

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Lübeck

Leitung: Prof. Dr. med. E. Herting

**Analyse des Gleichgewichts zwischen
pro- und antiinflammatorischen Zytokinen bei
Frühgeborenen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der

Universität zu Lübeck

-Aus der medizinischen Fakultät-

vorgelegt von

Petra Temming

Lübeck, 2005

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Christian Schultz
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. E. Brandt
3. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. A. Heep

Tag der mündlichen Prüfung: 16. 09. 2005

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 16. 09. 2005

Gez. Prof. Dr. med. Peter Dominiak
-Dekan der Medizinischen Fakultät-

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	5
1.1	Frühgeburtlichkeit	5
1.2	Neonatale Infektion	5
1.3	Zytokine	7
1.3.1	Definition	7
1.3.2	Funktionen der einzelnen Zytokine	8
1.4	Proinflammatorische Zytokine im Rahmen einer Infektion	10
1.5	Zytokinexpression und Krankheitsassoziation	12
1.6	Therapeutische Anwendung der Zytokine	14
2	FRAGESTELLUNG	16
3	MATERIAL UND METHODEN	18
3.1	Reagenzien	18
3.2	Monoklonale Antikörper	18
3.3	Medikamente, Zytokine und Stimulanzen für die Zellkulturen	19
3.4	Reaktionskits	19
3.5	Geräte	19
3.6	Computerprogramme	20
3.7	Untersuchungsmaterial von Probanden und Patienten	20
3.8	Ansatz der Zellkultur und Stimulation	20
3.9	Zellfixation	22
3.10	Die Durchflusszytometrie	24
3.10.1	Permeabilisierung und Färbung der Zellen	24
3.10.2	Die durchflusszytometrische Messung	25

3.11 Die Messung mittels ELISA	25
3.12 Statistische Auswertung	26
4 ERGEBNISSE	27
4.1 IL-6- und IL-8-Produktion Frühgeborener	27
4.1.1 Spontane IL-6- und IL-8-Produktion Frühgeborener	28
4.1.2 IL-6- und IL-8-Produktion Frühgeborener nach Stimulation	30
4.1.3 Messung proinflammatorischer Zytokine im Zellkulturüberstand	31
4.1.4 Korrelation zwischen Zytokinproduktion und Gestationsalter	32
4.1.5 Einfluss des Geburtsmodus auf die Zytokinproduktion	33
4.1.6 Einfluss der pränatalen Glukokortikosteroidgabe auf die Zytokinproduktion bei Frühgeborenen	33
4.2 Hemmung der IL-6- und IL-8-Produktion durch Dexamethason in-vitro	34
4.3 Bildung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 bei Früh- und Reifgeborenen	35
4.4 Hemmung der Bildung proinflammatorischer Zytokine durch TNF- α -Blockade in-vitro	37
4.5 Hemmung der Produktion inflammatorischer Zytokine durch rekombinantes IL-10 in-vitro	39
5 DISKUSSION	42
6 ZUSAMMENFASSUNG	51
7 LITERATURVERZEICHNIS	53
8 DANKSAGUNG	61
9 LEBENSLAUF	63

Abbildungsverzeichnis

Tab. 1	Vorinkubation des Vollblutansatzes	22
Tab. 2	Reagenzien	23
Tab. 3	Monoklonale Antikörper	25
Tab. 4	Kollektiv der Frühgeborenen	28
Abb. 1	Spontane IL-6- und IL-8-Bildung bei Frühgeborenen	29
Abb. 2	IL-6- und IL-8-Produktion nach Stimulation mit Endotoxin.	31
Abb. 3	Proinflammatorische Zytokine im Zellüberstand nach Endotoxinstimulation....	32
Abb. 4	Hemmung der Bildung von IL-6 und IL-8 durch Kortikosteroide.....	35
Abb. 5	IL-10-Bildungsfähigkeit bei Frühgeborenen und Reifgeborenen	37
Abb. 6	Einfluss eines Anti-TNF- α -Antikörpers auf die Produktion von TNF- α	38
Abb. 7	Kinetik des Einflusses eines Anti-TNF- α -Antikörpers auf die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 bei Erwachsenen.....	39
Abb. 8	Einfluss von rekombinanten IL-10 auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine	41

Abkürzungsverzeichnis

BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BCG	Bacille Calmette Guerin
CLD	Chronische Lungenerkrankung (Chronic Lung Disease)
CRP	C-reaktives Protein
ELISA	Enzymgekoppelter Immunosorbenstest (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay)
Erw	Erwachsene
FACS	fluoreszenzaktivierter Zellsorter (Fluorescence-Activated-Cell-Sorter)
FG	Frühgeborene
FITC	Fluorescein-Isothiocyanate
g	Gravitationsbeschleunigung
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid solution
IVH	Intraventrikuläre Hämorrhagie
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
Max.	Maximum
MW	Mittelwert
Min.	Minimum
n	Anzahl der Probanden
NIH	National Institute of Health
NEA	Nicht essentielle Aminosäuren
NEC	Nekrotisierende Enterocolitis
PBS	Phosphatpuffer (Phosphat-Buffered-Solution)
PE	Phycoerythrin
Perz.	Perzentile
PFA	Paraformaldehydlösung
PVL	Periventrikuläre Leukomalazie
rIL-10	Rekombinantes Interleukin-10
RG	Reifgeborene
RPMI	Kulturmedium (Roswell Park Memorial Institute)
SSW	Schwangerschaftswoche
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α

1 Einleitung

1.1 Frühgeburtlichkeit

Nach Empfehlung der Weltgesundheitsorganisation ist Frühgeburtlichkeit als die Geburt vor der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche unabhängig vom Geburtsgewicht definiert; sie betrifft in den zivilisierten Ländern ungefähr 6-7 % aller Neugeborenen (Goldenberg und Rouse 1998; Stoll und Kliegman 2004). Etwa 1 % aller Kinder zählen zu den sehr unreifen Frühgeborenen (unterhalb der 32. Schwangerschaftswoche), diese gelten als Hauptrisikogruppe für Komplikationen (Doyle et al. 1999) und sie werden daher in dieser Arbeit getrennt betrachtet. Die Frühgeburtlichkeit trägt als wesentlicher Faktor zur perinatalen und neonatalen Morbidität und Mortalität bei. Durch Fortschritte in der Neonatologie konnte die Prognose der Frühgeborenen in den letzten Jahren entscheidend verbessert werden. Bei den Frühgeborenen zwischen 1000 g und 1500 g sank die neonatale Mortalität in den letzten 40 Jahren von 50 % auf 5 %. (Goldenberg und Rouse 1998). Gleichzeitig tragen Frühgeborene ein größeres Risiko als Reifgeborene für die Entstehung neonataler Anpassungsstörungen und Erkrankungen. In der Folge dieser Erkrankungen treten Langzeitschäden auf; dies sind vor allem neurologische Defizite, die von leichten Lernbehinderungen, Entwicklungsverzögerungen und Aufmerksamkeitsstörungen bis hin zu schwersten Behinderungen reichen (Hille et al. 1994; Horwood et al. 1999; Wolke and Meyer 1999; Wood et al. 2000). Die verminderte Lebensqualität dieser Kinder als Langzeitfolge der Frühgeburtlichkeit bedeutet daher eine große Herausforderung für die Neonatologie.

Auf Grund der hohen Prävalenz der Folgeschäden stellt die neonatale Infektion einen der Hauptfaktoren neonataler Morbidität und Mortalität dar (Martinot et al. 1997; Barton et al. 1999); daher sollen im Folgenden die Entstehung und Besonderheiten der neonatalen Infektion näher erläutert werden.

1.2 Neonatale Infektion

Während Erwachsene und ältere Kinder normalerweise die Fähigkeit besitzen, bakterielle Infektionen lokal zu begrenzen, entwickelt das Neugeborene schnell eine schwere

systemische Entzündungsreaktion. Die neonatale Sepsis ist eines der Hauptprobleme der Neonatologie. Die Inzidenz liegt bei Neugeborenen vor dem 30. Lebenstag bei 1- 8 Erkrankungen pro 1000 Lebendgeburten (Vesikari et al. 1985; Martinot et al. 1997; Klein 2001; Stoll 2004). Als der bedeutendste Risikofaktor für das Auftreten einer Sepsis gilt die Frühgeburtlichkeit. Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht zwischen 1000 g und 1500 g haben ein 8- 10fach höheres Risiko an einer Sepsis zu erkranken als Neugeborene über 2000 g Geburtsgewicht (Stoll et al. 1996a; Stoll et al. 1996b; Klein 2001; Stoll 2004). Weitere Risikofaktoren sind vorzeitiger Blasensprung, Amnioninfektionssyndrom, fetale Hypoxie und eine maternale peripartale Infektion. Auf Grund der unterschiedlichen Pathogenese und des unterschiedlichen Erregerspektrums kann das Krankheitsbild der neonatalen Sepsis in early-onset und late-onset Sepsis unterteilt werden. Die late-onset Sepsis wird postpartal durch nosokomiale Keime hervorgerufen, während der Erreger bei der early-onset Sepsis schon intrauterin oder peripartal erworben wird. Die Erreger der early-onset Sepsis sind im Geburtskanal vorkommende Keime, wie typischerweise Streptokokken der Gruppe B und Escherichia Coli. Die Mortalitätsrate der neonatalen Sepsis ist hoch und schwankt in den verschiedenen Studien zwischen 15 % und 50 % in Abhängigkeit vom Gestationsalter und Geburtsgewicht (Vesikari et al. 1985; Stoll et al. 1996a; Stoll et al. 1996b; Klein 2001).

Die Ursache dieser erhöhten Anfälligkeit des Neonaten im Allgemeinen und des Frühgeborenen im Besonderen gegenüber Infektionen ist Gegenstand zahlreicher Diskussionen. Das wachsende Risiko bei sinkendem Gestationsalter legt eine kausale Verbindung zur relativen Unreife des neonatalen Immunsystems nahe. Neben einem verminderten plazentaren Transport maternaler Immunglobuline und sowohl quantitativen als auch qualitativen Defiziten des Komplementsystems (Ferrieri 1990) wird vor allem die verminderte Fähigkeit des Neonaten, proinflammatorische Zytokine und Chemokine zu bilden, für die erhöhte Anfälligkeit für Infektionen verantwortlich gemacht (Liechty et al. 1991; Yachie et al. 1992; Schibler et al. 1992; Schibler et al. 1993; Chang et al. 1994; Pillay et al. 1994; Rowen et al. 1995). Im Folgenden sollen die Zytokine und ihre Aufgaben als Kommunikationselemente bei der Immunantwort näher betrachtet werden.

1.3 Zytokine

1.3.1 Definition

Unter dem Begriff Zytokine werden mehrere Gruppen kurzlebiger Glykoproteine zusammengefasst, die eine regulierende Wirkung auf das Wachstum und die Differenzierung von Zellen des hämatopoetischen Systems besitzen. Insbesondere koordinieren sie das Zusammenspiel immunkompetenter Zellen, steuern deren Aktivierung und Effektorfunktionen und besitzen daher eine zentrale Rolle in der Entstehung einer adäquaten Immunantwort. Auf Grund der komplexen synergetischen, additiven und antagonistischen Interaktionen aller Zytokine und der Vielfalt der Steuerungsmöglichkeiten wird ihr Wirkungsgefüge innerhalb des Immunsystems auch als Zytokinnetzwerk bezeichnet (Balkwill und Burke 1989).

Zytokine sind eine sehr heterogene Gruppe von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 8- 40 kDa (Dinarello 2000). Im Gegensatz zu den klassischen Peptidhormonen können Zytokine von mehreren verschiedenen Zellarten als Reaktion auf einen lokalen hochspezifischen Reiz gebildet werden. Die Hauptproduzenten sind jedoch die Immunzellen selbst. Zytokine ihrerseits entfalten ihre Wirkung in sehr geringen Konzentrationen an membranständigen Rezeptoren ihrer Zielzellen und modulieren durch diese Bindung die DNA-, RNA- und Proteinsynthese (Dinarello 2000).

Entsprechend ihrer molekularen Struktur kann man Zytokine in Hauptfamilien einteilen: dazu gehören die Hämatopoetin-Familie, in der Wachstumsfaktoren und zahlreiche Interleukine mit Funktionen der erworbenen und angeborenen Immunität zusammengefasst werden; die TNF-Familie, die sowohl bei der angeborenen als auch der adaptiven Immunität von Bedeutung ist; die Interferone, die die immunologische Abwehr gegen Viren mobilisieren, und die Gruppe der Chemokine. Diese Moleküle induzieren eine gerichtete Chemotaxis vor allem von Leukozyten und leiten Monozyten, Neutrophile und andere Effektorzellen aus dem Blut zu Infektionsherden (Janeway 2002).

In der Fachliteratur synonym gebrauchte Bezeichnungen für Interleukine, wie Lymphokine und Monokine, beziehen sich auf die Lympho- und Monozyten als den hauptsächlichen Bildungsort einzelner Interleukine. Der Begriff Interleukin (sich zwischen weißen Zellen

bewegen) und die Nummerierung der bekannten Mediatoren wurden eingeführt, um eine einheitliche Nomenklatur zu schaffen. Die Bezeichnung ist jedoch irreführend, da sich das Wirkungsspektrum nicht auf die Leukozyten beschränkt. Der treffendste existierende Begriff ist Zytokin (sich zwischen den Zellen bewegen) und wird daher in der vorliegenden Arbeit verwendet.

1.3.2 Funktionen der einzelnen Zytokine

Die Funktionen der einzelnen Zytokine sind vielfältig und abhängig von dem Zusammenspiel vieler Faktoren. Die in-vitro gewonnenen Erkenntnisse über isolierte Funktionen einzelner Zytokine dienen daher dem Verständnis ihrer Aufgaben, die Übertragung auf die in-vivo Situation ist jedoch nicht uneingeschränkt möglich. Im Folgenden werden die Zytokine, die für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit relevant sind, näher betrachtet.

Tumornekrosefaktor- α

Als antitumoral wirkender Faktor wurde der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) erstmalig in BCG (Bacille Calmette Guerin)-sensibilisierten Mäusen nach Stimulation mit LPS nachgewiesen (Carswell et al. 1975). Heute wird seine Bedeutung vielmehr in der zentralen Rolle bei der Regulation der Immunreaktion gesehen. Er gilt als einer der Hauptmediatoren der Inflammation und wird mit einer großen Anzahl von infektiösen und nicht-infektiösen entzündlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Strieter et al. 1993). TNF- α hat pleiotrope Effekte auf seine Zielzellen. Die Bildung erfolgt nach Stimulation zu einem relativ frühen Zeitpunkt der Immunreaktion. Im Anschluss induziert TNF- α selbst die Bildung anderer Zytokine, wie Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) (Blackwell und Christman 1996). Eigenständig und synergetisch mit IL-1 wirkt TNF- α auf die an der Immunantwort beteiligten Zellen. Er führt unter anderem zu Fieber, einer Steigerung der Phagozytose und einer Steigerung der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (Blackwell und Christman 1996).

Interleukin-1

IL-1 wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen gebildet und wirkt auf eine Vielzahl von Zellen, die an der Immun- und Entzündungsreaktion beteiligt sind (Dinarello 1991). Weitere Zellen, die IL-1 bilden, gehören zum epidermalen, epithelialen, lymphoiden und vaskulären Gewebe. IL-1 ist bedeutend an der Einleitung einer Immun- und Entzündungsreaktion beteiligt. Dabei wirkt es synergetisch zu TNF- α (Dinarello 2000) und stimuliert die Sekretion anderer Zytokine, darunter IL-6, IL-8 und TNF- α . IL-1 fördert die T-Zell- und Makrophagenaktivierung, unterstützt die Zellentwicklung im Knochenmark und reguliert die Reifung der T-Lymphozyten im Thymus. In der Leber stimuliert es gemeinsam mit IL-6 die Bildung der Akute-Phase-Proteine (Dinarello 1991).

Interleukin-6

IL-6 ist ein multifunktionales Zytokin, das von einer Vielzahl von Zellen produziert wird. Hauptquellen für die Bildung von IL-6 sind Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten, Fibroblasten und Endothelzellen. Zu den vielfältigen Effekten von IL-6 zählt die Stimulation des Wachstums und der Differenzierung von Lymphozyten, insbesondere der antikörperproduzierenden B-Zellen (Borden und Chin 1994). Zusätzlich induziert es in Hepatozyten die Bildung von Akute-Phase-Proteinen und regt im Knochenmark gemeinsam mit Interleukin-3 (IL-3) die Proliferation der hämatopoetischen Stammzellen an (Borden und Chin 1994).

