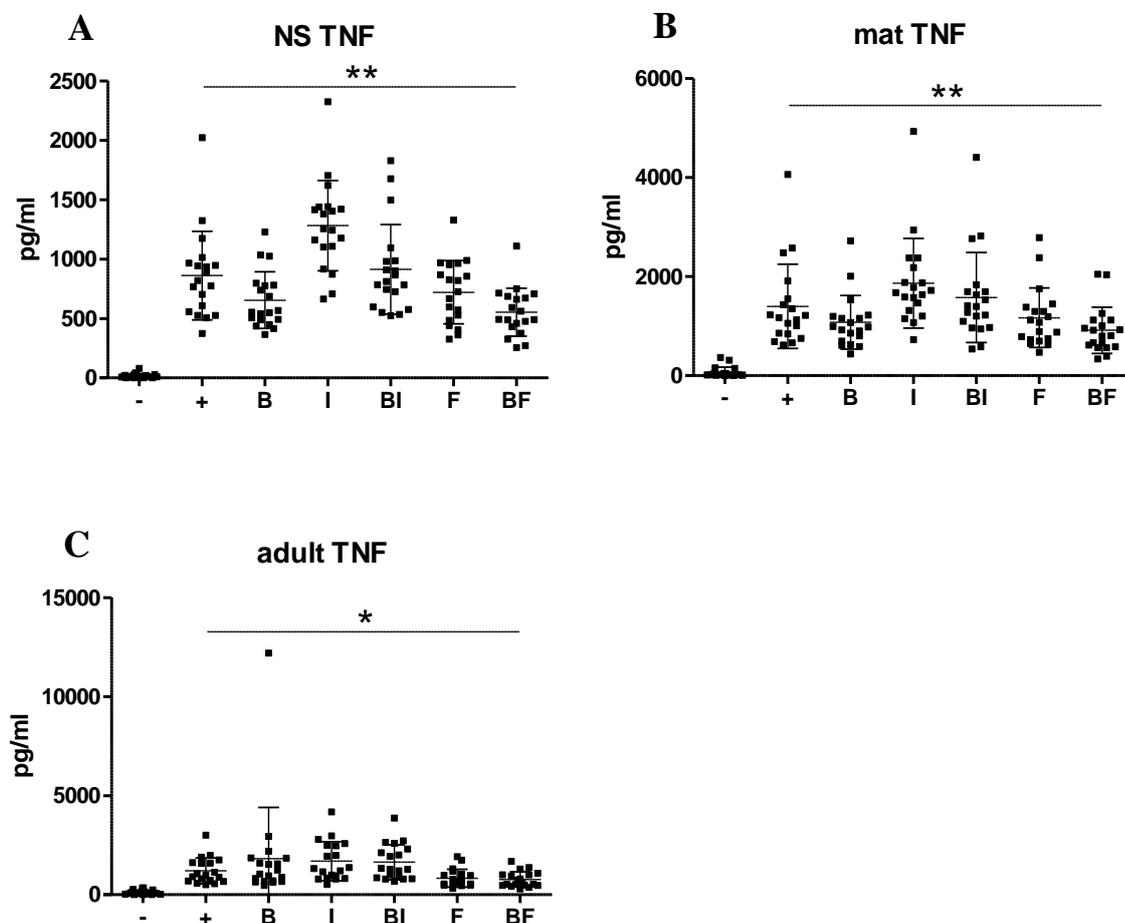


Abbildung 10 stellt die Ausschüttung des Zytokins TNF- α neonataler, maternaler und adulter MNCs in Abhängigkeit der zugegebenen Medikamente Bethametason (B), Indometacin (I) und Fenoterol (F) und *E. coli* (+) dar. Alle MNCs wurden mit *E. coli* stimuliert mit Ausnahme der Negativkontrolle (-). Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Posttest.

(* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$)

4 Diskussion

4.1 Einfluss von Betamethason auf Stoffwechsel und Immunsystem des Neonaten

Ein Aspekt dieser Arbeit ist die Untersuchung des Effekts von Betamethason auf aktivierte Monozyten. Mit dem folgenden Überblick wird dieser Effekt zunächst in den Gesamtzusammenhang weiterer Glukokortikoidwirkungen gestellt.

Glukokortikoide sind körpereigene Hormone. Sie gehören zur Gruppe der Kortikosteroide, die in der Nebennierenrinde synthetisiert werden. Neben dem Einfluss auf den Stoffwechsel des Körpers haben sie auch eine immunsuppressive Wirkung. Deswegen werden sie synthetisch hergestellt und unter anderem zur Therapie von Autoimmunkrankheiten, rheumatischen Erkrankungen, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Multipler Sklerose verwendet (99). Dabei kann die systemische Langzeiteinnahme erhebliche Nebenwirkungen verursachen. Dazu gehören Osteoporose, das metabolische Syndrom und ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (100–102). Aber auch auf der zellulären Ebene zeigen sich Veränderungen. Die Freisetzung von Zytokinen wird gehemmt und es kann zu Veränderungen der Zellzahl von Leukozyten im Blut kommen (103,104).

Glukokortikoide binden an den Glukokortikoidrezeptor (GR). Der GR ist ein ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor, der von fast allen Zellen im Körper exprimiert wird. Die jeweilige Wirkung von Glukokortikoiden auf die Zelle ist dabei zellspezifisch (105).

Wie schon in 1.4 beschrieben, werden Glukokortikoide bei drohender Frühgeburt seit vielen Jahren eingesetzt. Dabei führen sie zu einer signifikanten Reduktion des RDS, intraventrikulärer Blutungen, systemischer Infektionen in den ersten Lebensstunden, der nekrotisierenden Enterokolitis und zu einer Abnahme der neonatalen Mortalität (71). Die RDS-Prophylaxe ist in der Geburtshilfe in der westlichen Welt weit verbreitet und findet eine regelmäßige Anwendung. In Deutschland wird dafür standardmäßig Betamethason und alternativ Dexamethason verwendet (64). Doch neben den erheblichen Vorteilen einer Glukokortikoidgabe gibt es auch unerwünschte Nebenwirkungen auf das ungeborene Kind.

Beispielsweise weist das synthetisch hergestellte Betamethason eine andere Bioaktivität auf als endogene Glukokortikoide. Betamethason kann leicht die Plazenta passieren. Außerdem ist es nicht wie das körpereigene Kortisol an das Transportprotein Transcortin gebunden und wird auch nicht wie Kortisol durch das Enzym 11 β -HSD2 in eine biologisch inaktive Form

katalysiert. Es wirkt somit ungehindert auf den Fetus (106–108). Antenatal verabreichte Glukokortikoide unterdrücken zudem vorübergehend die Konzentration des fetalen Wachstumshormons sowie die Steroidproduktion beim Feten, die sich erst nach 7 Tagen wieder normalisieren (109,110). Eine einmalige Gabe von pränatalen Glukokortikoiden kann außerdem durch eine Veränderung der Funktion des Plazentatransporters zu Plazentaanomalien führen (111).

Glukokortikoide haben auch Einfluss auf das Geburtsgewicht. In Tierversuchen wurde gezeigt, dass Ratten, die pränatal Dexamethason erhielten, ein geringeres Geburtsgewicht aufwiesen (112). Auch menschliche Reifgeborene mit vorgeburtlicher Betamethasongabe weisen einen kleineren Kopfumfang, ein geringeres Körpergewicht und -länge auf, obwohl sie sich pränatal in der Größe nicht von der Kontrollgruppe unterschieden (113). Bei mehrmaliger Gabe pränataler Glukokortikoide nimmt das Geburtsgewicht sogar noch weiter ab (114). Bei Zwillingspaaren wurde beobachtet, dass Betamethason dosisabhängig das Geburtsgewicht, den Kopfumfang und die Länge von weiblichen frühgeburtlichen Zwillingspaaren reduziert, wobei die neonatale Mortalität und Morbidität nicht verbessert wird (115).

Auch Auswirkungen auf den Stoffwechsel wurden beobachtet. In einem Versuch mit Ratten wurde gezeigt, dass in der letzten Schwangerschaftswoche verabreichtes Dexamethason zu einer gestörten Glucosetoleranz im Erwachsenenalter führen kann (116). Auch in menschlichen Versuchen wurde nachgewiesen, dass die Gabe von pränatalem Betamethason im Nabelschnurblut von Neugeborenen über der 35. Schwangerschaftswoche zu signifikant niedrigeren Kortisolspiegeln und erhöhten C-Peptid- und Glucosespiegeln als in der Kontrollgruppe führt. Dies deutet daraufhin, dass Betamethason einen sofortigen hormonellen Effekt hat und somit zu metabolischen Veränderungen führt (117).

Vorgeburtlich verabreichte Glukokortikoide können aber auch die neurologische Entwicklung und das Verhalten beeinflussen. Schon frühere Studien wiesen darauf hin, dass multiple Gaben pränataler Glukokortikoide ein erhöhtes Risiko für Verhaltens- und Aufmerksamkeitsprobleme bei Kindern darstellen können (118). Dabei sollte man nicht außer Acht lassen, dass die Frühgeburtlichkeit sicherlich der Hauptfaktor für neurologische Entwicklungsstörungen ist. Dennoch wurde gezeigt, dass Kinder im Alter von 5 Jahren, die als Reifgeborene zur Welt kamen und einer multiplen pränatalen Glukokortikoidtherapie ausgesetzt waren, auch ein erhöhtes Risiko für neurologische Entwicklungsstörungen hatten. (119) Es gibt weitere Studien über die neurologischen Auswirkungen bei Tieren. So soll bei

trächtigen Schafen die pränatale Gabe von Glukokortikoiden zu einem retardierten fetalen Gehirnwachstum und zur Verzögerung der Reifung der Astrozyten sowie der kapillären Tight Junctions führen (120,121) und bei Pavianen sogar das Potential haben Gehirnstrukturen zu verändern (122).

Pränatal verabreichte Glukokortikoide haben auch Einfluss auf das Gefäßsystem. Erwachsene im Alter von 23 bis 28 Jahren wurden diesbezüglich untersucht. Patienten, die pränatale Glukokortikoide erhielten, wiesen eine verringerte Dehnbarkeit der Aorta und eine erhöhte Pulswellengeschwindigkeit auf, die einem 10 Jahre älteren Erwachsenen entsprach (123). Im Jahr 2000 wurden 210 Kinder im Alter von 14 Jahren untersucht, die als Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht von unter 1501g zur Welt kamen. Die systolischen und diastolischen Blutdruckwerte waren im Schnitt bei denjenigen Jugendlichen höher, die vor der Geburt eine Kortikosteroidtherapie erhielten. Allerdings hatten nur wenige einen Blutdruck im hypertensiven Bereich. Diese Ergebnisse legen jedoch nahe, dass vorgeburtlich verabreichte Glukokortikoide weit über die Geburt hinaus Einflüsse auf den Blutdruck haben (124).

Schon länger ist bekannt, dass antenatal verabreichte Glukokortikoide auch einen Einfluss auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) haben. Glukokortikoide werden in der Nebennierenrinde synthetisiert und die Sekretion wird über einen Rückkopplungsmechanismus mit der Hypophyse und dem Hypothalamus stimuliert oder gehemmt (34).

Der Einfluss auf die HPA-Achse kann in der Prüfung einer Stressreaktion gezeigt werden. In einer Studie von 2009 wurde die Reaktion auf Stress bei gesunden Neugeborenen, die in der 34. SSW geboren wurden, anhand des Kortisol-Spiegels im Speichel gemessen. Als Stressinduktion diente eine Fersenblutentnahme. Die Säuglinge mit vorgeburtlicher Betamethasonexposition zeigten keinen signifikanten Anstieg nach der Blutentnahme. Die Kortisolspiegel in der Kontrollgruppe zeigten jedoch einen signifikanten Anstieg (125). Das weist auf eine mangelnde Fähigkeit der HPA-Achse hin, nach Betamethasongabe adäquat auf Stress zu reagieren. Ähnliche Ergebnisse zeigen sich in vergleichbaren Studien (126,127). Andere Untersuchungen verdeutlichen, dass dieser Einfluss nicht nur kurz nach der Geburt, sondern noch vier bis sechs Wochen später nachweisbar bleibt (128). Pränatale Glukokortikoide stören die Regulierung der HPA-Achse vor allem bei Frühgeborenen, insbesondere wenn sie sehr früh in der Schwangerschaft verabreicht wurden. Diese Störungen der Funktion können später ein erhöhtes Krankheitsrisiko zur Folge haben (127). Die Störung der HPA-Achse führt auch zu einer verminderten Funktion der CD8 positiven T-Zellen (129).

In unserer Studie untersuchten wir, welche Auswirkungen Betamethason auf durch *E.coli* aktivierte Monozyten hat. Betamethason zeigt dabei einen inhibierenden Effekt auf die Expression einiger Oberflächenmarker bei neonatalen Monozyten im Vergleich zum allein durch *E.coli* aktivierten Zustand. Durch die Veränderung der Expression der Oberflächenmarker könnte eine adäquate Immunreaktion abgeändert oder abgeschwächt werden, da die genaue Zusammensetzung dieser Oberflächenmarker entscheidend für die intakte Immunreaktion der Monozyten ist. Die Hemmung des Aktivierungszustandes der Monozyten zeigt sich auch in einer reduzierten Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins IL-6 nach Betamethasongabe.

Monozyten gehören neben Makrophagen zu den effektivsten Produzenten von proinflammatorischen Mediatoren. Glukokortikoide sind bekannt für ihre hemmende Wirkung auf die Ausschüttung von Zytokinen (130). In einer Studie mit frühgeburtlichen Lämmern zeigte sich eine vorübergehend reduzierte Sekretion von IL-6 und H₂O₂ durch Monozyten, gefolgt von einem überschießenden Anstieg der Zytokine sieben Tage nach Betamethasongabe (131). Auch Schulz et al. demonstrierten, dass Betamethason zu einer verringerten Ausschüttung von IL-6 bei neonatalen Monozyten führt (132). Gleiches zeigte sich auch in einer weiteren Studie mit Neugeborenen (133). Auch in Versuchen mit adulten Monozyten scheint Betamethason eine inhibierende Wirkung auf die Produktion des Entzündungsmarkers IL-6 zu haben (104). Jedoch gibt es auch Autoren, die keinen inhibierenden Effekt auf Sezernierung von IL-6 bei neonatalen Monozyten feststellen konnten (134).

Auf die Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 konnten wir bei Neonaten keine signifikante Wirkung von Betamethason beobachten. IL-10 ist eines der wichtigsten Zytokine mit entzündungshemmenden Eigenschaften (135). Auch Bessler et al. konnten feststellen, dass die Gabe von Dexamethason bei neonatalen Monozyten kaum Einfluss auf die Produktion von IL-10 hat (136). Schulz et al. kamen zu dem gleichen Ergebnis (132).

Die hemmende Wirkung auf die Synthese entzündungsfördernder Mediatoren in Monozyten wird der direkten Hemmung von Glukokortikoiden auf die Transkriptionsfaktoren in Monozyten zugeschrieben (130). Studien zur Wirkung von Glukokortikoiden auf adulte Monozyten zeigten auch, dass die Verabreichung in vitro zu einer Differenzierung in einen spezifischen entzündungshemmenden Subtyp der Monozyten führt, der aktiv an der Auflösung von Entzündungsreaktionen beteiligt zu sein scheint (137). In vitro Studien

zeigten, dass Glukokortikoide einerseits das Überleben antiinflammatorischer Monozyten und andererseits die Apoptose proinflammatorischer Monozyten fördern (138,139). Zudem können Glukokortikoide zu einer Destabilisierung der mRNA von adulten Monozyten beitragen, die wiederum zu einer verringerten Expression proinflammatorischer Proteine führt (140). Durch Immunfluoreszenzfärbung wurden monozytäre, membrangebundene Glukokortikoidrezeptoren identifiziert, die durch Stimulation von Lipopolysacchariden (LPS) hoch- und durch Glukokortikoide herunterreguliert werden können. Somit sind möglicherweise die membrangebundenen Glukokortikoidrezeptoren für die rasche Wirkung von Glukokortikoiden an Monozyten verantwortlich (141,142). Bei Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematoses und rheumatoider Arthritis ist die Zahl von Monozyten mit membrangebundenen Glukokortikoidrezeptoren erhöht und stellt einen wichtigen Marker für die Krankheitsaktivität dar. Die Glukokortikoidbehandlung führt des Weiteren bei adulten Monozyten zu einem Adhäsionsverlust (137).

Insgesamt konnten wir die soeben beschriebene hemmende Glukokortikoidwirkung auf adulte Monozyten auch bei neonatalen und maternalen Monozyten - in hier sogar stärkerer Ausprägung – beobachten (siehe ausführlicher unter **4.4**).

Eine Studie, die sich mit den Auswirkungen von Betamethason auf die Entwicklung des neonatalen Immunsystems beschäftigte, führten Diepenbruck et al. durch. Untersucht wurde die Auswirkung von Betamethason auf die Entwicklung und Reifung der T-Lymphozyten im Thymus. In dieser Studie wurde bei Mäusen beobachtet, dass die pränatale Gabe von Betamethason schon bei einer sehr geringen Dosis zu einer Verringerung der Zahl lebensfähiger Thymozyten führt. Zudem wurde in einer MRT-Analyse eine signifikante Verringerung des Thymusvolumen beobachtet (143). 2020 gab es zu diesem Thema eine Studie bei menschlichen Feten. Zur Überprüfung wurde die Thymusgröße durch pränatalen Ultraschall regelmäßig gemessen. Auch hier war im Vergleich zur Kontrollgruppe eine vorgeburtliche Betamethasonexposition mit einer signifikanten Verringerung des Thymusumfangs verbunden (144). Diese Hinweise legen nahe, dass vorgeburtliches Betamethason einen erheblichen Einfluss auf die Entwicklung des Immunsystems ungeborener Kinder hat.

Deshalb stellt sich die Frage, ob die hemmenden Auswirkungen von Betamethason auf das neonatale Immunsystem zusätzlich zu einer Verschlechterung der ohnehin noch nicht ausreichend kompetenten Reaktion der Neugeborenen auf Entzündungen führt.

Wie in Punkt 1.3 beschrieben, stellt die Entwicklung der neonatalen Sepsis ein großes Problem für die Frühgeborenen dar. Möglicherweise spielt hier auch die Dosis der pränatal zur Lungenreife applizierten Steroiddosis eine Rolle bei der Entstehung entzündlicher Komplikationen. In einer Studie wurden Frühgeborene untersucht, die zwischen der 24. und 34. Schwangerschaftswoche nach vorzeitigem Blasensprung geboren wurden. Die doppelte Dosis von Betamethason war mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer EOS sowie einer Chorioamnionitis und Endometritis assoziiert. Die übliche Gabe von Betamethason war jedoch nicht signifikant mit infektiösen maternalen und neonatalen Komplikationen verbunden (145). Die gleichen Autoren führten eine zweite Studie durch, in der sie nur Patientinnen einschlossen, deren Fruchtblase bis 24 Stunden vor der Entbindung noch intakt war. Auch hier zeigte die zweifache Gabe von Betamethason eine Assoziation mit der EOS, Chorioamnionitis, Endometritis und sogar dem Tod des Neugeborenen (146). Eine andere Studie, die die Gabe der üblichen Dosis von Glukokortikoiden mit mehrfachen Gaben verglich, stellte jedoch kein signifikant erhöhtes Risiko für Infektionen bei der Mehrfachgabe fest (147).

Weitere Untersuchungen zu den Auswirkungen von Betamethason auf das neonatale Immunsystem und auf die veränderte Immunkompetenz der Frühgeborenen sollten folgen.

Trotz der nicht unerheblichen Nebenwirkungen von Glukokortikoiden auf das neonatale Immunsystem und auch auf andere Bereiche, wie den Stoffwechsel und die neurologische Entwicklung, ist die pränatale Betamethasongabe bei drohender Frühgeburt im Hinblick auf die Verhinderung des lebensbedrohlichen Atemnotsyndroms und einer Senkung der neonatalen Mortalität unverzichtbar.

Ein zusätzlicher Aspekt, der in diesem Zusammenhang betrachtet werden sollte, ist die Tatsache, dass es nicht bei allen Schwangeren, die vorgeburtliche Kortikosteroide erhalten, auch zur Frühgeburt kommt. Eine Untersuchung 2012 in Canada zeigte, dass 52% der Frauen, die pränatale Glukokortikoide erhielten, erst in oder nach der 35. SSW entbanden (148). Eine andere Studie aus dem Jahr 2010 spricht von mehr als einem Drittel aller Frauen, deren Kinder in oder nach der 34. SSW zur Welt kamen (149).

Der maximale Nutzen einer pränatalen Glukokortikoidgabe ist in den ersten 24 h bis sieben Tagen nach Gabe zu erwarten (150). Bei frühgeburtlichen Zwillingen wurde gezeigt, dass die einmalige Gabe von antenatalen Glukokortikoiden nur dann mit einem reduzierten Risiko für ein RDS verbunden ist, wenn die Geburt innerhalb von zwei bis sieben Tagen nach Gabe erfolgt (151). Laut einer Studie von 2003 hatten Kinder, die mehr als sieben Tage vor der

Geburt pränatalen Glukokortikoiden ausgesetzt waren, kein reduziertes Risiko mehr für die Entwicklung eines RDS, aber ein erhöhtes Risiko für perinatale Mortalität (152). Der Zeitpunkt der Gabe ist also entscheidend für die optimale Wirkung. Im 3. Trimenon erhöht sich zudem die maternale Kortisolproduktion (153). Nach der 36. SSW steigt diese nochmals an, was einerseits zur Organreifung beiträgt und möglicherweise auf die metabolischen Anforderungen der Geburt vorbereitet (154). Das bedeutet, dass Neugeborene kurz vor der Geburt ohnehin einer erhöhten endogenen maternalen Kortisolproduktion ausgesetzt sind. Bei zunächst drohender aber letztlich nicht eingetretener Frühgeburt wird die Steroidexposition des Kindes noch durch die zur Lungenreife verabreichte Glukokortikoiddosis erhöht. Von den Vorteilen einer pränatalen Betamethasongabe profitieren also vor allem die, bei denen tatsächlich eine Frühgeburt eintritt. Es gilt also, das Risiko der Frühgeburt noch besser abzuschätzen.

In Frankreich läuft derzeit eine doppelblinde Placebo-kontrollierte Studie, welche die Gabe der halben Dosis von Betamethason zur RDS-Prophylaxe testet. Allen Frauen wird aufgrund drohender Frühgeburt einmalig 11,4 mg Betamethason verabreicht. Nach 24 Stunden wird der Hälfte der Frauen eine weitere Dosis von 11,4 mg verabreicht und der anderen Hälfte ein Placebo. Es soll getestet werden, ob die Hälfte der bisherigen Dosis ausreicht, um das Risiko eines RDS im gleichen Umfang zu senken wie die übliche Dosis bisher (155). Dies könnte ein Ansatz sein, die Nebenwirkungen von Glukokortikoiden zu vermindern und andererseits weiterhin einen guten Schutz gegen das RDS zu gewährleisten.