Interleukin-8

IL-8 gehört zu der Gruppe der Chemokine. Es wird von Monozyten, Makrophagen, Leukozyten, Endothelzellen und verschiedenen mesothelialen Zellen als Antwort auf eine Vielzahl von Stimuli, wie Endotoxine, TNF- α und IL-1, gebildet. Die Hauptfunktion von IL-8 ist seine aktivierende und chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten (Blackwell und Christman 1996). Außerdem lockt IL-8 in nanomolaren Konzentrationen auch Basophile und T-Lymphozyten zum Ort des Entzündungsgeschehens und wirkt zudem als angiogenetischer Faktor (Koch et al. 1992).

Interleukin-10

Bekannt wurde Interleukin-10 (IL-10) unter der Bezeichnung Cytokine Synthesis Inhibiting Factor. Entdeckt wurde es als ein Produkt der Typ 2 T-Helferzellen, das die Fähigkeit besitzt, die Synthese proinflammatorischer Zytokine in Typ 1 T-Helferzellen zu unterdrücken (Fiorentino et al. 1989). Heute gelten Makrophagen als Hauptbildungsort von IL-10. Die Zellen werden durch verschiedene endogene und exogene Faktoren, wie unter anderem Endotoxin, TNF- α und Katecholamine, zur Bildung von IL-10 stimuliert (Asadullah et al. 2003). In-vitro wirkt IL-10 suppressiv auf die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8 (de Waal Malefyt et al. 1991; Fiorentino et al. 1991; Cassatella et al. 1993; Marchant et al. 1994). Außerdem kontrolliert es den inflammatorischen Prozess durch Unterdrückung der Expression von Adhäsionsmolekülen auf antigenpräsentierenden Zellen und von kostimulatorischen Molekülen in Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und T-Zellen (Moore et al. 2001).

1.4 Proinflammatorische Zytokine im Rahmen einer Infektion

Zytokine besitzen große Bedeutung für die Antwort der angeborenen und erworbenen Immunität auf eine Infektion (Romagnani 2000; Janeway 2002). Ausgelöst wird die Sekretion von Zytokinen in aktivierten Makrophagen durch das Erkennen exogener Pathogene. Entscheidend für den physiologischen Ablauf der Entzündungsreaktion ist dabei ein Gleichgewicht zwischen fördernden und hemmenden Einflüssen. Zytokine, die eindeutig die Entzündungsreaktion fördern, werden als proinflammatorische Zytokine bezeichnet, während die Zytokine, die die Aktivität proinflammatorischer Zytokine unterdrücken, als antiinflammatorische Zytokine gelten. Die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine verläuft kaskadenförmig. Unabhängig davon, ob der Auslöser eine Infektion, ein Trauma, eine Ischämie, immun-aktivierte T-Zellen oder Toxine sind, stehen am Anfang dieser Kaskade die Zytokine IL-1 und TNF- α . Diese wirken während dieser Phase synergetisch und induzieren die Synthese weiterer inflammatorischer Zytokine, wie IL-6 und IL-8. Antiinflammatorische Zytokine hemmen die Synthese proinflammatorischer Zytokine und vermindern die Intensität der Kaskade.

Die Bedeutung des Gleichgewichtes zwischen den sich regulierenden Anteilen der inflammatorischen Zytokinproduktion wird bei der Betrachtung der Rolle proinflammatorischer Zytokine im Rahmen der Sepsis deutlich. In erster Linie sind proinflammatorische Zytokine für die Initiierung und Koordinierung einer effektiven Abwehr gegen exogene Pathogene notwendig. Eine Überproduktion dieser Mediatoren kann hingegen schädlich sein und schließlich zum septischen Schock, Multi-Organ-Versagen und dadurch zum Tode führen (Pinsky et al. 1993; Marty et al. 1994; van der Poll und Lowry 1995). Insbesondere die Mechanismen, die das Zytokin TNF- α bei der Begrenzung einer lokalen Entzündung unersetzlich machen, haben bei einer systemischen Infektion katastrophale Folgen.

Eine lokale Infektion mit gramnegativen Bakterien führt zu einer Freisetzung von TNF- α durch aktivierte Makrophagen. TNF- α steigert an den Blutgefäßen, vor allem den Venolen, den Blutfluss, die Permeabilität der Gefäßwand für Flüssigkeit, Proteine und Zellen und die Adhäsion von Blutplättchen und Leukozyten an der Gefäßwand. Dadurch kommt es zur Freisetzung von Plasmaproteinen und einer Wanderung von Phagozyten und Lymphozyten ins infizierte Gewebe. Der Verschluss kleinerer Gefäße durch entstehende Blutgerinnsel verhindert die systemische Ausbreitung der lokalen Infektion. Flüssigkeit, Proteine und Zellen werden aus dem Gewebe über das Lymphsystem in die regionalen Lymphknoten transportiert und initiieren dort die adaptive Immunantwort. Bei der systemischen Ausbreitung einer gramnegativen Infektion setzen die Makrophagen in Leber und Milz TNF- α in die Blutbahn frei und dieser wirkt in ähnlicher Weise wie bei der lokalen Infektion auf alle kleinen Blutgefäße. Dadurch kommt es zu einem systemischen Ödem mit Senkung des intravaskulären Flüssigkeitsvolumen, Hypoproteinämie und anfangs Neutropenie, später Neutrophilie. Das verminderte Blutvolumen führt zum Schock. Zudem löst TNF- α beim septischen Schock eine disseminierte intravasale Gerinnung aus. Multiple Thrombosierung kleiner Gefäße und Blutungen durch Erschöpfung der Vorräte der Gerinnungsfaktoren führen zum Ausfall lebenswichtiger Organe wie Niere, Leber, Lunge und Herz (van der Poll und Lowry 1995; Janeway 2002). Dementsprechend ist die Mortalitätsrate durch eine Sepsis hoch. Tierversuche konnten zeigen, dass Mausmutanten mit einem Defekt des TNF- α -Rezeptors zwar nicht in der Lage sind, lokale Infektionen effektiv zu begrenzen, jedoch nicht unter den Folgen einer schweren systemischen Entzündungsreaktion leiden (Hultgren et al. 1998).

Neben diesen direkten Folgen der systemischen TNF- α -Sekretion, setzt der Faktor die kaskadenförmige Sekretion weiterer proinflammatorische Zytokine in Gang. Auch diese proinflammatorischen Zytokine, wie IL-6 und IL-8, besitzen in hohen systemischen Konzentrationen schädigende Wirkung auf das körpereigene Gewebe (Pinsky et al. 1993; Marty et al. 1994). Während proinflammatorische Zytokine einerseits unersetzlich für eine adäquate Immunreaktion auf eine Infektion sind, besitzen sie im Rahmen einer Sepsis geweбетoxische Wirkung auf den Organismus. Im gesunden Organismus werden diese unerwünschten Effekte proinflammatorischer Zytokine durch die hemmende Einwirkung antiinflammatorischer Zytokine reguliert. Entscheidend für diese Gratwanderung zwischen effektiver Abwehr und Schutz des eigenen Gewebes ist jedoch ein funktionierendes dynamisches Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen (Dinarello 2000).

1.5 Zytokinexpression und Krankheitsassoziation

Die Fähigkeit Neugeborener, im Rahmen einer Infektion Zytokine zu bilden, ist umstritten. Beim Vorliegen einer intrauterinen Infektion steigen charakteristischerweise die Werte proinflammatorischer Zytokine im Fruchtwasser an. Diese erhöhten Zytokinspiegel im Fruchtwasser korrelieren weniger mit den maternalen Zytokinserumspiegeln als vielmehr mit erhöhten Zytokinspiegeln im Nabelschnurblut der Feten (Romero et al. 1998; Dammann und Leviton 2000b). Diese Beobachtung unterstreicht, dass diese gesteigerte Zytokinproduktion durch eine systemische fetale Entzündungsreaktion hervorgerufen wird und weniger auf einen maternalen Ursprung zurückzuführen ist. Erhöhte Zytokinspiegel im Fruchtwasser gelten als Vorboten einer drohenden Frühgeburt (Kundsinn et al. 1996; Gomez et al. 1997; Newton et al. 1997). Zunehmend existieren Hinweise, dass die Entstehung verschiedener neonataler Erkrankungen mit erhöhten proinflammatorischen Zytokinwerten verbunden ist. Zu diesen neonatalen Erkrankungen gehören das Atemnotsyndrom (Hitti et al. 1997), die chronische Lungenerkrankung des Frühgeborenen (CLD) (Yoon et al. 1997c; Yoon et al. 1999), die intraventrikuläre Hämorrhagie (IVH) (Dammann and Leviton 1997), die periventrikuläre Leukomalazie (PVL) (Yoon et al. 1997a) und die Zerebralparese (Dammann und Leviton 1997; Yoon et al. 2000).

Ungefähr 20 % der Frühgeborenen mit einem Gewicht unter 1500 g entwickeln eine CLD (Stoll und Kliegman 2004). Diese Erkrankung besitzt einen großen Anteil an der Morbidität und Mortalität Frühgeborener. Ursprünglich wurden die Auswirkungen des Barotraumas und der Sauerstofftoxizität auf das unreife Lungengewebe während einer mechanischen Beatmung als Hauptfaktoren in der Pathogenese betrachtet. Aufgrund der Beobachtung, dass Frühgeborene, die unter einer nosokomialen Infektion leiden, häufiger eine CLD als ihre Altersgenossen ohne Infektion entwickeln, zogen Rojas et al. 1995 (Rojas et al. 1995) erstmalig eine Beteiligung eines inflammatorischen Prozesses in der Ätiologie der CLD in Erwägung. Es konnte gezeigt werden, dass inflammatorische Lungenschäden eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der CLD spielen. Das Vorliegen einer intrauterinen Infektion mit erhöhten Werten proinflammatorischer Zytokine im Fruchtwasser (Yoon et al. 1997c; Ghezzi et al. 1998) und im Nabelschnurblut (Yoon et al. 1999) prädisponiert für das Auftreten einer CLD. Messungen proinflammatorischer Zytokine in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) beatmeter Frühgeborener zeigen zudem eine Korrelation zwischen erhöhten Zytokinspiegeln und der Entwicklung einer CLD (Bagchi et al. 1994; McColm und McIntosh 1994; Jones et al. 1996b). Des Weiteren konnte ein Anstieg der proinflammatorischen Zytokinspiegel in der BAL mit zunehmender Dauer der Beatmung nachgewiesen werden (Schultz et al. 2003).

Weitere bedeutende Komplikationen der Frühgeburtslichkeit sind die IVH und die PVL. Beide Erkrankungen stehen in engem Zusammenhang mit der Entwicklung einer Zerebralparese und haben entscheidenden Einfluss auf Morbidität und Mortalität der Frühgeborenen. Die Inzidenz der IVH ist abhängig von der Reife des Neugeborenen. Bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g tritt in ca. 11 % eine schwere IVH auf (Stoll und Kliegman 2004). Ungefähr 5 % der Kinder mit isolierter IVH entwickeln später eine Zerebralparese (Dammann und Leviton 1997). Für die Pathogenese der IVH werden die erhöhte Vulnerabilität des unreifen Gewebes sowie peri- und postpartale Faktoren, wie unter anderem Perfusionsschwankungen, verantwortlich gemacht. Der eigentliche Mechanismus, der zu einer intraventrikulären Blutung führt, ist jedoch weiterhin ungeklärt. Zunehmend wird der erhöhten pränatalen Zytokinexposition im Rahmen einer intrauterinen Infektion eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der IVH zugeschrieben. Frühgeborene, bei denen eine Chorioamnionitis vorlag, haben ein 3-4fach erhöhtes Risiko eine IVH zu entwickeln (Morales 1987; Salafia et al. 1995; Yoon et al.

1995). Es konnte gezeigt werden, dass höhere Spiegel proinflammatorischer Zytokine im Fruchtwasser für das Auftreten einer IVH prädisponieren (Martinez et al. 1998).

Auch bei der Entstehung einer PVL wird eine Beteiligung inflammatorischer Mediatoren diskutiert. Die PVL tritt bei 3-7 % der Frühgeborenen unter 1500 g auf und führt sehr häufig zur Entwicklung einer Zerebralparese (60 - 100 %) (Leviton und Paneth 1990; Dammann und Leviton 1997). Die Schädigung der weißen Substanz wird auf Hypoxämie und Ischämie des ZNS in der Peripartalzeit zurückgeführt. Außerdem tritt die PVL ähnlich wie die IVH gehäuft in Verbindung mit einer Chorioamnionitis auf. Erhöhte Zytokinwerte im Fruchtwasser und im Nabelschnurblut gelten als Risikofaktoren für die Entstehung der PVL (Yoon et al. 1996; Yoon et al. 1997a) und der Zerebralparese (Yoon et al. 2000). Auch im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass eine intrauterine Infektion zum Auftreten von fetalen Schäden der weißen Substanz führt (Yoon et al. 1997b). Die Expression großer Mengen IL-6 und TNF- α in der geschädigten weißen Gehirns substanz der Frühgeborenen unterstreicht die Bedeutung der Zytokine in der Pathogenese dieser Schädigung (Yoon et al. 1997d). Vor dem Hintergrund der gewebeschädlichen Effekte proinflammatorischer Zytokine wird postuliert, dass zwischen intrauteriner Infektion, pränataler Zytokinexposition und dem Auftreten typisch neonataler Erkrankungen ein kausaler Zusammenhang besteht (Dammann und Leviton 1997; Dammann und Leviton 2000b).

1.6 Therapeutische Anwendung der Zytokine

Mit dem Ziel, eine überschießende proinflammatorische Zytokinbildung zu limitieren, werden heute verschiedene Mediatoren klinisch angewendet. Um die Entzündungskaskade zu einem frühen Zeitpunkt zu durchbrechen und das Gewebe vor einer inadäquaten Entzündungsreaktion zu schützen, werden unter anderem TNF- α -blockierende Substanzen und IL-1-Rezeptorantagonisten eingesetzt. Zur TNF- α -Blockade stehen zwei Substanzen mit verschiedenen Wirkungsmechanismen zur Verfügung. Das eine ist ein rekombinantes Molekül, Etanercept, das sich von dem löslichen TNF- α -Rezeptor, einem natürlich vorkommenden TNF- α -Antagonisten, ableitet. Das andere, Infliximab, ist ein chimärischer monoklonaler Antikörper (Mensch-Maus) gegen menschliches TNF- α . Ein weiterer Ansatz zur Wiederherstellung des Zytokingleichgewichtes ist die Anwendung von rekombinantem IL-10, das in-vivo als antiinflammatorisches Zytokin die Synthese proinflammatorischer

Zytokine reguliert. Diese Substanzen werden zurzeit erfolgreich in der Therapie lokaler chronischer Inflammation eingesetzt. Insbesondere bei der Behandlung der rheumatoiden Arthritis haben TNF- α -blockierende Substanzen entscheidende Fortschritte bewirkt (Baumgartner 2000). In Tierversuchen konnte zudem ein protektiver Effekt der TNF- α -Blockade gegenüber einer LPS vermittelten systemischen Entzündungsreaktion nachgewiesen werden (Beutler et al. 1985; Tracey et al. 1987). Basierend auf diesen Erkenntnissen ist die Wirkung zytokinblockierender Substanzen in verschiedenen klinischen Studien im Rahmen einer Sepsis untersucht worden. Der systemische Einsatz zytokinblockierender Substanzen konnte jedoch die Überlebensrate in der Sepsis nicht entscheidend verbessern (Zeni et al. 1997).