4.2 Wirkung von Betamethason auf maternale Zellen

Das maternale Immunsystem unterscheidet sich vom Immunsystem nicht schwangerer Frauen. Die Hälfte des genetischen Materials des Fetus stammt vom Vater, das Risiko für die Abstoßung des Fetus ähnelt dem eines transplantierten Organs (156). Um eine Abstoßung zu verhindern, finden sich im maternalen Immunsystem einige Veränderungen. Das Immunsystem während der Schwangerschaft ist komplex und einzigartig. Generell von einer reinen Immunsuppression zu sprechen wird den spezifischen Veränderungen nicht gerecht (157).

Beispielsweise kommt es während der Schwangerschaft zur Erhöhung der immunsuppressiven CD25- und CD4-positiven regulatorischen T-Zellen. Diese scheinen wichtig für die Aufrechterhaltung der materno-fetalen Toleranz während der Schwangerschaft zu sein (158). Es gibt auch Hinweise dafür, dass die zelluläre Immunantwort während der Schwangerschaft supprimiert wird, aber die humorale Immunität weiter normal funktioniert (156). Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass die TH1/TH2-Relation der T-Helferzellen in Richtung des TH2-Phänotyps verschoben ist (159). Diese Verschiebung zum TH2 Subtyp führt zu einer verstärkten antikörpervermittelten Immunantwort gegenüber Krankheitserregern und zu einer verminderten zellvermittelten Immunantwort durch TH1-Zellen (160). Die systemische Unterdrückung der zellvermittelten Immunität kann zu einer erhöhten Anfälligkeit für Viren, Bakterien und Parasiten während der Schwangerschaft führen.

Beispielsweise sind Schwangere in Malariagebieten anfälliger für eine Infektion während der ersten Hälfte der Schwangerschaft und dieses erhöhte Risiko nimmt in der zweiten Hälfte nur langsam ab (161). Eine Infektion mit dem Lassafieber führt bei schwangeren Frauen vor allem im dritten Trimenon zu einer erhöhten Sterberate im Vergleich mit nicht schwangeren Frauen (162). Auch in der Influenza Pandemie von 2009 wurde beobachtet, dass Schwangere im Vergleich zu nicht schwangeren Frauen ein erhöhtes Risiko für schwere Verläufe hatten, die teilweise zu Krankenhausaufenthalten, Intensivbehandlung oder dem Tod führten (163). Dies bestätigte sich auch in einer Studie, in der trächtige Mäuse mit dem Influenzavirus infiziert wurden. Die Immunantwort der trächtigen Mäuse war im Vergleich zu der nicht trächtiger Mäuse signifikant eingeschränkt (164).

In unseren Versuchen zeigt Betamethason einen inhibierenden Effekt auf die Expression mehrerer Oberflächenmarker bei maternalen Monozyten im Vergleich zur reinen Stimulation mit *E.coli*. Diese Veränderung des Aktivierungszustandes könnte eine Abschwächung oder Hemmung der Immunreaktion maternaler Monozyten auf Infektionen zur Folge haben.

Die Hemmung zeigt sich auch in der durch Betamethason verringerten Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins IL-6.

Durch die oben beschriebene Vulnerabilität des maternalen Immunsystems gegenüber Infektionen könnte die pränatale Gabe von Betamethason das Immunsystem in seiner Funktion zusätzlich einschränken und zu schwereren Verläufen bei Infektionskrankheiten führen. Weitere Studien zu den Auswirkungen von Betamethason auf das maternale Immunsystem in vitro und auch in vivo und die spezielle Rolle der Monozyten sollten folgen.

4.3 Effekt von Indometacin und Fenoterol

Wie in 1.5 beschrieben werden Indometacin und Fenoterol zur Wehenhemmung bei drohender Frühgeburt eingesetzt. Für die Wirksamkeit von Tokolytika im Vergleich zu Placebo besteht aufgrund der Heterogenität zahlreicher Studien bezüglich Indikationsstellung und anderer Faktoren nur begrenzte Evidenz (64).

Ein Cochrane Review von 2014 zeigt andererseits, dass Betasympathomimetika im Vergleich zu Placebo die Frühgeburtenrate signifikant innerhalb von 48 Stunden senken können. Es gab jedoch keine signifikanten Verbesserungen in Bezug auf das neonatale Outcome (79). Fenoterol findet vor allem in Deutschland Anwendung, dabei vorwiegend als Bolustokolyse. Wie schon in 1.5 beschrieben weisen Betasympathomimetika unter den Tokolytika die meisten maternalen und fetalen Nebenwirkungen auf (73). Von der WHO werden Betasympathomimetika zur Tokolyse allgemein nicht mehr empfohlen (80).

Zudem wies Berg 1985 in einer Studie nach, dass sich die Konzentration von β_2 -Rezeptoren, an die Fenoterol andockt, während der Behandlung mit Betasympathomimetika im Uterus vermindert. Diese Ergebnisse legen nahe, dass sich durch das Herunterregulieren der β_2 -Rezeptoren die Wirkdauer dieser Medikamente reduziert (165).

Wir konnten in unseren Versuchen zeigen, dass Fenoterol die inhibitorische Wirkung von Betamethason auf die Expression der Oberflächenmarker neonataler und maternaler Monozyten verstärkt. Es trägt also zusätzlich zur Hemmung des Aktivierungszustandes der Monozyten bei. Fenoterol allein zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die Veränderung der Oberflächenmarkerexpression. Ebenso führt es in Kombination mit Betamethason zu einer signifikant verringerten Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α bei neonatalen und maternalen Monozyten. Auch Kuroki et al. zeigten, dass Betasympathomimetika wie Salbutamol und Terbutalin bei adulten Monozyten einen hemmenden Einfluss auf die Produktion von TNF- α haben (166). In einer weiteren Studie wurde deutlich, dass Betasympathomimetika die TNF- α -Produktion von humanen mononukleären Zellen hemmen. (167). In unseren Versuchen war dieser Effekt jedoch nur in Kombination mit Betamethason zu beobachten. Insgesamt scheint Fenoterol also einen verstärkenden Effekt auf die immunsuppressive Wirkung von Betamethason auszuüben.

Aufgrund der eingeschränkten Verträglichkeit und der Tatsache, dass die Weltgesundheitsorganisation Betasympathomimetika nicht mehr zur Tokolyse empfiehlt, sollte die Indikation von Fenoterol zur Tokolyse zurückhaltend gestellt werden.

Indometacin gehört zu den unspezifischen Cyclooxygenase (COX)-Hemmern. In Deutschland ist Indometacin jedoch nur im Off-Label-Use als Tokolytikum zugelassen (64). Die Datenlage zur Verwendung von Indometacin ist nicht eindeutig. Schon 2009 zeigte eine Metaanalyse, dass Prostaglandin-Inhibitoren unter den Tokolytika die beste Kombination aus Verträglichkeit für die Mutter und der Verzögerung der Geburt darstellen (73). Auch ein Review von 2012 kam zu dem Schluss, dass Prostaglandin-Inhibitoren neben Kalzium-Kanal-Blockern unter die besten drei Medikamentenklassen eingestuft werden sollten, da sie die Geburt am effektivsten um 48 Stunden verzögern können, wenige Nebenwirkungen und ein gutes neonatales Outcome aufweisen (82). Ein Cochrane Review von 2015 kam diesbezüglich zu einem anderen Ergebnis. Obwohl zum Großteil die gleichen Studien ausgewertet wurden wie bei der Metaanalyse von 2012, konnten die Autoren dieses Reviews Prostaglandin-Inhibitoren zwar einen gewissen Nutzen in Bezug auf die Verzögerung der Geburt im Vergleich zur Placebogruppe und der Betasympathomimetika zuschreiben sowie eine Überlegenheit gegenüber Betasympathomimetika und Magnesiumsulfat in Bezug auf maternale Nebenwirkungen feststellen. Aber aufgrund ungenügender Qualität der ausgewerteten Studien und fehlender Langzeitergebnisse kommen sie zu dem Schluss, dass noch nicht genügend Evidenz vorhanden sei, um Prostaglandin-Inhibitoren zur Tokolyse empfehlen zu können (84).

Zudem zeigte sich in einer Metaanalyse von 2015 ein erhöhtes Risiko für intraventrikuläre Blutungen, nekrotisierende Enterokolitis und periventrikuläre Leukomalazie der Neugeborenen. Allerdings fehlen in dieser Metaanalyse Angaben zur Dosierung und Dauer der Anwendung und es gibt auch keine Aussagen darüber, wie groß der Anteil der Schwangeren war, die pränatale Kortikosteroide erhielten (83). Indometacin hat einen Einfluss auf den renalen Blutfluss der Feten und kann bei Gabe von mehr als 72 Stunden durch Verringerung der Urinproduktion zu einem Oligohydramnion führen (168). Allerdings zeigte eine Studie mit der Gabe von Indometacin über 48 Stunden bei nur 2 von 61 Schwangeren die Entstehung eines Oligohydramnions, das sich zudem bei beiden nach Beendigung der Therapie wieder zurückbildete. (169). Dementsprechend empfiehlt die European Association of Perinatal Medicine eine Kontrolle der Fruchtwassermenge zu Beginn der Therapie mit Indometacin und eine weitere nach 48 - 72 Stunden (170). Zudem kann Indometacin aufgrund eines erhöhten Risikos des vorzeitigen Verschlusses des Ductus arteriosus botalli nicht nach der 32 SSW verabreicht werden, was die Anwendbarkeit zeitlich etwas einschränkt. (84)

In unseren Versuchen zeigte sich, dass Indometacin die inhibitorische Wirkung von Betamethason auf die Expression der Oberflächenmarker neonataler und maternaler Monozyten verstärkt. Indometacin trägt also wie Fenoterol zur Hemmung des Aktivierungszustandes der Monozyten bei. Auch auf die Produktion des Zytokins IL-6 führt Indometacin in Kombination mit Betamethason zu einer signifikant verringerten Ausschüttung.

Wie schon erwähnt, gehört Indometacin zur Gruppe der COX-Hemmer. Diese Hemmung führt zu einer verringerten Synthese von Prostaglandinen aus Arachidonsäure. Dieser Effekt wirkt einerseits wehenhemmend, andererseits ist er auch für die entzündungshemmende und fiebersenkende Wirkung des Medikamentes verantwortlich (171). Die entzündungshemmende Wirkung könnte den Einfluss von Indometacin auf den Aktivierungszustand von Monozyten erklären. Insgesamt scheinen Indometacin und Fenoterol also einen verstärkenden Effekt auf die immunsuppressive Wirkung von Betamethason auszuüben und somit auf den Aktivierungszustand der Monozyten.

Weitergehende Forschung ist nötig, um differenziert die Wirkung dieser beiden Tokolytika und ihr Zusammenwirken mit Betamethason besser zu verstehen.

4.4 Vergleich der neonatalen und maternalen Zellen mit adulten Zellen

Vergleicht man neonatale und maternale Monozyten mit adulten Monozyten, dann scheint insgesamt der Einfluss von Betamethason auf die Expression von Oberflächenmarkern bei adulten Zellen geringer ausgeprägt zu sein. Das könnte darauf hindeuten, dass neonatale und maternale Zellen empfindlicher für die Gabe von Glukokortikoiden sind als adulte Zellen.

Wie unter Punkt 4.1 beschrieben, belegen zahlreiche Studien deutlich immunsupprimierende Effekte auf adulte Monozyten durch Glukokortikoide. Die in unserer Studie bei adulten Monozyten eher gering ausgeprägten hemmenden Effekte durch Betamethason könnten auf die relativ geringe Inkubationsdosis zurückzuführen sein. Neonatale und maternale Zellen zeigen jedoch eine deutliche Reaktion als Hinweis auf eine erhöhte Steroidsensibilität dieser Zellen. Bei der Zytokinproduktion der adulten Zellen zeigt sich, anders als bei neonatalen und maternalen Zellen, auch keine verringerte Ausschüttung von IL-6. Lediglich bei der

Produktion von TNF- α fiel eine gering reduzierende Wirkung von Betamethason in Kombination mit Fenoterol auf.

Das könnte zusätzlich daraufhin deuten, dass der Aktivierungszustand adulter Zellen nicht wesentlich gehemmt wurde.

5 Zusammenfassung

Die Ergebnisse zeigen, dass die *in vitro* Behandlung neonataler und maternaler Zellen kurz nach Spontangeburt mit Betamethason allein oder in Kombination mit einem der beiden Tokolytika zu einem verringerten Aktivierungszustand der Monozyten führt. Diese Hemmung der Aktivierung zeigt sich nicht nur phänotypisch, sondern ist auch der Grund für die verminderte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Da diese Zytokine die Immunantwort maßgeblich aktivieren und steuern (172), ist davon auszugehen, dass Betamethason die Immunantwort beeinträchtigt. Da das neonatale Immunsystem unreif und naiv ist und daher diverse Beeinträchtigungen aufweist, sind Neonaten generell anfälliger für Infektionen (173). Durch die Gabe von Betamethason wird die Aktivierung und Funktion der Monozyten gehemmt und das beeinträchtigte neonatale Immunsystem möglicherweise zusätzlich geschwächt. Fenoterol und Indomethacin scheinen die immunsuppressive Wirkung von Betamethason zusätzlich zu verstärken. Die Indikation und der Zeitpunkt einer pränatalen Betamethason- und Tokolytikagabe sollte also in jedem Fall sorgfältig geprüft werden.

6 Vorzüge und Limitationen

Einer der Vorzüge dieser Arbeit ist, dass nicht nur Monozyten des adulten Immunsystems untersucht wurden, sondern der Fokus vor allem auf neonatale und maternale Monozyten gelegt wurde. Wie in Punkt 4.4 erwähnt, lassen sich hier Unterschiede in Bezug auf die Empfindlichkeit der Monozyten auf die drei Medikamente erahnen.

Die verhältnismäßig kleine Kohorte stellt eine Limitation dieser Arbeit dar. Insgesamt wurden 19 Mutter/Kind-Paare sowie 20 adulte Proben untersucht. Weitere Studien mit größerer Kohorte wären notwendig, um eine repräsentative Aussage über die hier bereits gewonnenen Ergebnisse treffen zu können.

Betamethason, Fenoterol und Indometacin werden bei drohender Frühgeburt eingesetzt. In dieser Studie wurde jedoch ausschließlich das Blut reifgeborener Kinder untersucht. In diesem Zusammenhang wäre es lohnend, in zukünftiger Forschung den Fokus auf frühgeburtliche neonatale Monozyten zu legen, da es nahe liegt, dass das neonatale Immunsystem frühgeburtlicher Kinder noch fragiler ist und sich dementsprechend von dem reifgeborener Kinder unterscheidet.

Bezüglich der Untersuchungsergebnisse ist zudem einschränkend auf die Tatsache hinzuweisen, dass die Experimente *in vitro* durchgeführt wurden. Vergleichende *in vivo*-Studien wären wünschenswert.

7 Anhang

7.1 Oberflächenmarker ohne signifikante Ergebnisse

7.1.1 Neonatale Monozyten

Abbildung 11 Neonatale Monozyten nicht signifikant

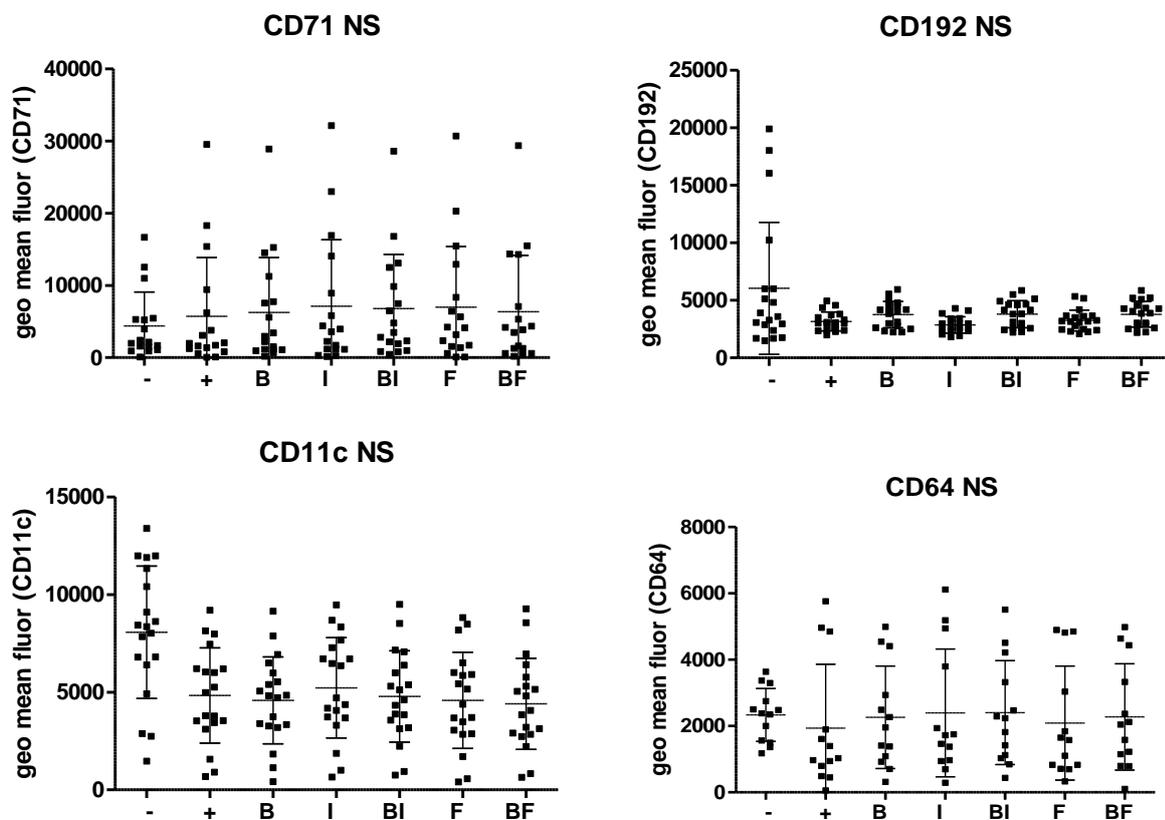


Abbildung 11 stellt die Expression der Oberflächenmarker neonataler Monozyten in Abhängigkeit der zugegebenen Medikamente Bethametason (B), Indometacin (I) und Fenoterol (F) und *E. coli* (+) dar. Alle Zellen wurden mit *E. coli* stimuliert mit Ausnahme der Negativkontrolle (-). Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Posttest. (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$)

7.1.2 Maternale Monozyten

Abbildung 12 Maternale Monozyten nicht signifikant

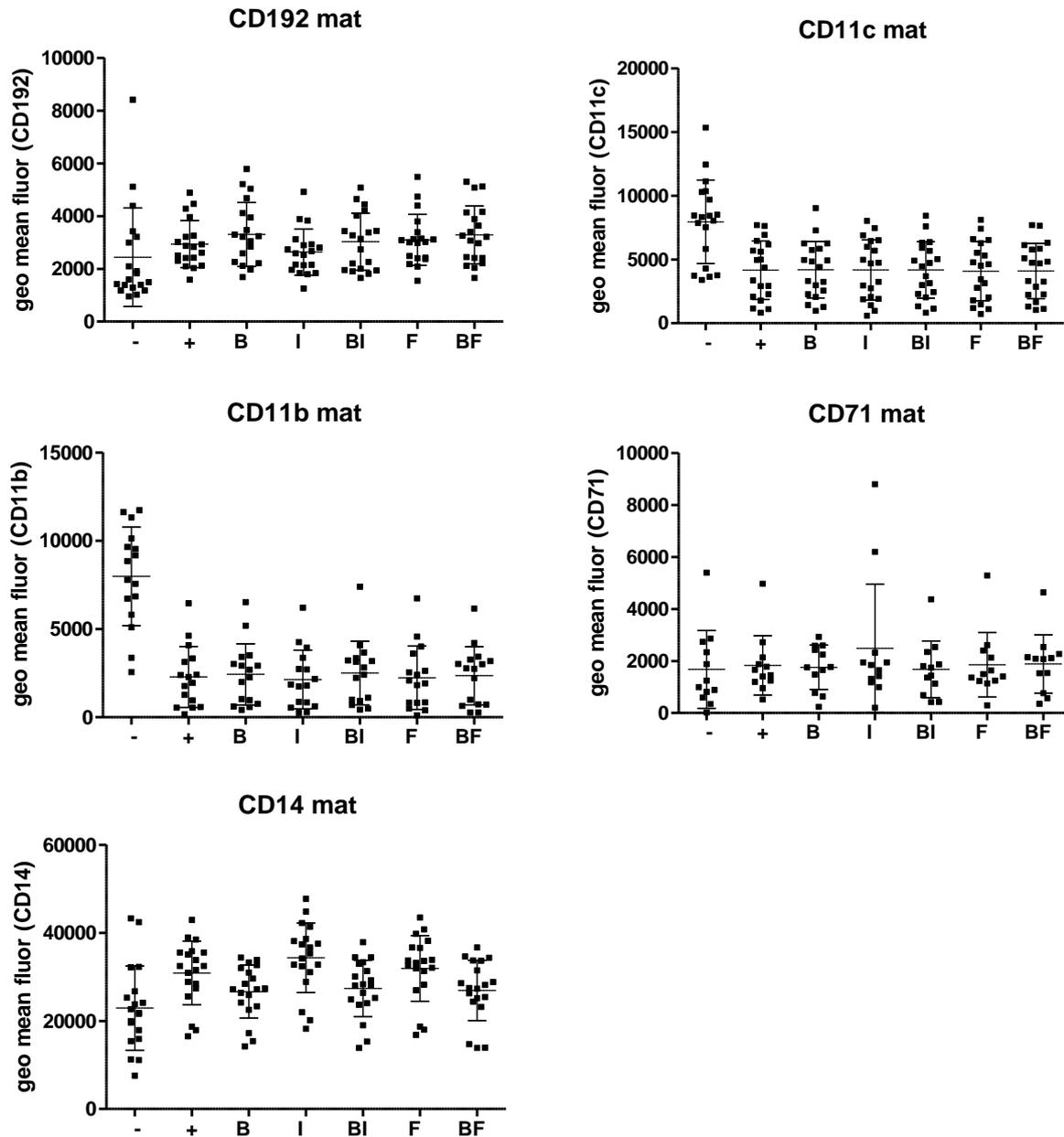


Abbildung 12 stellt die Expression der Oberflächenmarker maternaler Monozyten in Abhängigkeit der zugegebenen Medikamente Bethametason (B), Indometacin (I) und Fenoterol (F) und *E. coli* (+) dar. Alle Zellen wurden mit *E. coli* stimuliert mit Ausnahme der Negativkontrolle (-). Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Posttest. (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$)