2 Fragestellung

Die systemische fetale Entzündungsreaktion in Folge einer neonatalen Infektion ist trotz intensivmedizinischen Fortschritts und der Verfügbarkeit von antimikrobiellen Substanzen Ursache neonataler Mortalität und Morbidität. Gefährdet sind insbesondere Frühgeborene, weil sie häufiger als Reifgeborene eine systemische Entzündungsreaktion entwickeln und vermehrt von Folgeerkrankungen betroffen sind. Entscheidende Mediatoren für den Ablauf einer adäquaten Immunantwort sind Zytokine. Die neonatale Fähigkeit, Zytokine zu bilden, ist umstritten. Einerseits wird im Rahmen der erhöhten Sensibilität der Neonaten - insbesondere der Frühgeborenen - gegenüber Infektionen eine verminderte Zytokinproduktion postuliert; andererseits existieren Hinweise auf eine Schlüsselrolle der proinflammatorische Zytokine bei der Entstehung typischer Erkrankungen des Frühgeborenen. Eine Vielzahl von Untersuchungen über inflammatorische Mediatoren bei Neugeborenen während einer Infektion ist durchgeführt worden. Im Rahmen einer Sepsis beginnt die Zytokinproduktion zu einem sehr frühen Zeitpunkt und kann sich im Verlauf durch ein Phänomen, das als Immunparalyse beschrieben wurde, erschöpfen (Ertel et al. 1995; Astiz et al. 1996). Daher sind bei Messungen in-vivo zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Sepsisverlaufes die Standardisierungsmöglichkeiten erschwert und können so irreführende Ergebnisse liefern. Zur Charakterisierung der neonatalen Entzündungsantwort bevorzugen wir daher ein ex-vivo Modell der Sepsis, in dem Monozyten im Vollblut unter definierten Bedingungen stimuliert werden, in Kombination mit der Analyse der Zytokinproduktion auf Zellebene mittels Durchflusszytometrie. Im Gegensatz zu anderen Verfahren, die zu kontroversen Ergebnissen führen, ermöglicht diese Versuchsanordnung eine Zuordnung der Zytokinproduktion zu einem spezifischen Zelltyp ohne eine vorausgehende Zelltrennung. Um den Effekt der oben beschriebenden Immunparalyse weitgehend auszuschalten, wurde Blut von gesunden Frühgeborenen verwendet. Vorausgehend konnte in einer Dissertation (C. Rott, Betreuer: PD Dr. med. C. Schultz) der hiesigen immunologischen Arbeitsgruppe bei reifen Neugeborenen eine im Vergleich zu Erwachsenen erhöhte IL-6- und IL-8-Bildungsfähigkeit auf Zellebene nachgewiesen werden (Schultz et al. 2002a). In der hier vorliegenden Studie soll die Fähigkeit Frühgeborener unterschiedlichen Gestationsalters, proinflammatorische Zytokine zu produzieren, analysiert werden. Vor dem Hintergrund der komplexen Interaktionen zwischen pro- und antiinflammatorischem Anteilen der Immunantwort, soll im Anschluss

die Fähigkeit Reif- und Frühgeborener, das antiinflammatorische Zytokin IL-10 zu bilden, näher untersucht werden. Die genaue Kenntnis der neonatalen Zytokinbildungsfähigkeit ermöglicht ein besseres Verständnis der Pathogenese der systemischen fetalen Entzündungsantwort und der daraus entstehenden neonatalen Erkrankungen. Darüber hinaus eröffnen sich aus diesen Ergebnissen neue Therapieoptionen. Die therapeutische Substitution und Blockade einzelner Zytokine wird in der Behandlung chronischer lokaler Inflammationen erfolgreich angewendet, der Einsatz im Rahmen einer Sepsis zeigt bis heute jedoch nicht die erhofften Verbesserungen. In der hier vorliegenden Studie sollen therapeutische Möglichkeiten zur Modulation des Gleichgewichts zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen vorgestellt und die Wirkung auf die neonatale Zytokinproduktion in-vitro untersucht werden. Somit lassen sich die Zielsetzungen der hier vorliegenden Arbeit folgendermaßen unterteilen:

1. Untersuchung der Bildungsfähigkeit proinflammatorischer Zytokine bei Frühgeborenen
2. Untersuchung der Bildungsfähigkeit antiinflammatorischer Zytokine bei Früh- und Reifgeborenen
3. Möglichkeiten der Beeinflussung des Zytokingleichgewichts in-vitro bei Früh- und Reifgeborenen

3 Material und Methoden

3.1 Reagenzien

Clenz Clearing solution (Beckmann Coulter, Immunotech, Krefeld, Deutschland)

DNA-Check-Beads (Beckmann Coulter, Immunotech, Krefeld, Deutschland)

Hanks' balanced salt solution (HBSS) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

HEPES Puffer (Seromed Biochrom, Berlin, Deutschland)

Isoton II (Beckmann Coulter Immunotech, Krefeld, Deutschland)

Lithium-Heparin tubes 4.5 ml (Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland)

Magermilchpulver (kommerziell erhältlich)

N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin 200 mM (Seromed Biochrom, Berlin, Deutschland)

Natriumpyruvat 100 mM (Seromed Biochrom, Berlin, Deutschland)

Nicht-essentielle Aminosäuren (NEA)(Seromed Biochrom, Berlin, Deutschland)

Paraformaldehyd (PFA) (Riedel de Haen AG, Seelze, Deutschland)

Phosphatpufferlösung (Phosphat-Buffer-Solution (PBS-1), pH 7,2)

Penicillin 10.000 IE/ Streptomycin 10 mg/ml (Seromed Biochrom, Berlin, Deutschland)

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium mit 2 g/l NaHCO₃, ohne L-Glutamin (Seromed Biochrom, Berlin, Deutschland)

Saponin (Riedel de Haen AG, Seelze, Deutschland)

3.2 Monoklonale Antikörper

Anti-human CD14-PE (Klon M5E2, Maus IgG2a)

Anti-human IL-1 α -FITC, purified-IL- 1 α (Klon 364-3B3-14, Maus IgG1)

Anti-human IL-6-FITC, purified-IL-6 (Klon MQ2-13A5, Ratte IgG1)

Anti-human IL-8-FITC, purified-IL-8 (Klon G265-8, Maus IgG2b)

Anti-human IL-10-FITC, purified-IL-10 (Klon JES3-19F1, Ratte IgG2a)

Anti-human TNF- α -FITC, purified-TNF- α (Klon MAb11, Maus IgG1)

Anti-human TNF- α ; 50% Neutralisation bei 7-30 ng/ml, > 95 % Neutralisation bei 150-600 ng/ml (MAb1, Maus IgG1)

Isotyp-gematchte Antikörper für Maus IgG1, IgG2a, IgG2b, Ratte IgG1, IgG2a
(Alle Antikörper wurden von Pharmingen, Heidelberg, Deutschland bezogen.)

3.3 Medikamente, Zytokine und Stimulanzen für die Zellkulturen

Dexamethason (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Lipopolysaccharide (LPS) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Monensin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Rekombinantes humanes Interleukin-10 (Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)

3.4 Reaktionskits

TNF- α - ELISA, 96 Test (IM1121)

IL-6 - ELISA, 96 Test (IM1120)

IL-8 - ELISA, 96 Test (IM 2237)

IL-10 - ELISA, 96 Test (IM 1987)

(Alle Reaktionskits wurden von Immunotech, Marseille, Frankreich bezogen.)

3.5 Geräte

Coulter Epics XL flow cytometer (Coulter-Electronics, Krefeld, Deutschland)

ELISA reader Spectra Classic (SLT Labinstruments GmbH, Crailsheim, Deutschland)

ELISA Lab Instruments (SLT Labinstruments GmbH, Crailsheim, Deutschland)

Sterile 24-well Platten (Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland)

3.6 Computerprogramme

SPSS® 9.0 Statistik Software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

SigmaPlot 2000® Version 6.0, Graphik Software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

EPICS XL System II™, Version 1.0, Software (Coulter-Electronics, Krefeld, Deutschland)

3.7 Untersuchungsmaterial von Probanden und Patienten

Die Nabelschnurblutproben stammen von Frühgeborenen und Reifgeborenen, die in der Zeit von 1998 - 2002 in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, geboren wurden. Das für die Untersuchungen notwendige Blut wurde unmittelbar nach der Geburt aus dem plazentaren Anteil der Nabelschnur entnommen. Die Blutentnahmen und die Speicherung verschlüsselter, personenbezogener Daten erfolgten nach Aufklärung und Einholen des Einverständnisses der Eltern. Es wurden nur gesunde Reifgeborene in die Studie einbezogen. Bei Frühgeborenen galt eine Wachstumsretardierung oder Fehlbildung als Ausschlusskriterium. Frühgeborene mit einer gesicherten Infektion wurden gesondert betrachtet. Als Kontrolle dienten durch periphere Venenpunktion entnommene Blutproben von gesunden Erwachsenen. Diese Gruppe setzte sich aus 50 freiwilligen Blutspendern (30 männlich; Alter Mittelwert, Spannweite: 31,2 Jahre, 21-56 Jahre) des Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, zusammen. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die Proben bis zu 24 Stunden bei Raumtemperatur in Lithium-Heparin Röhrchen bis zur Weiterverarbeitung gelagert werden können, ohne die Ergebnisse signifikant zu beeinflussen (Schultz et al. 2002b). Für die Durchführung der Studie liegen zwei positive Stellungnahmen der hiesigen Ethik-Kommission vor (98-086; 00-130).

3.8 Ansatz der Zellkultur und Stimulation

Der Zellansatz wurde gemäß dem Protokoll von Schultz (Schultz et al. 1999; Schultz 2003) durchgeführt. Dem Nährmedium wurden Penicillin, Streptomycin, N-Acetyl-L-

Alanyl-L-Glutamin, NEA und Natriumpyruvat zugesetzt (s. Tab. 2). Um die Ausgangsbedingungen des In-vitro-Sepsis-Modells zu standardisieren, wurden zunächst die Vollblutproben durch Nährmedium auf einheitliche Leukozytenzahlen verdünnt. Bei den Erwachsenen wählten wir eine absolute Leukozytenzahl von 5×10^6 Leukozyten/ ml, bei den Reif- und Frühgeborenen reduzierten wir die Leukozytenzahl aufgrund der geringen Materialmenge auf 2×10^6 Leukozyten/ ml. Da die Stimulantien und weiteren Zusätze im Überfluss hinzugegeben werden, hat die unterschiedliche Gesamtzellmenge keinen Einfluss auf die Stimulation, Präparation und Färbung der einzelnen Zellen. Durch Zugabe weiterer 500 μ l Nährmedium wurden die Bedingungen der Zellen für die spätere Inkubationsperiode optimiert. In sterilen multi-well Platten erfolgte die Stimulation der Monozyten mit LPS. Um die Sekretion der Zytokine aus den Zellen zu verhindern, erfolgte daraufhin die Zugabe von Monensin zur Blockade des Golgiapparates. Für jeden Probanden wurde zudem eine unstimulierte Probe angesetzt, die mit Ausnahme der Stimulation durch LPS auf die gleiche Art und Weise wie die stimulierten Proben behandelt wurde. Im Anschluss wurden die Vollblutproben bei einer Temperatur von 37°C in einer Atmosphäre, die mit 5 % CO₂ angereichert war, inkubiert.

Protokoll:

Folgende Arbeitsschritte sind unter sterilen Bedingungen durchzuführen:

- Vollblut mit Nährmedium auf 5×10^6 Leukozyten bei Erwachsenenblut und 2×10^6 Leukozyten bei Nabelschnurblut verdünnen.
- 1000 μ l Zellverdünnung unter sterilen Bedingungen mit 500 μ l Nährmedium versetzen
- Stimulation mit 50 μ l LPS
- Nach 1 Minute Zugabe von 50 μ l Monensinansatz
- Im Brutschrank bei 37° C und 5 % Kohlenstoffdioxid kultivieren

Ausgehend von diesem Standardprotokoll wurde der Vollblutansatz vor Stimulation unterschiedlich vorinkubiert. Über die verwendeten Konzentrationen informiert Tabelle 1.

Tab. 1 Vorinkubation des Vollblutansatzes

Zusatz	Konzentration	Inkubationszeit
Rekombinantes Interleukin-10	<u>Stocklösung:</u> 50 µg/ml rIL10 Aufbewahrung mit BSA (2,5 mg/ml) versetzt bei -80°C <u>Konzentrationen im Ansatz:</u> Konzentration 1: 0,01 ng/ml Konzentration 2: 0,1 ng/ml Konzentration 3: 1 ng/ml	2 h
Dexamethason	<u>Konzentration im Ansatz:</u> Konzentration 1: 10 ⁻⁷ M Konzentration 2: 10 ⁻⁵ M	1 h
Anti-TNF-α-Antikörper	<u>Stocklösung:</u> 1 mg/ml Aufbewahrung unverdünnt bei +4°C <u>Konzentration im Ansatz:</u> Konzentration 1: 30 ng/ml Konzentration 2: 1,2 µg/ml	2 h

3.9 Zellfixation

Je nach Vorgabe der kinetischen Experimentierangabe wurden die Kulturen nach bestimmten Inkubationszeiten in Spitzbodenröhrchen überführt und mit HBSS bei 360 g 10 min gewaschen. Daraufhin erfolgte die Fixation der Leukozyten während einer zehnminütigen Inkubation mit 1 ml 4 % Paraformaldehydlösung. Nach einem weiteren Waschgang mit HBSS wurden die Leukozyten für 16 Stunden in Dunkelheit in Magermilchpulver resuspendiert, um unspezifische Bindungen abzufangen.

Protokoll:

- Überführung der Zellkulturen in Spitzbodenröhrchen, Verdünnung mit 5 ml HBSS und vortexen.
- Zentrifugation mit 360 g für 10 min bei Raumtemperatur, Überstand verwerfen.
- Zugabe von 1 ml 4 % PFA und vortexen.
- Inkubation für 10 min bei 4 °C, Verdünnung mit 5 ml HBSS und vortexen.

- Zentrifugation mit 360 g für 10 min bei Raumtemperatur, Überstand aspirieren und verwerfen.
- Resuspension der Zellen in 1 ml Magermilch 1 % für 16 h in Dunkelheit bei 4 °C.

Tab. 2 Reagenzien

Reagenz	Zusammensetzung
Nährmedium	19,2 ml RPMI 1640 + 200 µl Penicillin/ Streptomycin + 200 µl N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin 200 mM + 200 µl Nicht-essentielle Aminosäuren (NEA) + 200 µl Natriumpyruvat 100 mM
Lipopolysaccharid (LPS)	Stocklösung: 10 mg LPS auf 10 ml HBSS Eingesetzte Konzentrationen im Ansatz: 10 ng /ml 30 ng/ml 100 ng/ml
Monensinlösung	Stocklösung: 69,29 mg Monensin (Molekulargewicht 692,9 g/l) ad 10 ml Ethanol Arbeitsverdünnung 1%= 100 µM Konzentration im Ansatz: 3,1 µM
HBSS	HANK´s Balanced Salts für 1 l + 1 l Aqua dest + 350 mg NaHCO ₃
Paraformaldehydlösung (PFA) 4 % Hoch karzinogen	1 g PFA + 25 ml HBSS bei 57°C in 1 h lösen, bei +4 °C 3 Tage haltbar
Magermilchlösung 5 %	2,5 mg Magermilchpulver auf 50 ml PBS-2 bei +4 °C lagern
Saponinlösung	98 ml HBSS + 1ml 10 % Saponin + 1ml 1M HEPES

3.10 Die Durchflusszytometrie

3.10.1 Permeabilisierung und Färbung der Zellen

Die Färbung der Zellen wurde mit Hilfe von spezifischen fluoreszenz-konjugierten monoklonalen Antikörpern (Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) gemäß dem von Pharmingen empfohlenen Protokoll durchgeführt. Um die intrazelluläre Färbung der Zytokine zu ermöglichen, wurde zunächst die Zellmembran der Leukozyten mit Hilfe einer Saponinlösung permeabilisiert. Zur Markierung der Monozytenpopulation wählten wir einen Phycoerythrin (PE) -konjugierten CD-14 spezifischen Oberflächenantikörper. Die Zytokine IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10 und TNF- α wurden in den jeweiligen Ansätzen durch zytokinspezifische Fluorescein-Isothiocyanate (FITC) -konjugierte Antikörper angefärbt. Als Negativkontrolle diente die Vorinkubation mit unkonjugierten spezifischen Antikörpern des jeweiligen Zytokines im Überschuss (Schultz et al. 2002b). Nach einem Waschvorgang mit Saponinlösung zur Entfernung der überschüssigen Antikörper wurden die angefärbten Zellen in HBSS- Puffer resuspendiert und bis zur Messung bei +4 °C dunkel aufbewahrt.

Protokoll:

- Zentrifugation der Zellen bei Raumtemperatur mit 360 g für 10 min, Überstand verwerfen
- Resuspension der Zellen in 1000 μ l Saponinlösung (= Zelllösung).
- Die fluoreszenz-konjugierten Antikörper in Fluorescence-Activated-Cell-Sorter (FACS) - Röhren vorlegen:
- Pipettierschema:
 - 10 μ l CD14-PE Oberflächenantikörper unverdünnt
 - 10 μ l mit PBS-1 1:10 verdünnte mit FITC-konjugierte Zytokinantikörper
 - Negativkontrolle: 10 μ l des unkonjugierten Antikörpers
- In alle Proben 200 μ l Zelllösung pipettieren, vortexen.
- Inkubation für 20 min bei +4° C.
- Alle Proben mit 1000 μ l Saponinlösung auffüllen, vortexen.

- Alle Proben bei 270 g 5 min abzentrifugieren und den Überstand verwerfen.
- In die Proben mit unkonjugierten Antikörpern nun 10 µl des jeweiligen 1:10 verdünnten FITC-konjugierten Antikörper pipettieren, vortexen, inkubieren und waschen wie zuvor.
- Alle Zellsedimente nun in jeweils 500 µl HBSS aufnehmen.
- Resuspendierte Leukozyten bis zur Messung bei +4 °C dunkel aufbewahren.

Tab. 3 Monoklonale Antikörper

Fluoreszenz-konjugierte Antikörper	Klon
IL-1 α - FITC	364-3B3-14, Maus IgG1
IL-6 - FITC	MQ2-13A5, Ratte IgG1
IL-8 - FITC	G265-8, Maus IgG2b
IL-10 - FITC	JES3-19F1, Ratte IgG2a
TNF- α - FITC	MAb11, Maus IgG1
CD14 - PE	M5E2, Maus IgG2a

3.10.2 Die durchflusszytometrische Messung

Die zweifarb-durchflusszytometrische Messung wurde mit Hilfe des Coulter EPICS XL mit dem System IITM, Version 1.0 Software durchgeführt. Vor jeder Messung fand eine Kalibrierung mit dem von der Firma Coulter empfohlenen Beadstest statt, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Für jede Probe wurden insgesamt 2000 CD14-positive Zellen untersucht. Die Grenze zwischen positiven und negativen Ereignissen wurde gemäß der antikörperblockierenden Negativkontrolle festgelegt. Die Daten wurden als Prozentzahl der CD14-positiven Monozyten ausgedrückt.

3.11 Die Messung mittels ELISA

Die Messungen mittels Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) wurden mit einem kommerziellen Kit gemäß dem von der Firma für Zellkulturüberstände

vorgegebenen Protokoll durchgeführt. Die Optische Dichte wurde photometrisch mit Hilfe des ELISA reader Spectra Classic bei 405 nm ermittelt und gegen eine Standardkurve aufgetragen. Die Sensitivität der Assays betrug 5 pg/ml für IL-10, 3 pg/ml für IL-6, 8 pg/ml für IL-8 und 10 pg/ml für TNF- α . Die Zytokinspiegel lagen bei allen stimulierten Proben innerhalb der Nachweisgrenzen des Assays.

Der Vollblutansatz wurde wie unter 3.8 beschrieben mit 2×10^6 Zellen vorbereitet und nach Stimulation durch 100 ng/ml LPS ohne Zusatz von Monensin bei 37 °C, in einer mit 5% CO₂ angereicherten Atmosphäre kultiviert. Nach Ablauf der von der Versuchskinetik abhängigen Inkubationszeit wurden die Zellen bei 360 g für 10 min zentrifugiert und die Überstände bis zur Messung bei -80 °C tiefgefroren. Bei allen Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

3.12 Statistische Auswertung

Das Studiendesign der vorgestellten Arbeit war experimentell und prospektiv. Die Rekrutierung der Probanden erfolgte im Rahmen einer Querschnittsstudie. Die Daten wurden als Median und 25.-75. Perzentile (Perz.) angegeben. Zur Darstellung des Einflusses verschiedener Substanzen auf die Zytokinproduktion wurde die Ausgangsprobe ohne die zu untersuchende Substanz als 100 % definiert und die Abweichung in Prozent angegeben. Die Daten waren nicht in allen Gruppen normalverteilt. Es wurden deshalb für die Vergleiche nicht-parametrische Tests eingesetzt. Das Vorliegen eines statistisch signifikanten Unterschiedes zwischen allen Gruppen wurde zunächst mit dem Kruskal-Wallis-Test geprüft. Statistische Vergleiche zwischen den einzelnen, nicht abhängigen Gruppen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Die voneinander abhängigen Proben wurden mit Hilfe des Wilcoxon-Tests verglichen. Das Signifikanzniveau wurde als $\alpha = 0,05$ festgelegt. Bei Durchführung mehrerer Vergleiche zwischen den Gruppen erfolgte eine Korrektur des Signifikanzniveaus nach Bonferroni ($\alpha' = 0,05/4 = 0,0125$). Der Mann-Whitney-U-Test wurde als zweiseitiger Test verwandt. Korrelationen wurden mit Hilfe des Spearman-Rank-Tests ermittelt. Alle statistischen Analysen wurden mit dem Computerprogramm SPSS® 9.0 Statistik Software (SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.) erstellt. Die graphische Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm SigmaPlot 2000® Version 6.0, Graphik Software (SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.).

4 Ergebnisse

4.1 IL-6- und IL-8-Produktion Frühgeborener

Zur Charakterisierung der Fähigkeit Frühgeborener (FG), proinflammatorische Zytokine zu bilden, wurde die IL-6- und IL-8-Produktion mit Erwachsenen (Erw) verglichen. Das Frühgeborenenkollektiv wurde dazu in 3 Gruppen unterteilt: oberhalb der 32. Schwangerschaftswoche (SSW) (n = 36), unterhalb 32. SSW (n = 27) und elf Frühgeborene unterhalb der 32. SSW, die an einer systemischen Infektion erkrankten und daher gesondert betrachtet wurden. Als Kriterien für eine systemische Infektion galten 1.) eine positive Blutkultur 2.) eine histologisch nachgewiesene Chorioamnionitis, 3.) klinische Zeichen einer Sepsis (Tachykardie, Tachypnoe, Temperaturanstieg, etc.) oder 4.) ein erhöhter Wert des C-reaktiven Proteins (CRP). 55 der 74 Frühgeborenen wurden zur Akzeleration der Lungenreife pränatal gemäß der National Institute of Health (NIH) Konsensuskonferenz mit Kortikosteroiden behandelt (NIH consensus conference 1995). Bei keinem der Neugeborenen bestanden Hinweise auf eine kongenitale Malformation. Tab. 4 gibt einen Überblick über weitere klinische Informationen, die postnatal während des stationären Aufenthaltes erhoben wurden. Als Vergleich diente eine Gruppe gesunder Erwachsener (n = 50).

Tab. 4 Kollektiv der Frühgeborenen

Gruppe ¹	1	2	3
Anzahl	36	27	11
Gestationsalter (SSW) Median	34,1	30,6	27,3
Minimum/ Maximum	32.1-36.7	26.1-31.9	24.6–29.9
Geburtsgewicht (g) Median	2180	1315	765
Minimum/ Maximum	1135–3140	625-2100	520-1390
Männlich/ Weiblich	17/19	11/16	6/5
Sectio caesarea	29 (81 %)	27 (100%)	10 (91 %)
Pränatale Kortikosteroidtherapie	18 (50%)	26 (96%)	11 (100%)
< 24h vor Geburt	1 (3%)	6 (22%)	2 (18%)
< 48h vor Geburt	3 (8%)	13 (48%)	6 (55%)
1-min-Apgar-Wert < 7	1 (3%)	2 (7%)	3 (27%)
Nabelarterien-pH < 7,1	1 (3%)	-	1 (9%)
Histologischer Chorioamnionitis-nachweis	-	-	6 (55%)
CRP > 15 mg/l	-	-	5 (46%)
Positive Blutkultur	-	-	2 (18%)
Atemnotsyndrom	5 (14%)	23 (85%)	8 (73%)
Chronische Lungenerkrankung ²	-	-	2 (18%)
Intraventrikuläre Hämorrhagie I-II	1 (3%)	4 (15%)	-
Intraventrikuläre Hämorrhagie > II	-	1 (4%)	-
Periventrikuläre Leukomalazie	-	1 (4%)	1 (9%)
Tod im ersten Lebensmonat	-	1 (4%)	2 (18%)

¹ Gruppe 1: Frühgeborene > 32 SSW, Gruppe 2: Frühgeborene < 32 SSW, Gruppe 3: Frühgeborene < 32 SSW mit nachgewiesener Infektion

² Chronische Lungenerkrankung wurde gemäß Bancalari durch Sauerstoffbedarf am 28. Lebenstag definiert.

4.1.1 Spontane IL-6- und IL-8-Produktion Frühgeborener

Die Untersuchung der unstimulierten Ansätze ermöglicht Aussagen über die spontane Zytokinproduktion der Monozyten. In allen untersuchten Gruppen war die Anzahl der IL-6-bildenden Monozyten ohne Stimulation in-vitro deutlich geringer als die der IL-8-bildenden Monozyten. Frühgeborene oberhalb der 32. SSW verfügten über deutlich mehr

IL-6-bildende Monozyten als Erwachsene (Median, 25.- 75. Perz.: 2 %, 1,2- 3,5 % versus 0,8 %, 0,6- 1,6 %; $p < 0,0001$). Auch bei Frühgeborenen unterhalb der 32. SSW mit Infektion war der Prozentsatz der IL-6-bildenden Monozyten deutlich höher als bei den Erwachsenen (3,6 %, 1,4- 10,8 % versus 0,8 %, 0,6- 1,6 %; $p < 0,0001$). Im Rahmen einer Infektion zeigten die Frühgeborenen unterhalb der 32. SSW erwartungsgemäß höhere IL-6-Werte als ihre Altersgenossen ohne Hinweise auf eine Infektion (3,6 %, 1,7- 9,4 % versus 1,3%, 0,8- 2,8 %, $p < 0,01$). Die Anzahl der IL-6-positiven Monozyten bei Frühgeborenen unterhalb der 32. SSW war vergleichbar mit der bei Erwachsenen (1,3 %, 0,8 - 2,8 %, versus 0,8 %, 0,6- 1,6 %; $p = 0,015$) (s. Abb. 1).

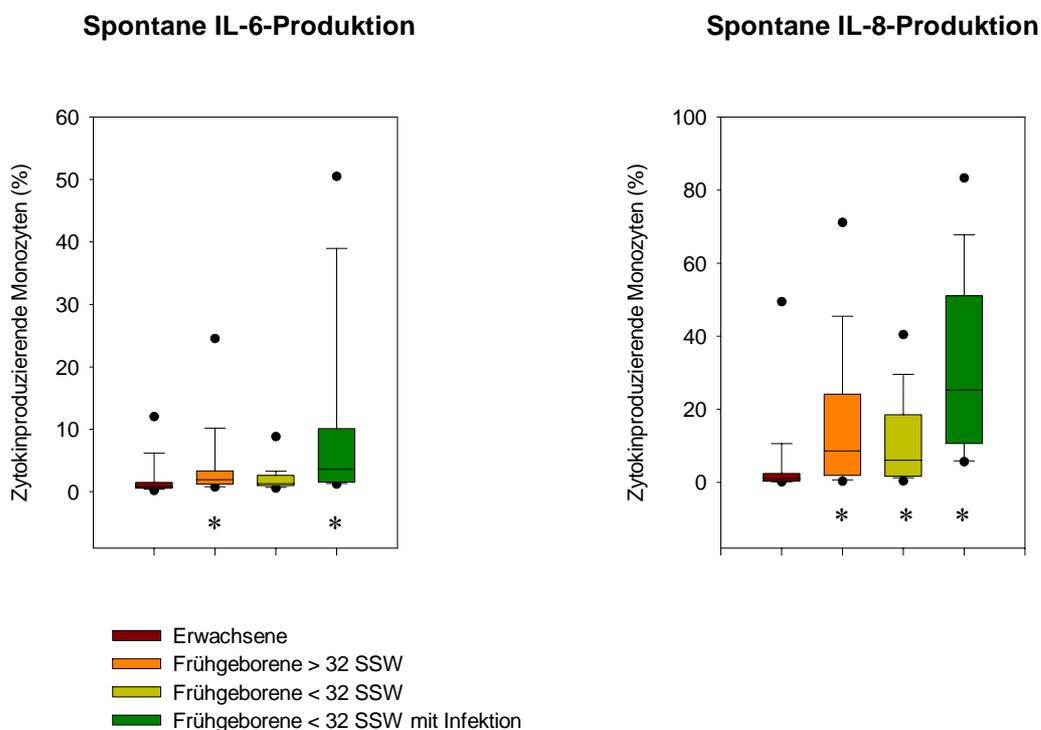


Abb. 1 Spontane IL-6- und IL-8-Bildung bei Frühgeborenen

Die durchflusszytometrische Analyse der spontanen Zytokinproduktion zeigt eine signifikant höhere IL-6 und IL-8-Bildung bei Frühgeborenen über und unter 32 SSW im Vergleich zu Erwachsenen. Die Daten sind in Box Plots mit Darstellung der 5., 10., 25., 50., 75., 90. und 95. Perzentile ausgedrückt. Die Unterschiede im Vergleich mit der Kontrollgruppe der Erwachsenen waren wie angegeben signifikant mit $p < 0,0001$ (*).

Die Unterschiede der Menge der IL-8-bildenden Zellen waren noch deutlicher. Der Prozentsatz der spontan IL-8-bildenden Zellen war sowohl bei Frühgeborenen oberhalb der 32. SSW als auch bei Frühgeborenen unterhalb der 32. SSW deutlich höher als bei

Erwachsenen (8,6 %, 1,8- 24,2 % und 6 %, 1,6- 19,4 % versus 1,1 %, 0,3 – 2,5 %; $p < 0,0001$). Der höchste Anteil spontan IL-8-produzierender Zellen zeigte sich in der Gruppe der Frühgeborenen unterhalb der 32. SSW mit einer nachgewiesenen Infektion (25,3 %, 8,6- 53,8 % versus Erwachsene 1,1 %, 0,3- 2,5 %; $p < 0,0001$) (s. Abb. 1).

4.1.2 IL-6- und IL-8-Produktion Frühgeborener nach Stimulation

In-vivo ist die Zytokinbildung ständig wechselnden Einflüssen unterworfen. Zur Beurteilung der Fähigkeit Frühgeborener, Zytokine zu bilden, wählten wir daher ein ex-vivo-Sepsis-Modell, das für den Vergleich mit Erwachsenen standardisierte Ausgangsbedingungen bietet. Die Stimulation der Monozyten zur Zytokinbildung erfolgte im Vollblutassay mit 30 ng/ml Lipopolysaccharid. In allen untersuchten Gruppen beobachteten wir eine signifikante Steigerung der IL-6- und IL-8-Bildung nach Stimulation mit LPS im Vergleich zur spontanen Zytokinbildung in-vitro. Der Vergleich der Anzahl IL-6-bildender Monozyten nach Stimulation zeigte leicht höhere Werte bei den Frühgeborenen oberhalb der 32. SSW als bei den Erwachsenen (57,6 %, 50,7- 66,7 % versus 51,8 %, 43,2- 59,6 %; $p = 0,016$). Der Prozentsatz der IL-6-positiven Zellen bei Frühgeborenen unterhalb der 32. SSW war hingegen niedriger als bei der Kontrollgruppe (43,2 %, 33,6- 49,8 % versus 51,8 %, 43,2- 59,6 %; $p = 0,002$). Die Frühgeborenen unterhalb der 32. SSW, die wegen einer erwiesenen Infektion gesondert betrachtet wurden, zeigten eine mit den Erwachsenen vergleichbare IL-6-Produktion (53,9 %, 48,4- 61,2 % versus 51,8 %, 43,2- 59,6 %; $p = 0,6$). Selbst nach Stimulation mit LPS zeigten sie eine deutlich höhere IL-6-Bildung als ihre Altersgenossen, bei denen keine Infektion vorausgegangen war (53,9 %, 48,4- 61,2 % versus 43,2 %, 33,6- 49,8 %; $p < 0,01$) (s. Abb.2).