7.1.3 Adulte Monozyten

Abbildung 13 Adulte Monozyten nicht signifikant

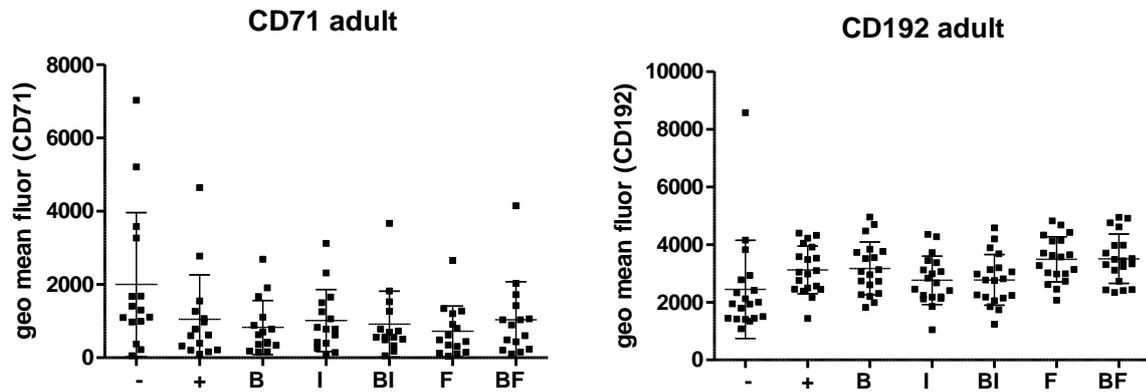


Abbildung 13 stellt die Expression der Oberflächenmarker adulter Monozyten in Abhängigkeit der zugegebenen Medikamente Bethametason (B), Indometacin (I) und Fenoterol (F) und *E. coli* (+) dar. Alle Zellen wurden mit *E.coli* stimuliert mit Ausnahme der Negativkontrolle (-). Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Posttest. (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$)

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der Neonaten und der korrespondierenden Mütter.....	11
Tabelle 2: Liste der Kontrollgruppe (adult).....	12
Tabelle 3: Reagenzien	13
Tabelle 4: Puffer und Medien	13
Tabelle 5: Medikamente	14
Tabelle 6: Aktivierung 4.....	14
Tabelle 7: Aktivierung 5.....	15
Tabelle 8: Reaktionskits	15
Tabelle 9: Geräte	15
Tabelle 10: Verbrauchsmaterial	16
Tabelle 11: Software.....	17
Tabelle 12: Verdünnung der Medikamente und des Lysats für die Titration.....	21
Tabelle 13: Pipettierschema für den Stimulationsversuch.....	22
Tabelle 14: Mastermix Färbung 1	22
Tabelle 15: Mastermix Färbung 2	23
Tabelle 16: Verdünnungsreihe Standard	25

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Dichtegradient.....	20
Abbildung 2: Probe zur Analyse durch die Durchflusszytometrie	23
Abbildung 3: Sandwich ELISA	26
Abbildung 4: Oberflächenmarker neonataler Monozyten	28
Abbildung 5: Oberflächenmarker maternaler Monozyten.....	31
Abbildung 6: CD32 adult.....	33
Abbildung 7: Oberflächenmarker adulter Monozyten	34
Abbildung 8 Ausschüttung Zytokin IL-6	36
Abbildung 9 Ausschüttung Zytokin IL-10.....	37
Abbildung 10 Ausschüttung Zytokin TNF- α	38
Abbildung 11 Neonatale Monozyten nicht signifikant.....	53
Abbildung 12 Maternale Monozyten nicht signifikant.....	54
Abbildung 13 Adulte Monozyten nicht signifikant.....	55

8 Literaturverzeichnis

1. Medzhitov R, Janeway C. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol.* 2000;8(10):452–6.
2. Yan SR, Qing G, Byers DM, Stadnyk AW, Al-Hertani W, Bortolussi R. Role of MyD88 in diminished tumor necrosis factor alpha production by newborn mononuclear cells in response to lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 2004;72(3):1223–9.
3. Levy O, Zarembek KA, Roy RM, Cywes C, Godowski PJ, Wessels MR. Selective impairment of TLR-mediated innate immunity in human newborns: Neonatal blood plasma reduces monocyte TNF-alpha induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharide, and imiquimod, but preserves the response to R-848. *J Immunol.* 2004;173(7):4627–34.
4. Langrish CL, Buddle JC, Thrasher AJ, Goldblatt D. Neonatal dendritic cells are intrinsically biased against Th-1 immune responses. *Clin Exp Immunol.* 2002;128(1):118–23.
5. Wit D de, Tonon S, Olislagers V, Goriely S, Boutriaux M, Goldman M, Willems F. Impaired responses to toll-like receptor 4 and toll-like receptor 3 ligands in human cord blood. *Journal of Autoimmunity.* 2003;21(3):277–81. doi:10.1016/j.jaut.2003.08.003
6. Melvan JN, Bagby GJ, Welsh DA, Nelson S, Zhang P. Neonatal sepsis and neutrophil insufficiencies. *Int Rev Immunol.* 2010;29(3):315–48. doi:10.3109/08830181003792803
7. Erdman SH, Christensen RD, Bradley PP, Rothstein G. Supply and release of storage neutrophils. A developmental study. *Biol Neonate.* 1982;41(3-4):132–7. doi:10.1159/000241541
8. Anderson DC, Abbassi O, Kishimoto TK, Koenig JM, McIntire LV, Smith CW. Diminished lectin-, epidermal growth factor-, complement binding domain-cell adhesion molecule-1 on neonatal neutrophils underlies their impaired CD18-independent adhesion to endothelial cells in vitro. *J Immunol.* 1991;146(10):3372–9.
9. Rebuck N, Gibson A, Finn A. Neutrophil adhesion molecules in term and premature infants: Normal or enhanced leucocyte integrins but defective L-selectin expression and shedding. *Clin Exp Immunol.* 1995;101(1):183–9.
10. Mariscalco MM, Tchamitchi MH, Smith CW. P-Selectin support of neonatal neutrophil adherence under flow: Contribution of L-selectin, LFA-1, and ligand(s) for P-selectin. *Blood.* 1998;91(12):4776–85.
11. Weinberger B, Laskin DL, Mariano TM, Sunil VR, DeCoste CJ, Heck DE, Gardner CR, Laskin JD. Mechanisms underlying reduced responsiveness of neonatal neutrophils to distinct chemoattractants. *J Leukoc Biol.* 2001;70(6):969–76.
12. Miller ME. Phagocyte function in the neonate: Selected aspects. *Pediatrics.* 1979;64(5 Pt 2 Suppl):709–12.
13. Newman KC, Riley EM. Whatever turns you on: Accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(4):279–91. doi:10.1038/nri2057
14. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol.* 2008;9(5):503–10. doi:10.1038/ni1582
15. Dalle J-H, Menezes J, Wagner E, Blagdon M, Champagne J, Champagne MA, Duval M. Characterization of cord blood natural killer cells: Implications for transplantation and neonatal infections. *Pediatr Res.* 2005;57(5 Pt 1):649–55. doi:10.1203/01.PDR.0000156501.55431.20

16. Le Garff-Tavernier M, Béziat V, Decocq J, Siguret V, Gandjbakhch F, Pautas E, Debré P, Merle-Beral H, Vieillard V. Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell*. 2010;9(4):527–35. doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00584.x
17. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996;383(6603):787–93. doi:10.1038/383787a0
18. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005;6(11):1123–32. doi:10.1038/ni1254
19. Hilkens CM, Vermeulen H, van Neerven RJ, Snijdwint FG, Wierenga EA, Kapsenberg ML. Differential modulation of T helper type 1 (Th1) and T helper type 2 (Th2) cytokine secretion by prostaglandin E2 critically depends on interleukin-2. *Eur J Immunol*. 1995;25(1):59–63. doi:10.1002/eji.1830250112
20. Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, Parronchi P, Manetti R, Annunziato F, Livi C. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol*. 1995;155(1):128–33.
21. Roth I, Corry DB, Locksley RM, Abrams JS, Litton MJ, Fisher SJ. Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *J Exp Med*. 1996;184(2):539–48.
22. Webster RB, Rodriguez Y, Klimecki WT, Vercelli D. The human IL-13 locus in neonatal CD4+ T cells is refractory to the acquisition of a repressive chromatin architecture. *J Biol Chem*. 2007;282(1):700–9. doi:10.1074/jbc.M609501200
23. White GP, Watt PM, Holt BJ, Holt PG. Differential patterns of methylation of the IFN-gamma promoter at CpG and non-CpG sites underlie differences in IFN-gamma gene expression between human neonatal and adult CD45RO- T cells. *J Immunol*. 2002;168(6):2820–7.
24. Curtis MM, Way SS. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology*. 2009;126(2):177–85. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.03017.x
25. Roock S de, Stoppelenburg AJ, Scholman R, Hoeks SBEA, Meerding J, Prakken BJ, Boes M. Defective TH17 development in human neonatal T cells involves reduced RORC2 mRNA content. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(3):754-756.e3. doi:10.1016/j.jaci.2013.04.014
26. Burt TD. Fetal regulatory T cells and peripheral immune tolerance in utero: Implications for development and disease. *Am J Reprod Immunol*. 2013;69(4):346–58. doi:10.1111/aji.12083
27. Michaëlsson J, Mold JE, McCune JM, Nixon DF. Regulation of T cell responses in the developing human fetus. *J Immunol*. 2006;176(10):5741–8.
28. Mold JE, Michaëlsson J, Burt TD, Muench MO, Beckerman KP, Busch MP, Lee T-H, Nixon DF, McCune JM. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science*. 2008;322(5907):1562–5. doi:10.1126/science.1164511
29. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol*. 2011;29:621–63. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101400

30. Debock I, Jaworski K, Chadlaoui H, Delbauve S, Passon N, Twyffels L, Leo O, Flamand V. Neonatal follicular Th cell responses are impaired and modulated by IL-4. *J Immunol*. 2013;191(3):1231–9. doi:10.4049/jimmunol.1203288
31. Basha S, Surendran N, Pichichero M. Immune responses in neonates. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014;10(9):1171–84. doi:10.1586/1744666X.2014.942288
32. Varga G, Foell D. Anti-inflammatory monocytes-interplay of innate and adaptive immunity. *Mol Cell Pediatr*. 2018;5(1):5. doi:10.1186/s40348-018-0083-4
33. Pavelka M, Roth J. Monocyte: In: *Functional Ultrastructure*. Vienna: Springer; 2010.
34. Lüllmann-Rauch R, Paulsen F. *Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen*. 4th ed. Stuttgart: Thieme; 2012. 680 p. ger.
35. Ginhoux F, Guilliams M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*. 2016;44(3):439–49. doi:10.1016/j.immuni.2016.02.024
36. Mildner A, Jung S. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity*. 2014;40(5):642–56. doi:10.1016/j.immuni.2014.04.016
37. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(12):953–64. doi:10.1038/nri1733
38. Guilliams M, Mildner A, Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity*. 2018;49(4):595–613. doi:10.1016/j.immuni.2018.10.005
39. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJM, Liu Y-J, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010;116(16):e74-80. doi:10.1182/blood-2010-02-258558
40. Sampath P, Moideen K, Ranganathan UD, Bethunaickan R. Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection. *Front Immunol*. 2018;9:1726. doi:10.3389/fimmu.2018.01726
41. Wong KL, Tai JJ-Y, Wong W-C, Han H, Sem X, Yeap W-H, Kourilsky P, Wong S-C. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*. 2011;118(5):e16-31. doi:10.1182/blood-2010-12-326355
42. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang S-Y, Senechal B, Puel A, Biswas SK, Moshous D, Picard C, Jais J-P, D'Cruz D, Casanova J-L, Trouillet C, Geissmann F. Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity*. 2010;33(3):375–86. doi:10.1016/j.immuni.2010.08.012
43. WHO: Recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths. Modifications recommended by FIGO as amended October 14, 1976. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1977;56(3):247–53.
44. World Health Organization. Preterm birth [Internet]. 19.02.2018. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>
45. Chawanpaiboon S, Vogel JP, Moller A-B, Lumbiganon P, Petzold M, Hogan D, Landoulsi S, Jampathong N, Kongwattanakul K, Laopaiboon M, Lewis C, Rattanakanokchai S, Teng DN, Thinkhamrop J, Watananirun K, Zhang J, Zhou W, Gülmezoglu AM. Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: A systematic review and modelling analysis. *The Lancet Global Health*. 2019;7(1):e37-e46. doi:10.1016/S2214-109X(18)30451-0

46. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 2008;371(9606):75–84. doi:10.1016/S0140-6736(08)60074-4
47. Gladstone M, White S, Kafulafula G, Neilson JP, van den Broek N. Post-neonatal mortality, morbidity, and developmental outcome after ultrasound-dated preterm birth in rural Malawi: A community-based cohort study. *PLoS Med*. 2011;8(11):e1001121. doi:10.1371/journal.pmed.1001121
48. Liu L, Oza S, Hogan D, Chu Y, Perin J, Zhu J, Lawn JE, Cousens S, Mathers C, Black RE. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: An updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet*. 2016;388(10063):3027–35. doi:10.1016/S0140-6736(16)31593-8
49. Oza S, Lawn JE, Hogan DR, Mathers C, Cousens SN. Neonatal cause-of-death estimates for the early and late neonatal periods for 194 countries: 2000-2013. *Bull World Health Organ*. 2015;93(1):19–28. doi:10.2471/BLT.14.139790
50. Shane AL, Sánchez PJ, Stoll BJ. Neonatal sepsis. *The Lancet*. 2017;390(10104):1770–80. doi:10.1016/S0140-6736(17)31002-4
51. World Health Organization. ICD-10 International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems: 10th Revision Volume 2 Instruction manual. 2010.
52. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Lemons JA, Donovan EF, Stark AR, Tyson JE, Oh W, Bauer CR, Korones SB, Shankaran S, Laptook AR, Stevenson DK, Papile L-A, Poole WK. Changes in pathogens causing early-onset sepsis in very-low-birth-weight infants. *N Engl J Med*. 2002;347(4):240–7. doi:10.1056/NEJMoa012657
53. Puopolo KM, Draper D, Wi S, Newman TB, Zupancic J, Lieberman E, Smith M, Escobar GJ. Estimating the probability of neonatal early-onset infection on the basis of maternal risk factors. *Pediatrics*. 2011;128(5):e1155-63. doi:10.1542/peds.2010-3464
54. Hornik CP, Fort P, Clark RH, Watt K, Benjamin DK, Smith PB, Manzoni P, Jacqz-Aigrain E, Kaguelidou F, Cohen-Wolkowicz M. Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units. *Early Hum Dev*. 2012;88 Suppl 2S69-74. doi:10.1016/S0378-3782(12)70019-1
55. Friedman S, Shah V, Ohlsson A, Matlow AG. Neonatal escherichia coli infections: Concerns regarding resistance to current therapy. *Acta Paediatr*. 2000;89(6):686–9. doi:10.1080/080352500750044007
56. Jiang J-H, Chiu N-C, Huang F-Y, Kao H-A, Hsu C-H, Hung H-Y, Chang J-H, Peng C-C. Neonatal sepsis in the neonatal intensive care unit: Characteristics of early versus late onset. *J Microbiol Immunol Infect*. 2004;37(5):301–6.
57. Shah BA, Padbury JF. Neonatal sepsis: An old problem with new insights. *Virulence*. 2014;5(1):170–8. doi:10.4161/viru.26906
58. Mayor-Lynn K, González-Quintero VH, O'Sullivan MJ, Hartstein AI, Roger S, Tamayo M. Comparison of early-onset neonatal sepsis caused by *Escherichia coli* and group B *Streptococcus*. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;192(5):1437–9. doi:10.1016/j.ajog.2004.12.031
59. Stoll BJ, Hansen NI, Sánchez PJ, Faix RG, Poindexter BB, van Meurs KP, Bizzarro MJ, Goldberg RN, Frantz ID, Hale EC, Shankaran S, Kennedy K, Carlo WA, Watterberg KL, Bell EF, Walsh MC, Schibler K, Laptook AR, Shane AL, Schrag SJ, Das A, Higgins RD. Early onset neonatal sepsis: The burden of group B *Streptococcal* and *E. coli* disease continues. *Pediatrics*. 2011;127(5):817–26. doi:10.1542/peds.2010-2217

60. Jobe A. Respiratory distress syndrome--new therapeutic approaches to a complex pathophysiology. *Adv Pediatr.* 1983;3093–130.
61. Halliday HL. Evidence-based neonatal care. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology.* 2005;19(1):155–66. doi:10.1016/j.bpobgyn.2004.10.014
62. Pape H-C, Klinker R, Brenner B, Silbernagl S, editors. *Physiologie.* 7th ed. s.l.: Georg Thieme Verlag KG; 2014. 1024 p. ger.
63. Stauber M, Weyerstahl T. *Gynäkologie und Geburtshilfe.* 3rd ed. Stuttgart: Thieme; 2007. 785 p. (Duale Reihe). ger.
64. Prevention and therapy of preterm labour. Guideline of DGGG, OEGGG and SGGG (S2k-Level, AWMF Registry No. 015/025, February 2019). <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/015-025.html>.
65. BUNT JEHAN, CARNIELLI VP, SEIDNER SR, IKEGAMI M, DARCOS WATTIMENA JL, SAUER PJJ, JOBE AH, ZIMMERMANN LJIUC. Metabolism of Endogenous Surfactant in Premature Baboons and Effect of Prenatal Corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160(5):1481–5. doi:10.1164/ajrccm.160.5.9808070
66. WILLET KE, JOBE AH, IKEGAMI M, NEWNHAM J, BRENNAN ASD, SLY PD. Antenatal Endotoxin and Glucocorticoid Effects on Lung Morphometry in Preterm Lambs. *Pediatr Res.* 2000;48(6):782–8. doi:10.1203/00006450-200012000-00014
67. Liggins GC. Premature delivery of foetal lambs infused with glucocorticoids. *J Endocrinol.* 1969;45(4):515–23.
68. Liggins GC, Howie RN. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics.* 1972;50(4):515–25.
69. Amorim MM, Santos LC, Faúndes A. Corticosteroid therapy for prevention of respiratory distress syndrome in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;180(5):1283–8.
70. Qublan HS, Malkawi HY, Hiasat MS, Hindawi IM, Al-Taani MI, Abu-Khait SA, Al-Maaitah JF. The effect of antenatal corticosteroid therapy on pregnancies complicated by premature rupture of membranes. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2001;28(3):183–6.
71. Roberts D, Brown J, Medley N, Dalziel SR. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;3CD004454. doi:10.1002/14651858.CD004454.pub3.
72. Padbury JF, Ervin MG, Polk DH. Extrapulmonary effects of antenatally administered steroids. *J Pediatr.* 1996;128(2):167–72.
73. Haas DM, Imperiale TF, Kirkpatrick PR, Klein RW, Zollinger TW, Golichowski AM. Tocolytic therapy: A meta-analysis and decision analysis. *Obstet Gynecol.* 2009;113(3):585–94. doi:10.1097/AOG.0b013e318199924a
74. Huszar G, Roberts JM. Biochemistry and pharmacology of the myometrium and labor: Regulation at the cellular and molecular levels. *Am J Obstet Gynecol.* 1982;142(2):225–37. doi:10.1016/s0002-9378(16)32341-9
75. Karow T, Lang-Roth R. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis* 2020. 28th ed.; 2019. 1374 Seiten.
76. Dodd JM, Crowther CA, Middleton P. Oral betamimetics for maintenance therapy after threatened preterm labour. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;12CD003927. doi:10.1002/14651858.CD003927.pub3

77. Dr. Holger J. Gellermann. Kurzwirksame Beta-Agonisten für geburtshilfliche Indikationen - einschließlich Partusisten® (Fenoterol): Wichtige Einschränkungen zur Anwendung. Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG. 2013.
78. Heus R de, Mol BW, Erwich J-JHM, van Geijn HP, Gyselaers WJ, Hanssens M, Härmark L, van Holsbeke CD, Duvekot JJ, Schobben FFAM, Wolf H, Visser GHA. Adverse drug reactions to tocolytic treatment for preterm labour: Prospective cohort study. *BMJ*. 2009;338b744. doi:10.1136/bmj.b744
79. Neilson JP, West HM, Dowswell T. Betamimetics for inhibiting preterm labour. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;(2):CD004352. doi:10.1002/14651858.CD004352.pub3
80. Vogel JP, Oladapo OT, Manu A, Gulmezoglu AM, Bahl R. New WHO recommendations to improve the outcomes of preterm birth. *The Lancet.Global health*. 2015;3(10):589.
81. Haas DM, Benjamin T, Sawyer R, Quinney SK. Short-term tocolytics for preterm delivery - current perspectives. *Int J Womens Health*. 2014;6343–9. doi:10.2147/IJWH.S44048
82. Haas DM, Caldwell DM, Kirkpatrick P, McIntosh JJ, Welton NJ. Tocolytic therapy for preterm delivery: Systematic review and network meta-analysis. *BMJ*. 2012;345e6226. doi:10.1136/bmj.e6226
83. Hammers AL, Sanchez-Ramos L, Kaunitz AM. Antenatal exposure to indomethacin increases the risk of severe intraventricular hemorrhage, necrotizing enterocolitis, and periventricular leukomalacia: A systematic review with metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;212(4):505.e1-13. doi:10.1016/j.ajog.2014.10.1091
84. Reinebrant HE, Pileggi-Castro C, Romero CLT, Dos Santos RAN, Kumar S, Souza JP, Flenady V. Cyclo-oxygenase (COX) inhibitors for treating preterm labour. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;(6):CD001992. doi:10.1002/14651858.CD001992.pub3
85. Nassar AH, Aoun J, Usta IM. Calcium channel blockers for the management of preterm birth: A review. *Am J Perinatol*. 2011;28(1):57–66. doi:10.1055/s-0030-1262512
86. Elliott WJ, Ram CVS. Calcium channel blockers. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2011;13(9):687–9. doi:10.1111/j.1751-7176.2011.00513.x
87. Andrade SE, Raebel MA, Brown J, Lane K, Livingston J, Boudreau D, Rolnick SJ, Roblin D, Smith DH, Dal Pan GJ, Scott PE, Platt R. Outpatient use of cardiovascular drugs during pregnancy. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2008;17(3):240–7. doi:10.1002/pds.1550
88. Karow L-R, editor. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*; 2012.
89. Cunningham FG. *Williams obstetrics*. 24th ed. New York: McGraw-Hill Education Medical; 2014. 1358 p. eng.
90. Romero R, Sibai BM, Sanchez-Ramos L, Valenzuela GJ, Veille JC, Tabor B, Perry KG, Varner M, Goodwin TM, Lane R, Smith J, Shangold G, Creasy GW. An oxytocin receptor antagonist (atosiban) in the treatment of preterm labor: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial with tocolytic rescue. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;182(5):1173–83. doi:10.1067/mob.2000.95834
91. Effectiveness and safety of the oxytocin antagonist atosiban versus beta-adrenergic agonists in the treatment of preterm labour. The Worldwide Atosiban versus Beta-agonists Study Group. *BJOG*. 2001;108(2):133–42.