Der Anteil der IL-8-bildenden Monozyten nach Stimulation war bei den Frühgeborenen oberhalb der 32. SSW deutlich höher als der bei den Erwachsenen (83,6 %, 75,6- 88,1 % versus 68,9 %, 62,8- 74,7 %; $p < 0,0001$). Der Prozentsatz der IL-8-positiven Zellen der Frühgeborenen unterhalb der 32. SSW ohne Infektion war gegenüber dem bei Erwachsenen leicht erhöht (75,4 %, 66,4- 84,6 % versus 68,9 %, 62,8- 74,7 %; $p = 0,01$). Die Frühgeborenen unterhalb der 32. SSW mit nachgewiesener Infektion zeigten eine deutlich höhere Anzahl IL-8-positiver Monozyten als die Erwachsenen (88,3 %, 75,8- 91,4 % versus 68,9 %, 62,8- 74,7 %; $p < 0,0001$) (s. Abb. 2).

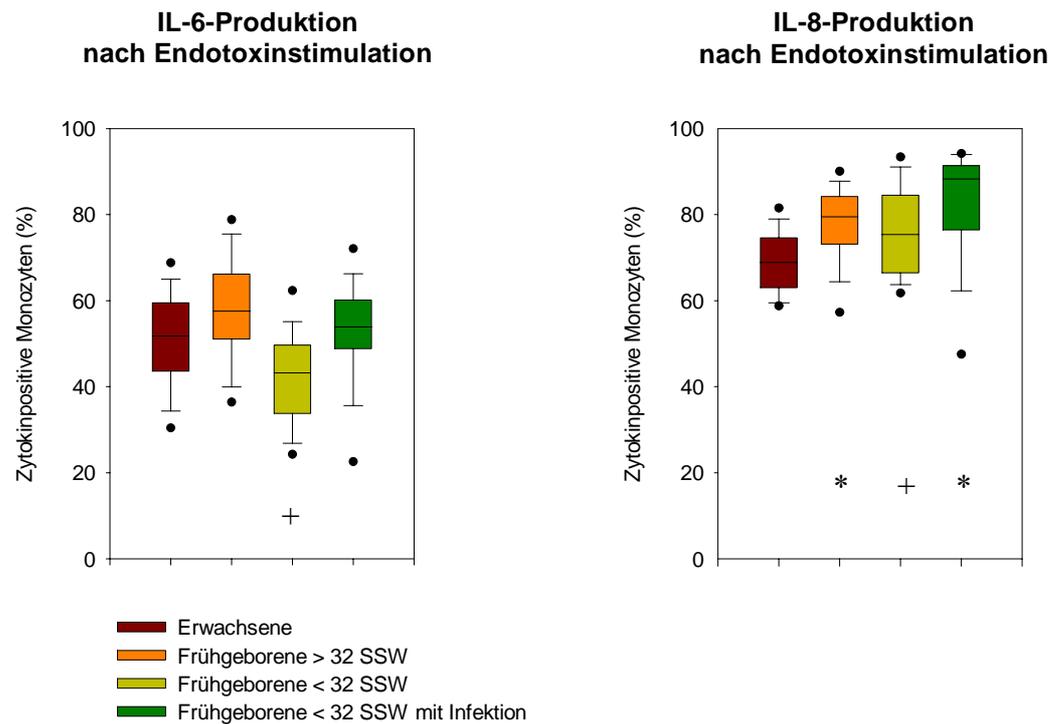


Abb. 2 IL-6- und IL-8-Produktion nach Stimulation mit Endotoxin.

Auf die Stimulation mit Lipopolysaccharid reagierten die Frühgeborenen über 32 SSW mit höheren IL-6- und IL-8-Werten als die Erwachsenen, während Frühgeborene unter 32 SSW im Vergleich mit Erwachsenen weniger IL-6, jedoch vergleichbare Mengen IL-8 bildeten. Bei Vorliegen einer neonatalen Infektion steigerte sich die Zytokinbildung Frühgeborener unter 32 SSW auf IL-6 und IL-8 Mengen, die mit denen der Erwachsenen vergleichbar waren. Die Daten sind in Box Plots mit Darstellung der 5., 10., 25., 50., 75., 90. und 95. Perzentile dargestellt. Die Unterschiede im Vergleich mit der Kontrollgruppe der Erwachsenen waren wie angegeben signifikant mit $p \leq 0,01$ (+) und $p < 0,0001$ (*).

4.1.3 Messung proinflammatorischer Zytokine im Zellkulturüberstand

Die extrazelluläre Messung der Bildung von IL-6, IL-8 und TNF- α im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA durchgeführt. Verglichen wurden Frühgeborene unterhalb der 32. SSW und Reifgeborene (RG) mit Erwachsenen. Die Gruppen bestanden aus jeweils sechs Probanden. Das mittlere Gestationsalter der Frühgeborenen betrug 28+4 SSW (Spannweite: 27+2 bis 30+3 SSW). Die Menge des nach Stimulation mit LPS gebildeten TNF- α war in der Erwachsenenkontrollgruppe deutlich größer als bei den Reifgeborenen (Median, 25.- 75. Perz.: 984 pg/ml, 846- 1524 pg/ml versus 352 pg/ml, 318- 462 pg/ml; $p < 0,01$) und Frühgeborenen (984 pg/ml, 846-1524 pg/ml versus 240 pg/ml, 188- 289 pg/ml; $p < 0,01$) (Abb. 3A). Hingegen war die IL-6-Produktion nach Stimulation

bei Reifgeborenen und Erwachsenen vergleichbar (4084 pg/ml, 3962- 4351 pg/ml versus 4991 pg/ml, 4253- 5977 pg/ml; $p = 0,26$), während die der Frühgeborenen im Vergleich mit Erwachsenen deutlich vermindert war (1724 pg/ml, 1452- 2212 pg/ml versus 4991 pg/ml, 4253- 5977 pg/ml; $p < 0,01$) (Abb. 3B). Die Untersuchung der Fähigkeit zur Bildung von IL-8 ergab die höchsten Werte in der Gruppe der Reifgeborenen (11306 pg/ml, 8574- 12553 pg/ml [RG] versus 1759 pg/ml, 1422- 1821 pg/ml [Erw.]; $p < 0,01$), gefolgt von den Frühgeborenen (2503 pg/ml, 2160- 3065 pg/ml [FG]; $p = 0,01$) und den Erwachsenen (Abb. 3C).

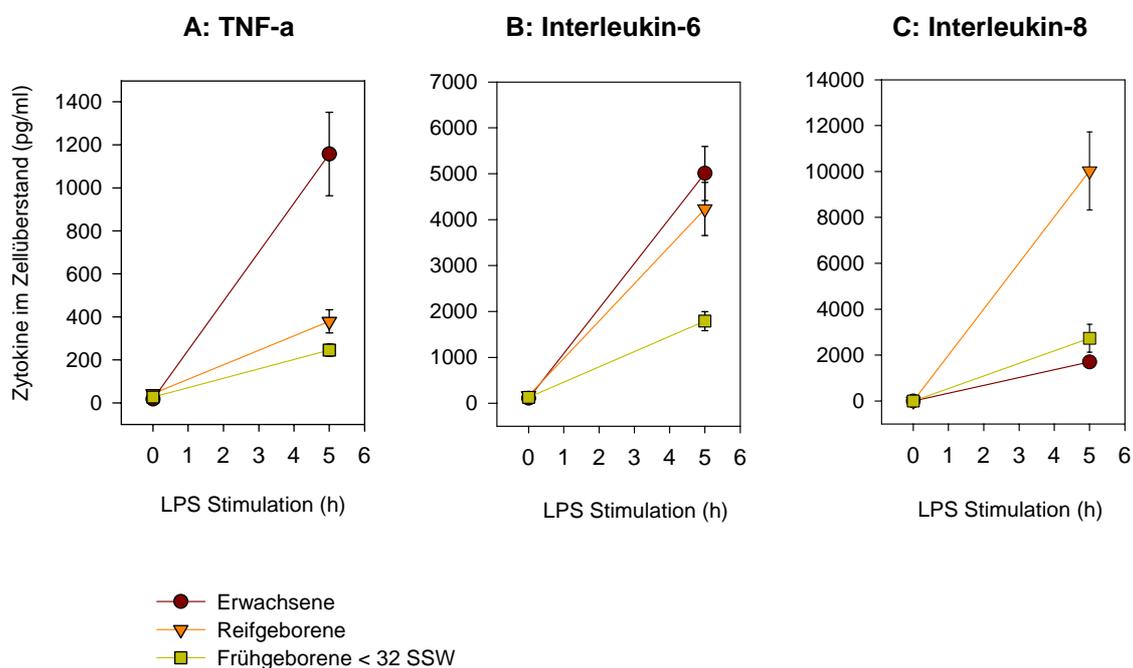


Abb. 3 Proinflammatorische Zytokine im Zellüberstand nach Endotoxinstimulation.

Die Bildung von TNF- α (A) nach Stimulation mit LPS war bei Erwachsenen deutlich höher als bei Frühgeborenen unterhalb der 32. SSW und Reifgeborenen ($p < 0,01$). Auch die IL-6-Produktion war gegenüber Frühgeborenen unterhalb der 32. SSW bei Erwachsenen deutlich erhöht ($p < 0,01$), Reifgeborene hingegen bildeten vergleichbare Mengen IL-6 wie die Erwachsenen (B). Die Produktion von IL-8 war bei den Reifgeborenen am höchsten ($p < 0,01$), gefolgt von Frühgeborenen unterhalb der 32. SSW und Erwachsenen. Die Daten sind dargestellt durch den Mittelwert und die Standardabweichung.

4.1.4 Korrelation zwischen Zytokinproduktion und Gestationsalter

Es war eine leicht positive Korrelation zwischen dem Gestationsalter und der Häufigkeit der IL-6-produzierenden Monozyten nach Endotoxinstimulation in-vitro zu beobachten ($r = 0,55$; $p < 0,01$). Es bestand jedoch keine Korrelation zwischen dem Gestationsalter

und der Anzahl IL-8-produzierender Monozyten ($r = 0,12$). Dies spricht für eine gut ausgebildete IL-8-Produktion schon bei sehr unreifen Frühgeborenen.

4.1.5 Einfluss des Geburtsmodus auf die Zytokinproduktion

Zytokine spielen bei der Auslösung der Geburt eine wichtige Rolle (Opsjón et al. 1993). Es ist daher denkbar, dass der Geburtsmodus eine Auswirkung auf die Zytokinbildung zum Zeitpunkt der Geburt hat. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde die Menge der zytokinpositiven Zellen im Nabelschnurblut nach spontaner Entbindung und nach elektiver Sectio caesarea unter Berücksichtigung des Gestationsalters verglichen. In der Gruppe der Frühgeborenen oberhalb 32. SSW bestand keine Korrelation zwischen der Entbindungsart und der Häufigkeit der IL-6- und IL-8-produzierenden Monozyten. Für die Frühgeborenen unterhalb 32. SSW konnte kein Vergleich aufgestellt werden, da bei allen Frühgeborenen dieser Gruppen eine Sectio caesarea durchgeführt wurde.

4.1.6 Einfluss der pränatalen Glukokortikosteroidgabe auf die Zytokinproduktion bei Frühgeborenen

Der Anteil IL-6-positiver Monozyten nach Stimulation mit LPS war in der Gruppe der Frühgeborenen, die pränatal mit Glukokortikosteroiden behandelt wurden ($n = 44$), niedriger als in der Gruppe der Frühgeborenen, die keine Glukokortikosteroide erhielten ($n = 19$) (Median, 25.-75. Perzentile: 48,3 %, 39,9- 54,4 % versus 63,4 %, 53,6- 72,4 %, $p < 0,0001$). Dabei ist jedoch zu beachten, dass das Reifealter bei dem Großteil der Frühgeborenen, die keine Glukokortikosteroide erhielten, oberhalb der 32. SSW (18 von 19: 95 %) lag, während die Mehrheit der pränatal mit Glukokortikosteroiden behandelten Frühgeborenen ein Reifealter unterhalb der 32. SSW besaßen ($< 32. SSW$: 26 von 44: 59 %). Aus ethischen Gründen war es nicht möglich, eine bezüglich des Gestationsalters passende Kontrollgruppe ohne Lungenreifeinduktion zu rekrutieren. Der niedrigere Anteil IL-6-positiver Monozyten in der Gruppe der Frühgeborenen, die Glukokortikosteroide pränatal erhielten, könnte demnach auch Folge des niedrigeren Gestationsalters sein. Ein Einfluss der pränatalen Glukokortikosteroidgabe auf die Anzahl der IL-8-bildenden Zellen

nach Stimulation mit LPS ($p = 0,1$) oder auf die zytokinpositiven Zellen (IL-6: $p = 0,7$ und IL-8: $p = 0,5$) ohne Stimulation konnte nicht nachgewiesen werden.

4.2 Hemmung der IL-6- und IL-8-Produktion durch Dexamethason in-vitro

Der Einfluss von Glukokortikosteroiden auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine bei Frühgeborenen im Vergleich zu Erwachsenen wurde in Vollblutproben nach einstündiger Vorinkubation mit Dexamethason untersucht. Dabei wurde die oben beschriebene Einteilung beibehalten: Frühgeborene oberhalb 32. SSW ($n = 10$), unterhalb 32. SSW ($n = 8$) und unterhalb 32. SSW mit systemischer Infektion ($n = 7$) im Vergleich zu Erwachsenen (IL-6: $n = 16$ und IL-8: $n = 14$). Die verwendeten Konzentrationen entsprachen den Serumspiegeln eines mit der Standarddosis Dexamethason behandelten Frühgeborenen mit niedrigem Geburtsgewicht (Schild and Charles 1994). Die Messung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Es zeigte sich ein dosisabhängiger hemmender Effekt des Dexamethasons auf die Zytokinproduktion, der sich in allen vier untersuchten Gruppen stärker auf die IL-6- (Spannweite: 43-80 % vom Ausgangswert ohne Dexamethason [= 100 %]) als auf die IL-8- (Spannweite: 17- 67 %) Bildung auswirkte. Am deutlichsten reagierten im Vergleich zu den Erwachsenen die Frühgeborenen unterhalb der 32. SSW auf Dexamethason der Konzentration 10^{-7} M mit einer Senkung der IL-6- (Mittelwert [MW]: 74 % versus 50 %; $p = 0,03$) und IL-8-Synthese (55 % versus 26 %; $p = 0,03$). Frühgeborene oberhalb der 32. SSW zeigten nach Vorinkubation mit 10^{-5} M Dexamethason eine schwächere Reduktion der IL-8-Synthese als Erwachsene (35 % versus 62 %; $p = 0,005$) (s. Abb. 4).

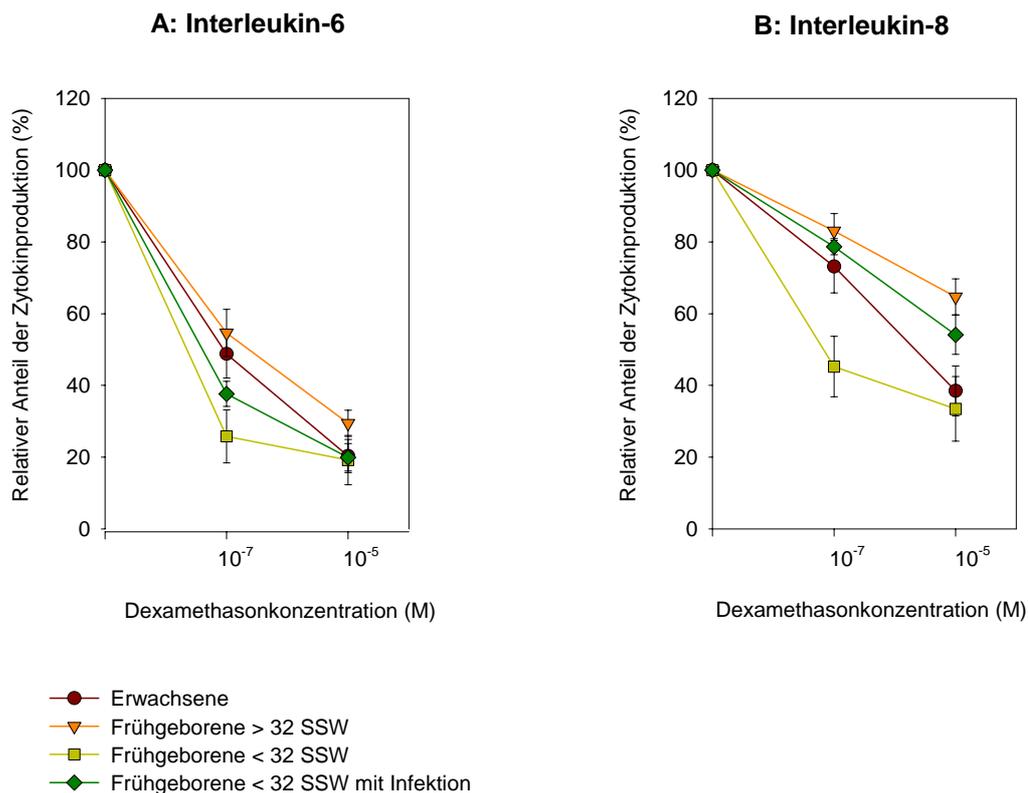


Abb. 4 Hemmung der Bildung von IL-6 und IL-8 durch Kortikosteroide.

Dexamethason bewirkt eine dosisabhängige Hemmung der Zytokinproduktion, die in allen untersuchten Gruppen für IL-6 deutlich stärker ausgeprägt ist als für IL-8. Dabei ist die Suppression der Bildung beider Zytokine deutlich stärker bei Frühgeborenen unter 32 SSW als bei Erwachsenen ausgeprägt. Bei Frühgeborenen über 32 SSW bewirkte 10⁻⁵ M Dexamethason eine schwächere Hemmung der IL-8 Produktion als bei Erwachsenen. Die Daten sind dargestellt durch den Mittelwert und die Standardabweichung.

4.3 Bildung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 bei Früh- und Reifgeborenen

IL-10 hat als antiinflammatorisches Zytokin regulierende Wirkung auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine. Die Bildungskapazität für IL-10 bei Reifgeborenen und Frühgeborenen unterhalb der 32. SSW wurde daher in den Vergleich mit einer Erwachsenenkontrollgruppe gestellt. Im Rahmen des oben beschriebenen Sepsismodells wurde die Fähigkeit zur Bildung von IL-10 nach Stimulation mit LPS sowohl auf zellulärer Ebene als auch im Zellkulturüberstand untersucht.

Zunächst wurde die Kinetik der Produktion von IL-10 bei Reifgeborenen (n = 5) im Vergleich zu Erwachsenen (n = 5) auf zellulärer Ebene mit Hilfe der Durchflusszytometrie

untersucht. Erwachsene und Reifgeborene wiesen schon nach 5 Stunden einen deutlichen Anstieg der IL-10-bildenden Zellen auf. Die höchste IL-10-Bildung konnte in beiden Gruppen nach 10 Stunden beobachtet werden, daraufhin folgte ein kontinuierlicher Abfall der IL-10-bildenden Zellen nach 18 und 24 Stunden. Zum Zeitpunkt 0 wiesen Erwachsene und Reifgeborene eine vergleichbare Anzahl IL-10 produzierender Monozyten auf (Median: 0,3 % versus 0,6 %) Der Anstieg der IL-10-Produktion nach 5 Stunden Inkubation war in der Erwachsenenkontrollgruppe deutlich stärker ausgeprägt als bei den Reifgeborenen. Der Unterschied in der Fähigkeit zur IL-10 Bildung zeigte sich am deutlichsten 10 Stunden nach Stimulation (Median, 25.- 75. Perz.: Erw. versus RG: 4,8 %, 3,7- 8,6 % versus 1,8 %, 0,9- 3,5 %; $p < 0,01$). Obwohl nach diesem Zeitpunkt in beiden Gruppen die Anzahl der IL-10 positiven Monozyten sank, übertraf die IL-10-Bildung der Erwachsenen sowohl 18 Stunden (4,4 %, 3,1- 6,6 % versus 1,6 %, 1,2- 1,8 %; $p < 0,01$) als auch 24 Stunden nach Stimulation die der Reifgeborenen (3,5 %, 1,8- 4,8 % versus 1,5 %, 0,5-2 %; $p < 0,05$) (s. Abb. 5).

Die Menge des Zytokins IL-10 im Zellkulturüberstand nach Stimulation wurde mittels ELISA gemessen. Verglichen wurden jeweils 6 Erwachsene, Reif- und Frühgeborene unterhalb der 32. SSW mit einem mittleren Gestationsalter von 28+4 SSW (Minimum [Min.]: 27+2; Maximum [Max.]: 30+3 SSW). In allen drei Gruppen konnte bis zum letzten Messzeitpunkt 24 Stunden nach Stimulation ein deutlicher, kontinuierlicher Anstieg der IL-10 Konzentrationen im Zellkulturüberstand beobachtet werden. Zum Ausgangszeitpunkt 0 ohne LPS-Stimulation wiesen alle untersuchten Proben nicht messbare Konzentrationen des Zytokins IL-10 auf. Nach Inkubation über fünf Stunden zeigte sich ein leichter Anstieg der IL-10-Konzentration auf vergleichbare Werte in allen drei Gruppen (Median: Erw, RG, FG < 32 SSW; 13,64 pg/ml, 12,09 pg/ml, 13,58 pg/ml). Deutliche Unterschiede in der IL-10-Produktion konnten hingegen 18 und 24 Stunden nach Stimulation festgestellt werden. Dabei wiesen die Proben der Erwachsenen die höchsten Werte auf, gefolgt von deutlich niedrigeren Werten in der Gruppe der Reifgeborenen und Frühgeborenen (18h: 643 pg/ml, 477- 981 pg/ml [Erw] versus 269 pg/ml, 121- 617 pg/ml [FG]; $p < 0,05$; 24h: 970 pg/ml, 654- 1777 pg/ml [Erw] versus 424 pg/ml, 220- 757 pg/ml [RG] und 441 pg/ml, 167- 893 pg/ml [FG]; $p < 0,05$) (s. Abb. 5).

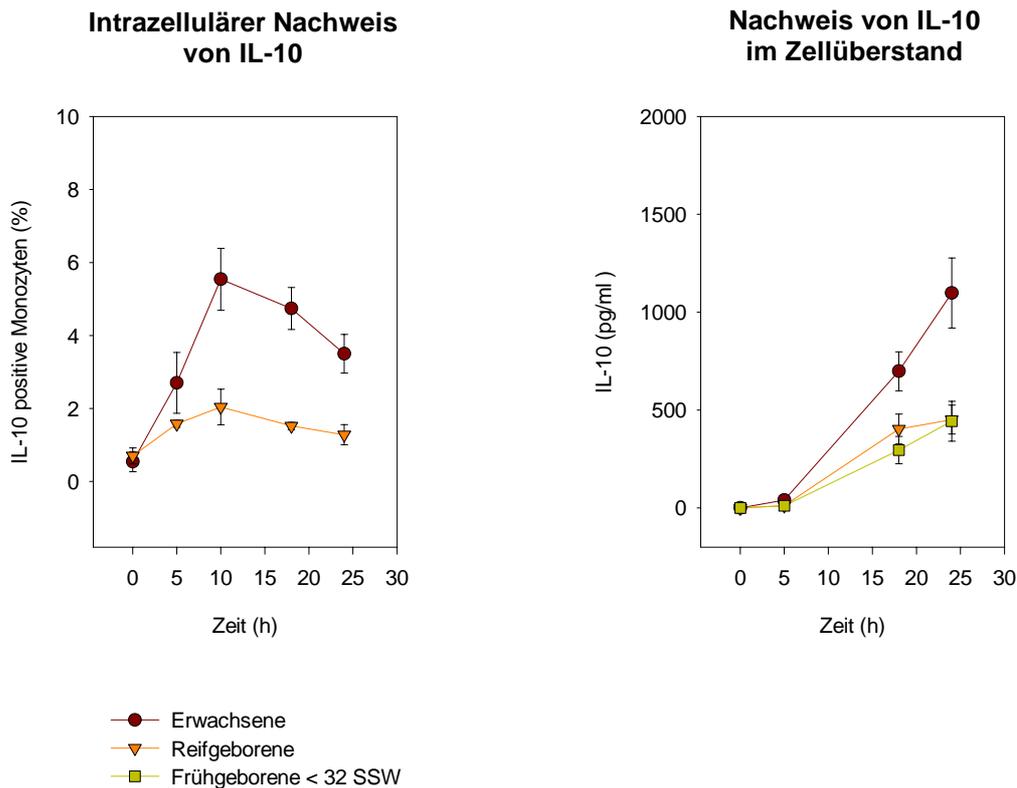


Abb. 5 IL-10-Bildungsfähigkeit bei Frühgeborenen und Reifgeborenen

Sowohl der intrazelluläre Nachweis (A) als auch die Messungen von IL-10 im Zellüberstand (B) zeigten eine deutlich geringere IL-10-Bildung nach Stimulation mit LPS bei Reif- und Frühgeborenen im Vergleich zu Erwachsenen. Die Daten sind durch den Mittelwert und die Standardabweichung dargestellt.

4.4 Hemmung der Bildung proinflammatorischer Zytokine durch TNF- α -Blockade in-vitro

TNF- α besitzt eine Schlüsselrolle für die proinflammatorische Immunantwort, indem er unter anderem die Sekretion weiterer proinflammatorischer Zytokine initiiert (Blackwell and Christman 1996). Daher muss davon ausgegangen werden, dass der Einsatz eines blockierenden Anti-TNF- α -Antikörpers die Sekretion diverser proinflammatorischer Zytokine beeinträchtigt. Untersucht wurde der Einfluss auf die Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-8. Die Messung mittels Durchflusszytometrie war für diese Fragestellung nicht geeignet, da durch die Blockade der sekretorischen Funktion der Zellen durch Monensin (s. Kap. 3.8) die parakrinen Eigenschaften der Zytokine nicht untersucht werden können. Daher wurde die Messung nach Stimulation mit LPS im Zellüberstand mittels ELISA durchgeführt. Bei Erwachsenen

(n = 4) und Reifgeborenen (n = 4) zeigte sich nach Stimulation über fünf Stunden eine deutliche Verminderung der TNF- α -Menge im Zellüberstand in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration des Anti-TNF- α -Antikörpers ($p < 0,05$) (s. Abb. 6). Eine Veränderung der Anzahl der IL-6- und IL-8-bildenden Monozyten war zu diesem Zeitpunkt in beiden Gruppen nicht nachweisbar. Bei verlängerter Stimulation mit LPS über 12, 24 und 36 Stunden konnte ein nicht-signifikanter Abfall der IL-8-Menge bei einer Konzentration des Anti-TNF- α -Antikörpers von 1,2 $\mu\text{g/ml}$ beobachtet werden. Die Bildung von IL-6 blieb über den gesamten Zeitraum der Untersuchung unbeeinflusst (s. Abb.7).

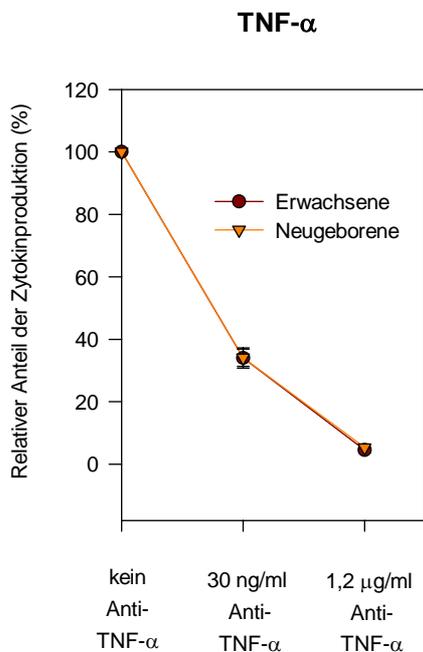


Abb. 6 Einfluss eines Anti-TNF- α -Antikörpers auf die Produktion von TNF- α .

Die Menge des nach Endotoxinstimulation über fünf Stunden nachweisbaren TNF- α war bei Erwachsenen und Reifgeborenen mit steigender Konzentration des eingesetzten Anti-TNF- α -Antikörpers deutlich vermindert. Die Daten sind durch Mittelwert und die Standardabweichung dargestellt.

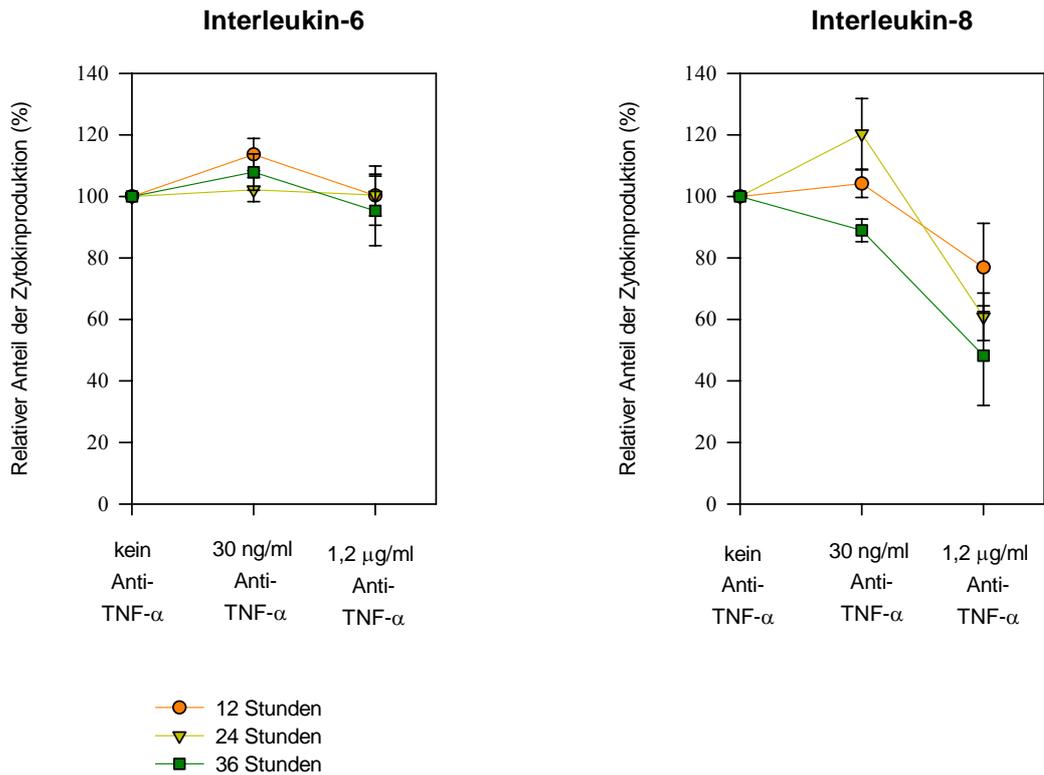


Abb. 7 Kinetik des Einflusses eines Anti-TNF- α -Antikörpers auf die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 bei Erwachsenen.

Die Vorinkubation mit einem blockierenden TNF- α -Antikörper zeigte auch nach verlängerter Inkubation mit LPS keinen Einfluss auf die Produktion von IL-6. Die Menge des nachweisbaren IL-8 nahm hingegen 36 Stunden nach Stimulationsbeginn in Abhängigkeit zur eingesetzten Konzentration des blockierenden Antikörpers nicht signifikant ab. Die Daten sind durch Mittelwert und die Standardabweichung dargestellt.