92. van Vliet EOG, Nijman TAJ, Schuit E, Heida KY, Opmeer BC, Kok M, Gyselaers W, Porath MM, Woiski M, Bax CJ, Bloemenkamp KWM, Scheepers HCJ, Jacquemyn Y, van Beek E, Duvekot JJ, Franssen MTM, Papatsonis DN, Kok JH, van der Post JAM, Franx A, Mol BW, Oudijk MA. Nifedipine versus atosiban for threatened preterm birth (APOSTEL III): A multicentre, randomised controlled trial. *The Lancet*. 2016;387(10033):2117–24. doi:10.1016/S0140-6736(16)00548-1
93. Murphy Goodwin T, Millar L, North L, Abrams LS, Weglein RC, Holland ML. The pharmacokinetics of the oxytocin antagonist atosiban in pregnant women with preterm uterine contractions. *Am J Obstet Gynecol*. 1995;173(3):913–7. doi:10.1016/0002-9378(95)90365-8
94. Chwalisz K, Garfield RE. Role of nitric oxide in the uterus and cervix: Implications for the management of labor. *J Perinat Med*. 1998;26(6):448–57. doi:10.1515/jpme.1998.26.6.448
95. Yallampalli C, Izumi H, Byam-Smith M, Garfield RE. An L-arginine–nitric oxide–cyclic guanosine monophosphate system exists in the uterus and inhibits contractility during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1994;170(1):175–85. doi:10.1016/s0002-9378(94)70405-8
96. Sharma N, Rani S, Huria A, Chawla D. Oral nifedipine versus nitroglycerine patch for tocolysis in preterm labour. *Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol*. 2018;8(1):174. doi:10.18203/2320-1770.ijrcog20185418
97. Crowther CA, Brown J, McKinlay CJD, Middleton P. Magnesium sulphate for preventing preterm birth in threatened preterm labour. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;(8):CD001060. doi:10.1002/14651858.CD001060.pub2
98. Sentilhes L, Sénat M-V, Ancel P-Y, Azria E, Benoist G, Blanc J, Brabant G, Bretelle F, Brun S, Doret M, Ducroux-Schouwey C, Evrard A, Kayem G, Maisonneuve E, Marcellin L, Marret S, Mottet N, Paysant S, Riethmuller D, Rozenberg P, Schmitz T, Torchin H, Langer B. Prevention of spontaneous preterm birth: Guidelines for clinical practice from the French College of Gynaecologists and Obstetricians (CNGOF). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2017;210217–24. doi:10.1016/j.ejogrb.2016.12.035
99. Mutschler E, Geisslinger G, Menzel S. Mutschler Arzneimittelwirkungen: Pharmakologie - Klinische Pharmakologie - Toxikologie. 11th ed.; 2020. XXV, 1295 Seiten.
100. Wei L, MacDonald TM, Walker BR. Taking glucocorticoids by prescription is associated with subsequent cardiovascular disease. *Ann Intern Med*. 2004;141(10):764–70. doi:10.7326/0003-4819-141-10-200411160-00007
101. Vries F de, Pouwels S, Lammers JWJ, Leufkens HGM, Bracke M, Cooper C, van Staa TP. Use of inhaled and oral glucocorticoids, severity of inflammatory disease and risk of hip/femur fracture: A population-based case-control study. *J Intern Med*. 2007;261(2):170–7. doi:10.1111/j.1365-2796.2006.01754.x
102. Vegiopoulos A, Herzig S. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Mol Cell Endocrinol*. 2007;275(1-2):43–61. doi:10.1016/j.mce.2007.05.015
103. Shoenfeld Y, Gurewich Y, Gallant LA, Pinkhas J. Prednisone-induced leukocytosis. *The American Journal of Medicine*. 1981;71(5):773–8. doi:10.1016/0002-9343(81)90363-6
104. Waage A, Slupphaug G, Shalaby R. Glucocorticoids inhibit the production of IL6 from monocytes, endothelial cells and fibroblasts. *Eur J Immunol*. 1990;20(11):2439–43. doi:10.1002/eji.1830201112

105. Cain DW, Cidlowski JA. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(4):233–47. doi:10.1038/nri.2017.1
106. Reproductive and Developmental Toxicology: Elsevier; 2017.
107. Hughes IA CWS. The adrenal cortex. Gluckman PD, Heymann MA, eds. *Pediatrics, perinatology, the scientific basis*; 500-514;1996.
108. Anderson AB, Gennser G, Jeremy JY, Ohrlander S, Sayers L, Turnbull AC. Placental transfer and metabolism of betamethasone in human pregnancy. *Obstet Gynecol* 49:471474. 1977.
109. Ballard PL, Gluckman PD, Liggins GC, Kaplan SL, Grumbach MM. Steroid and Growth Hormone Levels in Premature Infants After Prenatal Betamethasone Therapy to Prevent Respiratory Distress Syndrome. *Pediatr Res*. 1980;14(2):122–7. doi:10.1203/00006450-198002000-00011
110. Parker CR, Atkinson MW, Owen J, Andrews WW. Dynamics of the fetal adrenal, cholesterol, and apolipoprotein B responses to antenatal betamethasone therapy. *Am J Obstet Gynecol*. 1996;174(2):562–5. doi:10.1016/S0002-9378(96)70428-3
111. Audette MC, Challis JRG, Jones RL, Sibley CP, Matthews SG. Synthetic glucocorticoid reduces human placental system a transport in women treated with antenatal therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(11):E2226-33. doi:10.1210/jc.2014-2157
112. Benediktsson R, Lindsay RS, Noble J, Seckl JR, Edwards CRW. Glucocorticoid exposure in utero: New model for adult hypertension. *The Lancet*. 1993;341(8841):339–41. doi:10.1016/0140-6736(93)90138-7
113. Davis EP, Waffarn F, Uy C, Hobel CJ, Glynn LM, Sandman CA. Effect of prenatal glucocorticoid treatment on size at birth among infants born at term gestation. *J Perinatol*. 2009;29(11):731–7. doi:10.1038/jp.2009.85
114. French NP, Hagan R, Evans SF, Godfrey M, Newnham JP. Repeated antenatal corticosteroids: Size at birth and subsequent development. *Am J Obstet Gynecol*. 1999;180(1):114–21. doi:10.1016/s0002-9378(99)70160-2
115. Braun T, Weichert A, Gil HC, Sloboda DM, Tutschek B, Harder T, Dudenhausen JW, Plagemann A, Henrich W. Fetal and neonatal outcomes after term and preterm delivery following betamethasone administration in twin pregnancies. *Int J Gynaecol Obstet*. 2016;134(3):329–35. doi:10.1016/j.ijgo.2016.02.016
116. Nyirenda MJ, Lindsay RS, Kenyon CJ, Burchell A, Seckl JR. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *J Clin Invest*. 1998;101(10):2174–81. doi:10.1172/JCI1567
117. Sifianou P, Thanou V, Karga H. Metabolic and hormonal effects of antenatal betamethasone after 35 weeks of gestation. *J Pediatr Pharmacol Ther*. 2015;20(2):138–43. doi:10.5863/1551-6776-20.2.138
118. French NP, Hagan R, Evans S, Godfrey M, Newnham JP. Repeated Antenatal Corticosteroids (CS): Behaviour Outcomes in a Regional Population of Very Preterm (VP,<33w) Infants • 1252. *Pediatr Res*. 1998;43:214. doi:10.1203/00006450-199804001-01273
119. Asztalos E, Willan A, Murphy K, Matthews S, Ohlsson A, Saigal S, Armson A, Kelly E, Delisle M-F, Gafni A, Lee S, Sananes R, Rovet J, Guselle P, Amankwah K. Association between gestational age at birth, antenatal corticosteroids, and outcomes at 5 years: Multiple courses of antenatal corticosteroids for preterm birth study at 5 years

- of age (MACS-5). *BMC Pregnancy Childbirth*. 2014;14(1):2143. doi:10.1186/1471-2393-14-272
120. Huang W. Effect of corticosteroids on brain growth in fetal sheep. *Obstet Gynecol*. 1999;94(2):213–8. doi:10.1016/s0029-7844(99)00265-3
 121. Huang WL, Harper CG, Evans SF, Newnham JP, Dunlop SA. Repeated prenatal corticosteroid administration delays astrocyte and capillary tight junction maturation in fetal sheep. *Int. j. dev. neurosci*. 2001;19(5):487–93. doi:10.1016/S0736-5748(01)00035-1
 122. Antonow-Schlorke I, Schwab M, Li C, Nathanielsz PW. Glucocorticoid exposure at the dose used clinically alters cytoskeletal proteins and presynaptic terminals in the fetal baboon brain. *J Physiol (Lond)*. 2003;547(Pt 1):117–23. doi:10.1113/jphysiol.2002.025700
 123. Kelly BA, Lewandowski AJ, Worton SA, Davis EF, Lazdam M, Francis J, Neubauer S, Lucas A, Singhal A, Leeson P. Antenatal glucocorticoid exposure and long-term alterations in aortic function and glucose metabolism. *Pediatrics*. 2012;129(5):e1282-90. doi:10.1542/peds.2011-3175
 124. Doyle LW, Ford GW, Davis NM, Callanan C. Antenatal corticosteroid therapy and blood pressure at 14 years of age in preterm children. *Clin Sci (Lond)*. 2000;98(2):137–42.
 125. Schäffer L, Luzi F, Burkhardt T, Rauh M, Beinder E. Antenatal Betamethasone Administration Alters Stress Physiology in Healthy Neonates. *Obstet Gynecol*. 2009;113(5):1082–8. doi:10.1097/AOG.0b013e3181a1f0e6
 126. Davis EP, Townsend EL, Gunnar MR, Georgieff MK, Guiang SF, Cifuentes RF, Lussky RC. Effects of prenatal betamethasone exposure on regulation of stress physiology in healthy premature infants. *Psychoneuroendocrinology*. 2004;29(8):1028–36. doi:10.1016/j.psyneuen.2003.10.005
 127. Davis EP, Waffarn F, Sandman CA. Prenatal treatment with glucocorticoids sensitizes the hpa axis response to stress among full-term infants. *Dev Psychobiol*. 2011;53(2):175–83. doi:10.1002/dev.20510
 128. Davis EP, Townsend EL, Gunnar MR, Guiang SF, Lussky RC, Cifuentes RF, Georgieff MK. Antenatal betamethasone treatment has a persisting influence on infant HPA axis regulation. *J Perinatol*. 2006;26(3):147–53. doi:10.1038/sj.jp.7211447
 129. Hong JY, Lim J, Carvalho F, Cho JY, Vaidyanathan B, Yu S, Annicelli C, Ip WKE, Medzhitov R. Long-Term Programming of CD8 T Cell Immunity by Perinatal Exposure to Glucocorticoids. *Cell*. 2020;180(5):847-861.e15. doi:10.1016/j.cell.2020.02.018
 130. Ehrchen JM, Roth J, Barczyk-Kahlert K. More Than Suppression: Glucocorticoid Action on Monocytes and Macrophages. *Front Immunol*. 2019;10:2028. doi:10.3389/fimmu.2019.02028
 131. Kramer BW, IKEGAMI M, Moss TJM, Nitsos I, Newnham JP, JOBE AH. Antenatal betamethasone changes cord blood monocyte responses to endotoxin in preterm lambs. *Pediatr Res*. 2004;55(5):764–8. doi:10.1203/01.PDR.0000120678.72485.19
 132. Schulz D, Schlieckau F, Fill Malfertheiner S, Reuschel E, Seelbach-Göbel B, Ernst W. Effect of betamethasone, indomethacin and fenoterol on neonatal and maternal mononuclear cells stimulated with *Escherichia coli*. *Cytokine*. 2019;116:97–105. doi:10.1016/j.cyto.2018.12.017

133. Palojärvi A, Andersson S, Turpeinen U, Janér C, Petäjä J. Antenatal betamethasone associates with transient immunodepression in very low birth weight infants. *Neonatology*. 2013;104(4):275–82. doi:10.1159/000353964
134. Kavelaars A, van der Pompe G, Bakker JM, van Hasselt PM, Cats B, Visser GH, Heijnen CJ. Altered immune function in human newborns after prenatal administration of betamethasone: Enhanced natural killer cell activity and decreased T cell proliferation in cord blood. *Pediatr Res*. 1999;45(3):306–12. doi:10.1203/00006450-199903000-00003
135. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginat J. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21(5):331–44. doi:10.1016/j.cytogfr.2010.09.002
136. Bessler H, Kagazanov S, Punsky I, Sirota L. Effect of dexamethasone on IL-10 and IL-12p40 production in newborns and adults. *Biol Neonate*. 2001;80(4):262–6. doi:10.1159/000047154
137. Ehrchen J, Steinmüller L, Barczyk K, Tenbrock K, Nacken W, Eisenacher M, Nordhues U, Sorg C, Sunderkötter C, Roth J. Glucocorticoids induce differentiation of a specifically activated, anti-inflammatory subtype of human monocytes. *Blood*. 2007;109(3):1265–74. doi:10.1182/blood-2006-02-001115
138. Barczyk K, Ehrchen J, Tenbrock K, Ahlmann M, Kneidl J, Viemann D, Roth J. Glucocorticoids promote survival of anti-inflammatory macrophages via stimulation of adenosine receptor A3. *Blood*. 2010;116(3):446–55. doi:10.1182/blood-2009-10-247106
139. Achuthan A, Aslam ASM, Nguyen Q, Lam P-Y, Fleetwood AJ, Frye AT, Louis C, Lee M-C, Smith JE, Cook AD, Olshansky M, Turner SJ, Hamilton JA. Glucocorticoids promote apoptosis of proinflammatory monocytes by inhibiting ERK activity. *Cell Death Dis*. 2018;9(3):267. doi:10.1038/s41419-018-0332-4
140. Wang C, Nanni L, Novakovic B, Megchelenbrink W, Kuznetsova T, Stunnenberg HG, Ceri S, Logie C. Extensive epigenomic integration of the glucocorticoid response in primary human monocytes and in vitro derived macrophages. *Scientific reports*. 2019;9(1):2772. doi:10.1038/s41598-019-39395-9
141. Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T, Kunkel D, Bienert M, Radbruch A, Burmester G-R, Lauster R, Scheffold A, Buttgereit F. Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J*. 2004;18(1):70–80. doi:10.1096/fj.03-0328com
142. Spies CM, Schaumann DHS, Berki T, Mayer K, Jakstadt M, Huscher D, Wunder C, Burmester G-R, Radbruch A, Lauster R, Scheffold A, Buttgereit F. Membrane glucocorticoid receptors are down regulated by glucocorticoids in patients with systemic lupus erythematosus and use a caveolin-1-independent expression pathway. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(9):1139–46. doi:10.1136/ard.2005.048272
143. Diepenbruck I, Much CC, Krumbholz A, Kolster M, Thieme R, Thieme D, Diepenbruck S, Solano ME, Arck PC, Tolosa E. Effect of prenatal steroid treatment on the developing immune system. *J Mol Med*. 2013;91(11):1293–302. doi:10.1007/s00109-013-1069-2
144. Jones CA, Nisenbaum R, Souza LR de, Berger H. Antenatal corticosteroid administration is associated with decreased growth of the fetal thymus: A prospective cohort study. *Journal of perinatology: official journal of the California Perinatal Association*. 2020;40(1):30–8. doi:10.1038/s41372-019-0554-z

145. Vermillion ST, Soper DE, Chasedunn-Roark J. Neonatal sepsis after betamethasone administration to patients with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;181(2):320–7.
146. Vermillion ST, Soper DE, Newman RB. Neonatal sepsis and death after multiple courses of antenatal betamethasone therapy. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;183(4):810–4. doi:10.1067/mob.2000.108838
147. Wang Y-C, Tseng H-I, Yang S-N, Lu C-C, Wu J-R, Dai Z-K, Hsu J-H, Chen H-L. Effects of antenatal corticosteroids on neonatal outcomes in very-low-birth-weight preterm newborns: A 10-year retrospective study in a medical center. *Pediatrics and neonatology.* 2012;53(3):178–83. doi:10.1016/j.pedneo.2012.04.004
148. Razaz N, Skoll A, Fahey J, Allen VM, Joseph KS. Trends in optimal, suboptimal, and questionably appropriate receipt of antenatal corticosteroid prophylaxis. *Obstet Gynecol.* 2015;125(2):288–96. doi:10.1097/AOG.0000000000000629
149. Davidson C, Monga M, Ellison D, Vidaeff A. Continuation of pregnancy after antenatal corticosteroid administration: Opportunity for rescue? *J Reprod Med.* 2010;55(1-2):14–8.
150. Vidaeff AC, Belfort MA, Steer PJ. Antenatal corticosteroids: A time for more careful scrutiny of the indications? *BJOG.* 2016;123(7):1067–9. doi:10.1111/1471-0528.13853
151. Kuk J-Y, An J-J, Cha H-H, Choi S-J, Vargas JE, Oh S-y, Roh C-R, Kim J-H. Optimal time interval between a single course of antenatal corticosteroids and delivery for reduction of respiratory distress syndrome in preterm twins. *Am J Obstet Gynecol.* 2013;209(3):256.e1-7. doi:10.1016/j.ajog.2013.06.020
152. McLaughlin KJ, Crowther CA, Walker N, Harding JE. Effects of a single course of corticosteroids given more than 7 days before birth: A systematic review. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2003;43(2):101–6. doi:10.1046/j.0004-8666.2003.00052.x
153. Jung C, Ho JT, Torpy DJ, Rogers A, Doogue M, Lewis JG, Czajko RJ, Inder WJ. A longitudinal study of plasma and urinary cortisol in pregnancy and postpartum. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(5):1533–40. doi:10.1210/jc.2010-2395
154. Ho JT, Lewis JG, O'Loughlin P, Bagley CJ, Romero R, Dekker GA, Torpy DJ. Reduced maternal corticosteroid-binding globulin and cortisol levels in pre-eclampsia and gamete recipient pregnancies. *Clinical endocrinology.* 2007;66(6):869–77. doi:10.1111/j.1365-2265.2007.02826.x
155. Schmitz T, Alberti C, Ursino M, Baud O, Aupiais C. Full versus half dose of antenatal betamethasone to prevent severe neonatal respiratory distress syndrome associated with preterm birth: Study protocol for a randomised, multicenter, double blind, placebo-controlled, non-inferiority trial (BETADOSE). *BMC Pregnancy Childbirth.* 2019;19(1):67. doi:10.1186/s12884-019-2206-x
156. Jamieson DJ, Theiler RN, Rasmussen SA. Emerging infections and pregnancy. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(11):1638–43. doi:10.3201/eid1211.060152
157. Mor G, Cardenas I. The immune system in pregnancy: A unique complexity. *Am J Reprod Immunol.* 2010;63(6):425–33. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00836.x
158. Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology.* 2004;112(1):38–43. doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01869.x

159. Szekeres-Bartho J. Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int Rev Immunol.* 2002;21(6):471–95. doi:10.1080/08830180215017
160. Gaunt G, Ramin K. Immunological tolerance of the human fetus. *Am J Perinatol.* 2001;18(6):299–312. doi:10.1055/s-2001-17861
161. Okoko BJ, Enwere G, Ota MOC. The epidemiology and consequences of maternal malaria: A review of immunological basis. *Acta Tropica.* 2003;87(2):193–205. doi:10.1016/s0001-706x(03)00097-4
162. Price ME, Fisher-Hoch SP, Craven RB, McCormick JB. A prospective study of maternal and fetal outcome in acute Lassa fever infection during pregnancy. *BMJ.* 1988;297(6648):584–7. doi:10.1136/bmj.297.6648.584
163. Mosby LG, Rasmussen SA, Jamieson DJ. 2009 pandemic influenza A (H1N1) in pregnancy: A systematic review of the literature. *Am J Obstet Gynecol.* 2011;205(1):10–8. doi:10.1016/j.ajog.2010.12.033
164. Engels G, Hierweger AM, Hoffmann J, Thieme R, Thiele S, Bertram S, Dreier C, Resa-Infante P, Jacobsen H, Thiele K, Alawi M, Indenbirken D, Grundhoff A, Siebels S, Fischer N, Stojanovska V, Muzzio D, Jensen F, Karimi K, Mittrücker H-W, Arck PC, Gabriel G. Pregnancy-Related Immune Adaptation Promotes the Emergence of Highly Virulent H1N1 Influenza Virus Strains in Allogeneically Pregnant Mice. *Cell Host Microbe.* 2017;21(3):321–33. doi:10.1016/j.chom.2017.02.020
165. Berg G, Andersson RGG, Rydén G. β -Adrenergic receptors in human myometrium during pregnancy: Changes in the number of receptors after β -mimetic treatment. *Am J Obstet Gynecol.* 1985;151(3):392–6. doi:10.1016/0002-9378(85)90310-2
166. Kuroki K, Takahashi HK, Iwagaki H, Murakami T, Kuinose M, Hamanaka S, Minami K, Nishibori M, Tanaka N, Tanemoto K. beta2-adrenergic receptor stimulation-induced immunosuppressive effects possibly through down-regulation of co-stimulatory molecules, ICAM-1, CD40 and CD14 on monocytes. *J Int Med Res.* 2004;32(5):465–83. doi:10.1177/147323000403200503
167. Farmer P, Pugin J. beta-adrenergic agonists exert their "anti-inflammatory" effects in monocytic cells through the IkappaB/NF-kappaB pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;279(4):L675-82. doi:10.1152/ajplung.2000.279.4.L675
168. Hendricks SK, Smith JR, Moore DE, Brown ZA. Oligohydramnios associated with prostaglandin synthetase inhibitors in preterm labour. *Br J Obstet Gynaecol.* 1990;97(4):312–6. doi:10.1111/j.1471-0528.1990.tb01807.x
169. Sandruck JC, Grobman WA, Gerber SE. The effect of short-term indomethacin therapy on amniotic fluid volume. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;192(5):1443–5. doi:10.1016/j.ajog.2004.12.036
170. Di Renzo GC, Cabero Roura L, Facchinetti F, Helmer H, Hubinont C, Jacobsson B, Jørgensen JS, Lamont RF, Mikhailov A, Papantoniou N, Radzinsky V, Shennan A, Ville Y, Wielgos M, Visser GHA. Preterm Labor and Birth Management: Recommendations from the European Association of Perinatal Medicine. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2017;30(17):2011–30. doi:10.1080/14767058.2017.1323860
171. Janina Seiffert. Indometacin [Internet]. 2020 [updated 2020 Oct 20]. Available from: https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Indometacin_49
172. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(10):a016295. doi:10.1101/cshperspect.a016295

173. Futata EA, Fusaro AE, Brito CA de, Sato MN. The neonatal immune system: Immunomodulation of infections in early life. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012;10(3):289–98. doi:10.1586/eri.12.9