4.5 Hemmung der Produktion inflammatorischer Zytokine durch rekombinantes IL-10 in-vitro

Der Effekt von rekombinanten IL-10 (rIL-10) auf die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 α , IL-6, IL-8 und TNF- α bei Reifgeborenen und Frühgeborenen unterhalb der 32. SSW sollte mit der Wirkung bei Erwachsenen verglichen werden. Für alle drei Gruppen wurden 6 Probanden rekrutiert. Die Frühgeborenen besaßen ein mittleres Gestationsalter von 27+6 SSW (Min.: 25+4 SSW und Max.: 29+2 SSW). In allen drei Gruppen zeigte sich bei Konzentrationen ab 0,1 ng/ml ein deutlich hemmender Effekt von rIL-10 auf die Bildung aller untersuchten proinflammatorischen Zytokine. Der Einsatz von 0,01 ng/ml rIL-10 führte zu keinen signifikanten Veränderungen der Zytokinproduktion mit Ausnahme eines geringen Anstieges der Anzahl der IL-1-produzierenden Monozyten bei Frühgeborenen. Bemerkenswerterweise war der hemmende

Effekt des rIL-10 auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine bei Früh- und Reifgeborenen deutlich geringer ausgeprägt als bei Erwachsenen. So war die Reduktion der Anzahl der IL-1 α - und IL-8-bildenden Monozyten bei Reif- und Frühgeborenen unter Verwendung von 0,1 ng/ml rIL-10 signifikant weniger ausgeprägt als bei Erwachsenen ($p < 0,01$). Die höchste eingesetzte Konzentration von 1 ng/ml rIL-10 führte bei Früh- und Reifgeborenen zu einem deutlich geringeren Abfall der Produktion aller vier untersuchten inflammatorischen Zytokine im Vergleich zu Erwachsenen ($p < 0,005$) (s. Abb.8).

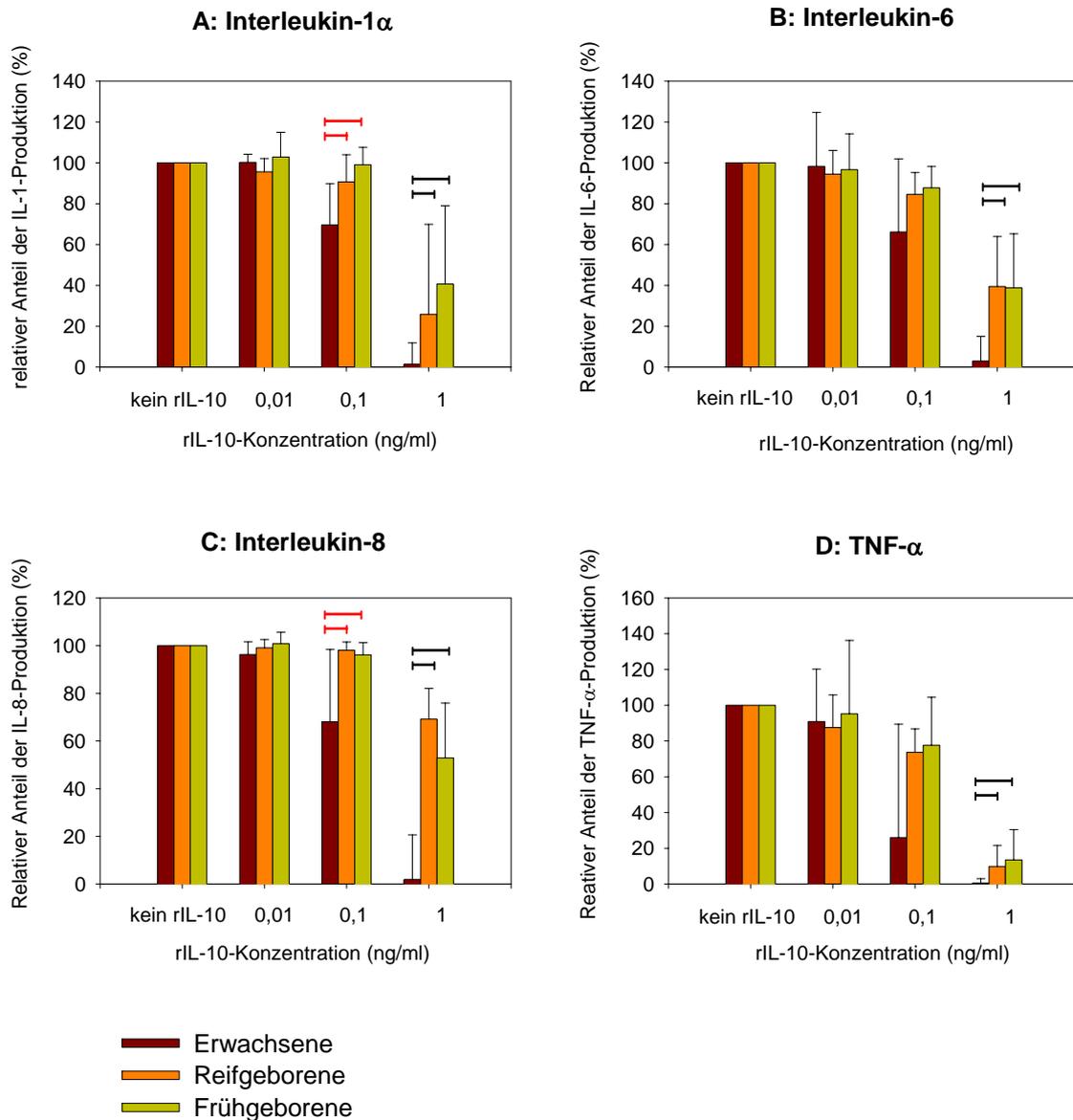


Abb. 8 Einfluss von rekombinanten IL-10 auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine

Untersucht wurde der Einfluss von rekombinanten IL-10 auf die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 α , IL-6, IL-8 und TNF- α bei Frühgeborenen unterhalb der 32. SSW und Reifgeborenen im Vergleich zu Erwachsenen. In allen drei Gruppen war nach Einsatz von rekombinanten IL-10 in Konzentrationen ab 0,1 ng/ml ein deutlicher suppressiver Effekt auf die Bildung aller vier untersuchten proinflammatorischen Zytokine festzustellen. Diese Hemmung war bei Erwachsenen deutlich stärker ausgeprägt als bei reifen Neugeborenen und Frühgeborenen unterhalb der 32. SSW. Die Daten sind durch den Median und die Spannweite dargestellt. p < 0,01: roter Balken; p < 0,005: schwarzer Balken.

5 Diskussion

Infektionen sind bei Frühgeborenen die Hauptursache erhöhter Morbidität und Mortalität. Die Ursache der erhöhten Anfälligkeit der Frühgeborenen für Infektionen ist nur unvollständig verstanden. Zunehmend existieren Hinweise für eine Beteiligung der fetalen inflammatorischen Reaktion an der Entstehung verschiedener neonataler Erkrankungen (Bagchi et al. 1994; Jones et al. 1996a; Dammann und Leviton 1997; Gomez et al. 1998). Demgegenüber steht die Annahme, dass die Unreife des Immunsystems und eine damit einhergehende Unfähigkeit zur ausreichenden Zytokinbildung für die hohe peripartale Anfälligkeit Frühgeborener für Infektionen verantwortlich seien (Liechty et al. 1991; Schibler et al. 1992; Yachie et al. 1992; Schibler et al. 1993; Chang et al. 1994; Pillay et al. 1994; Rowen et al. 1995). Gegen Letzteres spricht die klinische Beobachtung, dass Neugeborene im Rahmen einer Sepsis eine systemische Immunantwort entwickeln (Berner et al. 1998; Gomez et al. 1998; Kashlan et al. 2000). Die Fähigkeit Neugeborener Zytokine zu bilden, war Gegenstand mehrerer Studien, die kontroverse Erkenntnisse erbracht haben. Gerade die Ergebnisse von Untersuchungen proinflammatorischer Zytokine bei Neugeborenen mit vorliegender Infektion können irreführend sein, da die Zytokinbildung im fortgeschrittenen Stadium der Sepsis durch ein Phänomen, das als Immunparalyse beschrieben wurde, beeinträchtigt sein kann (Ertel et al. 1995; Astiz et al. 1996). Zudem ist es bei in-vivo Untersuchungen unvermeidlich, dass die Probenentnahmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Entzündungsgeschehens stattfinden. Die Grundlage für diese Arbeit bildet daher ein in-vitro-Sepsis-Modell, das standardisierte Ausgangsbedingungen gewährleistet und durch Messungen zu definierten Zeitpunkten Aussagen über die Kinetik der Zytokinproduktion zulässt. Die Analyse der Zytokinproduktion erfolgte vorwiegend mittels Durchflusszytometrie. Diese Methode gilt als eine zuverlässige und sensitive Technik (Jung et al. 1993). Sie ermöglicht einen Einblick in die Zytokinbildung direkt auf Zellebene und dadurch eine Zuordnung zum Zellphänotyp, ohne die Zellen aus dem Vollblutmedium und damit aus ihrem natürlichen Wirkungsgefüge herauszutrennen. Dies ist zwingend notwendig, da die funktionelle Antwort von gereinigten Zellvorbereitungen nicht unbedingt die in-vivo vorkommende physiologische Reaktion widerspiegelt (De Groote et al. 1992). Zudem sind Unterschiede zwischen plasma- und zellassozierten Zytokinen beschrieben worden, die eine

Zytokinanalyse auf der Ebene der einzelnen Zelle erfordern (Munoz et al. 1991). In der hier vorgestellten Studie bestätigten die serologischen Messungen hingegen weitestgehend die Ergebnisse der intrazellulären Untersuchungen. Dennoch ist zu berücksichtigen, dass ein Sepsis-Modell nur annähernd die in-vivo Situation nachahmen kann. Da das Zytokinnetzwerk auf sehr komplexen Wechselwirkungen aufbaut, bieten die hier vorgestellten in-vitro gewonnenen Daten nur Anhaltspunkte für den Ablauf des Inflammationsprozesses in-vivo.

Im Gegensatz zu der bestehenden Ansicht, Frühgeborene seien nicht fähig, ausreichende Mengen proinflammatorischer Zytokine zu bilden (Liechty et al. 1991; Schibler et al. 1992; Yachie et al. 1992; Schibler et al. 1993; Chang et al. 1994; Pillay et al. 1994; Rowen et al. 1995), konnte in der vorliegenden Studie bei Frühgeborenen eine unerwartet hohe Anzahl IL-6- und IL-8-positiver Zellen beobachtet werden. Die Produktion proinflammatorischer Zytokine war sowohl spontan als auch nach Endotoxinstimulation nicht nur vergleichbar sondern teilweise sogar größer als die der Erwachsenen. Dieses Ergebnis ist von besonderem Interesse, da eine Beteiligung beider Zytokine an der Entstehung von verschiedenen neonatalen Erkrankungen diskutiert wird (Dammann and Leviton 1997; Gomez et al. 1998). Das Vorkommen erhöhter IL-6- und IL-8-Spiegel im Fruchtwasser und im Nabelschnurblut gilt als sensitiver Test für das Vorliegen einer intrauterinen Infektion (Yoon et al. 1995). Eine intrauterine Infektion ist nicht nur Vorbote einer drohenden Frühgeburt (Kundsinn et al. 1996; Newton et al. 1997), sondern ist auch mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten einer CLD des Frühgeborenen (Rojas et al. 1995), einer periventrikulären Leukomalazie (Yoon et al. 1996; Yoon et al. 1997a), einer intraventrikulären Hämorrhagie (Morales 1987; Salafia et al. 1995; Yoon et al. 1995) und einer Zerebralparese (Yoon et al. 1997a; Yoon et al. 2000) verbunden.

Die Mitbeteiligung einer neonatalen Infektion an der Entstehung der CLD postulierte erstmals Rojas et al. aufgrund der Beobachtung, dass Neugeborene mit einer nosokomialen Infektion häufiger eine CLD entwickeln als ihre Altersgenossen ohne Infektion (Rojas et al. 1995). Im Folgenden konnte gezeigt werden, dass auch die pränatale Exposition gegenüber einer Infektion (z.B. Chorioamnionitis) zur Entstehung einer CLD prädisponiert (Pierce und Bancalari 1995; Watterberg et al. 1996). In Studien korrelieren sowohl der histologische Nachweis einer Chorioamnionitis (Watterberg et al. 1996), wie auch eine erhöhte Konzentration proinflammatorischer Zytokine im Fruchtwasser (Yoon et al.

1997c; Ghezzi et al. 1998) und im Nabelschnurblut (Yoon et al. 1999) positiv mit dem Auftreten einer CLD. Die Bedeutung proinflammatorischer Zytokine konnte durch den Nachweis einer erhöhten Aktivität von IL-6 in der BAL von später an CLD erkrankten Neugeborenen unterstrichen werden (Bagchi et al. 1994). Darüber hinaus konnte in der BAL ein Anstieg proinflammatorischer Zytokine mit zunehmender Beatmungsdauer nachgewiesen werden (Schultz et al. 2003). Mit dem Vorliegen einer intrauterinen Infektion steigt auch das Risiko für die Entstehung frühkindlicher Hirnschäden. Intraventrikuläre Blutungen und periventrikuläre Leukomalazie sind Erkrankungen des Neugeborenen, die häufig zu der Entwicklung einer Zerebralparese führen. Zwischen 60 % und 100 % der Frühgeborenen mit PVL entwickeln später eine Zerebralparese (Leviton und Paneth 1990). Erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine im Fruchtwasser prädisponieren sowohl für die Entwicklung einer periventrikulären Leukomalazie als auch einer Zerebralparese (Yoon et al. 1997a; Yoon et al. 1997b; Yoon et al. 2000). Durch immunhistochemische Untersuchungen von Gehirngewebe konnten sogar in den periventrikulären Läsionen selbst erhöhte TNF- α - und IL-6-Konzentrationen im Vergleich zu Gewebe von nicht erkrankten Neonaten nachgewiesen werden (Yoon et al. 1997d). Zudem konnte im Tierversuch durch Ischämie des Hirngewebes eine erhöhte IL-1- und IL-6-Bioaktivität in diesem Gewebe induziert werden (Hagberg et al. 1996). Die Gefahr für das Hirngewebe, die von erhöhten Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine ausgeht, wird durch Untersuchungen unterstrichen, die diese Zytokine zusätzlich für eine erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke verantwortlich machen (Quagliariello et al. 1991; Saija et al. 1995). Die Hirnschädigungen treten mit abnehmendem Gestationsalter gehäuft auf und sind zudem im Gegensatz zu den fokalen Läsionen der Reifgeborenen diffuser angeordnet. Als Ursache für die diffuse Hirnschädigung sehr kleiner Frühgeborener wird eine erhöhte Verletzlichkeit vermutet, die charakterisiert ist durch eine unreife Blut-Hirn Schranke, unvollständige Myelinisierung und suboptimale Spiegel endogener Protektoren (Dammann und Leviton 2000a). Die geweбетoxische Wirkung proinflammatorischer Zytokine könnte sich unter der Berücksichtigung der gesteigerten Empfindlichkeit des Hirngewebes sehr kleiner Frühgeborener besonders schädlich auswirken.

Die hier vorgestellten Daten zeigen auf Zellebene nicht nur eine gut entwickelte, sondern sogar eine gesteigerte spontane Produktion der gewebeschädlichen Zytokine IL-6 und IL-8 bei Frühgeborenen. Nach Stimulation mit Endotoxin war die Produktion beider Zytokine

bei Frühgeborenen unterhalb der 32. SSW trotz pränataler Behandlung mit Glukokortikosteroiden, die bei 55 von 74 Probanden durchgeführt wurde, deutlich höher als bei Erwachsenen. Vorausgegangene Untersuchungen von Schultz et al. konnten auf Zellebene nach Stimulation auch bei reifen Neugeborenen im Vergleich zu Erwachsenen eine größere Zytokinbildungskapazität nachweisen (Schultz et al. 2002a). Eine Ausnahme stellte dabei die Gruppe der Frühgeborenen unterhalb der 32. SSW dar. Während diese sehr unreifen Frühgeborenen spontan und nach Stimulation größere Mengen IL-8 als die Erwachsenen bildeten, war die IL-6-Produktion nach Stimulation deutlich geringer als die der Erwachsenen. Dieses Ergebnis wurde durch die Messung der plasmaassoziierten Zytokine im ELISA bestätigt. Dabei ist die immunsuppressive Wirkung der Glukokortikosteroide, die 26 der 27 Patienten pränatal zur Beschleunigung der Lungenreife verabreicht worden waren, zu beachten. Eine Kontrollgruppe ohne intrauterine Steroidbehandlung war aus ethischen Gesichtspunkten nicht rekrutierbar. Um so beeindruckender ist, dass Frühgeborene desselben Alters mit vorliegender Infektion nicht nur - wie erwartet - spontan eine erhöhte proinflammatorische Zytokinproduktion aufwiesen, sondern auch in der Lage waren, die Stimulation durch Lipopolysaccharid mit signifikant größeren Mengen proinflammatorischer Zytokine als die Erwachsenen zu beantworten. Unsere Untersuchungen nach Vorinkubation mit Dexamethason in-vitro veranschaulichen, dass der immunsuppressive Effekt von Glukokortikosteroiden gerade in der Gruppe der sehr unreifen Frühgeborenen unterhalb der 32. SSW am stärksten ausgeprägt ist. Die Hemmung der Zytokinproduktion war in allen Gruppen dosisabhängig und für IL-6 deutlicher als für IL-8 ausgebildet. Dennoch persistierten die Zytokinkonzentrationen weiterhin auf einem sehr hohen Niveau. Insbesondere bei den Frühgeborenen oberhalb der 32. SSW blieben die Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine nach Einsatz von 10^{-5} M Dexamethason über den Werten der Erwachsenen. Diese Daten veranschaulichen nicht nur eine gut ausgebildete, sondern eine gesteigerte Bildung proinflammatorischer Zytokine bei Frühgeborenen. Weiterführende Untersuchungen konnten selbst bei fetalen Monozyten eine gute Fähigkeit zur Bildung proinflammatorischer Zytokine nachweisen (Schultz et al. 2002c; Strunk et al. 2004).

Für den Ablauf einer physiologischen Immunantwort ist ein Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen notwendig, um Gewebeschäden durch gesteigerte Produktion proinflammatorischer Zytokine zu vermeiden. Das Immunsystem steht der Herausforderung gegenüber, eine Infektion auf der einen Seite mit ausreichender Intensität

und Dauer zu beantworten, um eine Infektion zu kontrollieren und zu eliminieren, und auf der anderen Seite die unspezifische Schädigung des Wirtsgewebes zu minimieren. IL-10 spielt als antiinflammatorisches Zytokin eine zentrale Rolle beim Erreichen dieses Gleichgewichtes zwischen Pathologie und Schutz. Seine antiinflammatorischen Eigenschaften beruhen unter anderem auf der Suppression der Bildung der proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α (de Waal Malefyt et al. 1991; Fiorentino et al. 1991; Cassatella et al. 1993; Marchant et al. 1994). Eine verminderte Produktion von IL-10 bei Neugeborenen (Chheda et al. 1996; Kotiranta-Ainamo et al. 1997; Splawski et al. 1998) könnte durch unzureichende Downregulation zu der oben gezeigten gesteigerten Produktion proinflammatorischer Zytokine bei Früh- und Reifgeborenen (Schultz et al. 2002a) beitragen. In der Literatur wird die Fähigkeit Neugeborener zur Bildung antiinflammatorischer Zytokine kontrovers diskutiert. Es werden nach Stimulation mit LPS in-vitro sowohl eine im Vergleich mit Erwachsenen verminderte (Chheda et al. 1996; Kotiranta-Ainamo et al. 1997; Splawski et al. 1998) als auch eine erhöhte neonatale IL-10-Produktion beschrieben (Blanco-Quiros et al. 2000). Insbesondere wurde über eine erhöhte IL-10-Bildung bei Frühgeborenen berichtet. In der vorliegenden Arbeit konnte eine deutlich verminderte IL-10-Bildungskapazität bei Frühgeborenen und Reifgeborenen im Vergleich zu Erwachsenen beobachtet werden (Schultz et al. 2004). Bei vergleichbarer Kinetik der IL-10-Bildung auf intrazellulärer Ebene durch neonatale und adulte Monozyten war die IL-10-Bildung der Neugeborenen zu jedem Zeitpunkt der Messung deutlich niedriger als die der Erwachsenen. Die serologischen Untersuchungen bestätigten die verminderte IL-10-Bildungsfähigkeit Neugeborener und zeigen zudem, dass sowohl Reif- als auch sehr kleine Frühgeborene von diesem Phänomen betroffen sind. In Verbindung mit der gesteigerten Produktion proinflammatorischer Zytokine könnte die verminderte Fähigkeit zur Bildung von IL-10 besonders bei Frühgeborenen entscheidend zu der hohen Anfälligkeit für schwere Komplikationen im Rahmen einer Sepsis beitragen. Eine verzögerte Reifung der IL-10-Bildungsfähigkeit ist auch mit der Pathogenese der CLD in Verbindung gebracht worden und könnte ursächlich an der hohen Inzidenz dieser Erkrankung bei Frühgeborenen beteiligt sein. Tatsächlich bilden Lungenmakrophagen Frühgeborener deutlich weniger IL-10 als die Reifgeborener (Jones et al. 1996a; Blahnik et al. 2001; De Dooy et al. 2001) und verminderte IL-10-Werte in der BAL beatmeter Frühgeborener korrelieren mit dem späteren Auftreten einer CLD (Jonsson et al. 2000). Zudem veranschaulichen Untersuchungen der Zytokinspiegel in der BAL Frühgeborener bei längerer Beatmung eine

Zunahme der proinflammatorischen Zytokine ohne einen Anstieg der IL-10-Konzentration (Schultz et al. 2003). Der Einfluss einer verminderten IL-10-Wirkung wird auch auf die Entstehung anderer neonataler Erkrankungen untersucht. Es wurde beobachtet, dass IL-10-Knockout-Mäuse aufgrund der kontinuierlichen Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine innerhalb weniger Tage nach Geburt eine chronische Darmerkrankung entwickeln (Kuhn et al. 1993). Vor diesem Hintergrund könnte die verminderte Produktionsfähigkeit für IL-10 bei Frühgeborenen eine entscheidende Rolle in der Entstehung der nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) bei Frühgeborenen spielen, bei der ebenfalls eine gesteigerte Inflammation im Darm gefunden wird.

Diese Daten unterstützen unsere Hypothese, dass eine verminderte Verfügbarkeit von IL-10 zu einer unzureichenden Kontrolle der Neugeborenen über Zytokine der proinflammatorischen Kaskade führt. Neben der gesteigerten Verletzlichkeit der sich entwickelnden Organsysteme bei Frühgeborenen könnte ein Ungleichgewicht zugunsten der proinflammatorischen Seite zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese mehrerer neonataler Erkrankungen spielen.

Mit zunehmenden Hinweisen auf die kritische Rolle der Aktivierung der Kaskade proinflammatorischer Zytokine bei der Entwicklung einer Sepsis wachsen die Bemühungen, diese Kaskade durch therapeutische Maßnahmen zu beeinflussen. Heute stehen verschiedene therapeutische Optionen zur Modulation einer überschießenden Entzündungsreaktion zur Verfügung. TNF- α ist das Zytokin, das gemeinsam mit IL-1 am Anfang der Kaskade proinflammatorischer Zytokine steht. In den 80er Jahren konnten Untersuchungen am Tiermodell zeigen, dass die Anwendung neutralisierender Antikörper gegen TNF- α vor einer Injektion von *Escherichia coli* oder Endotoxin zur Blockade der septischen Antwort führt (Beutler et al. 1985; Tracey et al. 1987; Mathison et al. 1988). In der vorliegenden Arbeit wurde der immunmodulatorische Effekt eines monoklonalen TNF- α -Antikörpers auf die Bildung proinflammatorischer Zytokine bei Reifgeborenen im Vergleich zu Erwachsenen untersucht. Die Messung der Zytokine auf Zellniveau war aufgrund der Blockade des parakrinen Effektes der Zytokine mittels Monensin für diese Fragestellung nicht möglich. Es zeigte sich bei Messungen im Zellüberstand sowohl bei Neugeborenen als auch bei Erwachsenen eine deutliche dosisabhängige Reduktion der TNF- α -Konzentration. Ein Effekt auf die Produktion von IL-8 konnte nur tendenziell, auf die IL-6-Bildung nicht festgestellt werden. Demnach scheint die Verwendung eines

blockierenden Anti-TNF- α -Antikörpern zur Reduktion der TNF- α -Konzentration zu führen, vermag jedoch nicht die proinflammatorische Kaskade in dem untersuchten Sepsis-Modell zu beeinflussen. Der Wirkungsmechanismus des therapeutischen Einsatzes von TNF- α -blockierenden Substanzen ist noch ungeklärt. Die Anwendung von Etanercept führt zu deutlichen Therapieerfolgen bei der rheumatoiden Arthritis (Moreland et al. 1999; Feldmann und Maini 2003). Bei der Behandlung chronischer Darmerkrankungen werden hingegen bessere Ergebnisse mit dem chimären Antikörper Infliximab erzielt (van Dullemen et al. 1995; Targan et al. 1997), obwohl beide Medikamente vergleichbare Mengen TNF- α neutralisieren (Van den Brande et al. 2003). Es konnte gezeigt werden, dass Infliximab, nicht aber Etanercept, durch Bindung an transmembranem TNF- α von Immunzellen die Apoptose dieser Zellen induziert (van Deventer 2001; Van den Brande et al. 2003). Diese apoptotische Wirkung könnte die zusätzliche Wirksamkeit von Infliximab erklären. Die vielfältigen Wirkungsmechanismen TNF- α -blockierender Substanzen verdeutlichen die Schwierigkeiten des therapeutischen Eingreifens in die Komplexität des Zytokinnetzwerkes.

Während die Therapieansätze mit TNF- α -Blockern bei einer lokalen Inflammation, wie der rheumatoiden Arthritis, vielversprechend sind (Baumgartner 2000), sind die Ergebnisse der therapeutischen Anwendung bei Sepsis relativ enttäuschend. Die bei Erwachsenen durchgeführten klinischen, doppelblind, placebokontrollierten Studien mit TNF- α -Blockade konnten keine signifikante Verbesserung der Mortalität innerhalb der ersten 28 Tage nach Beginn einer Sepsis nachweisen (Fisher et al. 1993; Dhainaut et al. 1995; Mazolewski et al. 1999; Dinarello 2001). Die Metaanalyse dieser Studien bestätigte - mit Ausnahme einer Studie - dieses Ergebnis; es konnte hingegen auch kein schädigender Effekt der Blockade beobachtet werden (Zeni et al. 1997). Der Grund für die mangelnde Wirksamkeit der TNF- α -Blockade bei der Sepsis ist unklar; unterschiedliche Ursachen müssen in Betracht gezogen werden. Zunächst könnte der Zeitpunkt der Applikation einen entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit ausüben (Blackwell und Christman 1996; Clark et al. 1998; Mazolewski et al. 1999). In einem schon fortgeschrittenen Stadium der Sepsis könnte die Hemmung der auslösenden Zytokine unzureichend auf die schon aktivierte Kaskade wirken. Neben der Diskussion über den Zeitpunkt und die Dosis der Gabe wird grundsätzlich die Wirksamkeit einer Monotherapie zur Downregulation des komplexen Zytokinnetzwerkes in Frage gestellt (Blackwell und Christman 1996; Mazolewski et al. 1999; Dinarello 2001). Die Bildung proinflammatorischer Zytokine wird

vereinfacht als Kaskade, an deren Anfang IL-1 und TNF- α stehen, beschrieben. Wie das Modell des Zytokinnetzwerkes nahe legt (Balkwill und Burke 1989), üben Zytokine jedoch multiple Wechselwirkungen untereinander aus. Daher ist eine alternative, parallele und eventuell direkte Stimulation durch Endotoxin der in der Kaskade distalen Zytokine IL-6 (Mazolewski et al. 1999) und IL-8 denkbar. Die hier vorgestellten Ergebnisse legen eine von freiem TNF- α unabhängige Sekretion von IL-6 und IL-8 nahe. Aufgrund der niedrigen Probandenzahl sollten diese Ergebnisse Anlass zu weiteren Untersuchungen geben.

Da antiinflammatorische Zytokine in-vivo regulierend in die Kaskade proinflammatorischer Zytokine eingreifen können, bietet IL-10 aufgrund seiner starken immunmodulatorischen Eigenschaften eine weitere Option zur therapeutischen Beeinflussung einer überschießenden Reaktion proinflammatorischer Zytokine. In Tiermodellen konnte ein schützender Effekt von IL-10 gegenüber einem Endotoxinschock gezeigt werden (Gerard et al. 1993; Howard et al. 1993). Die systemische Gabe von IL-10 schützte reproduzierbar Mäuse vor einer letalen intraperitonealen Injektion von Endotoxin; dieser Schutz konnte durch die vorausgehende Gabe von Anti-IL-10-Antikörpern aufgehoben werden (Howard et al. 1993). In den hier vorgestellten Untersuchungen konnte nach Vorinkubation mit rekombinantem IL-10 eine dosisabhängige Reduktion der Bildung von TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8 gezeigt werden. Überraschenderweise war dieser hemmende Effekt auf die Bildung proinflammatorischer Zytokine bei Früh- und Reifgeborenen deutlich schwächer ausgeprägt als bei Erwachsenen.

Vor dem Hintergrund dieser Daten ergibt sich die Hypothese, dass beim Neonaten im Vergleich zum Erwachsenen nicht nur die Bildung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10, sondern auch das Ansprechen auf vorhandenes IL-10 vermindert ist. Dieses verminderte Ansprechen könnte auf Besonderheiten im IL-10-Signalweg bei Frühgeborenen zurückzuführen sein. Untersuchungen der IL-10-Rezeptorexpression bei Früh- und Reifgeborenen, die darüber weiteren Aufschluss geben könnten, befinden sich aktuell in Vorbereitung. Im neonatalen Immunsystem scheint nicht nur quantitativ ein Übergewicht der proinflammatorischen Mediatoren vorhanden zu sein, sondern zudem auch eine eingeschränkte Wirksamkeit der antiinflammatorischen Komponente der Immunreaktion vorzuliegen.

Im Gegensatz zu der bestehenden Meinung, dass die Bildung proinflammatorischer Zytokine Frühgeborener unzureichend ist, sprechen die hier vorgestellten Daten für eine gut ausgebildete Bildungsfähigkeit. In Anbetracht der verschiedenen gewebeschädlichen Wirkungen proinflammatorischer Zytokine besitzen diese Daten große Bedeutung für das Verständnis der Entstehung diverser neonataler Erkrankungen. Des Weiteren konnte hier ein Ungleichgewicht in der Bildungsfähigkeit zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen bei Früh- und Reifgeborenen zu Gunsten der proinflammatorischen Seite gezeigt werden. Das Überwiegen der proinflammatorischen Seite wird zudem durch eine bei Reif- und Frühgeborenen vorliegende verminderte Sensibilität der proinflammatorischen Kaskade gegenüber der Regulation durch IL-10 verstärkt. Die klinische Anwendung zytokinblockierender Substanzen und rekombinanter immunmodulierender Zytokine eröffnet therapeutische Möglichkeiten, regulierend auf die Bildung und Wirkung der Zytokine einzuwirken. Um eine Dysregulation in der Komplexität des Zytokinnetzwerkes auszugleichen, müssen jedoch sowohl die individuellen Unterschiede in der Ausprägung der Zytokinantwort wie auch die vielfältigen Funktionen der Zytokine und ihre Interaktionen verstanden und berücksichtigt werden. Das Verständnis der Eigenschaften des neonatalen Immunsystems und dessen Besonderheiten in Abhängigkeit vom Gestationsalter stellt eine große Herausforderung dar. Vor dem Hintergrund der engen Assoziation typischer neonataler Erkrankungen mit proinflammatorischen Zytokinen könnten ein besseres Verständnis der neonatalen Immunreaktion und die gezielte Anwendung immunmodulierender Substanzen neue Therapieansätze eröffnen.

6 Zusammenfassung

Neonatale Infektionen haben einen entscheidenden Einfluss auf die Mortalität und Morbidität von Neugeborenen und insbesondere von Frühgeborenen. Zytokine spielen als Mediatoren der Immunantwort eine zentrale Rolle bei der Abwehr von Infektionen. Eine verminderte Zytokinproduktion wird als eine Ursache für die erhöhte Anfälligkeit Frühgeborener diskutiert. Im Rahmen einer Sepsis führt der Überfluss proinflammatorischer Zytokine allerdings zu Organschäden, die zu der Entstehung neonataler Erkrankungen wie Hirnschäden und chronischer Lungenerkrankung beitragen. In der vorliegenden Arbeit wird in einem Sepsis-Modell die Zytokinbildungskapazität Frühgeborener genauer charakterisiert. Als Methoden wurden die Durchflusszytometrie und der ELISA verwendet. Die Bildungsfähigkeit von IL-6 und IL-8 wurde bei 74 Frühgeborenen im Vergleich mit Erwachsenen untersucht. Frühgeborene oberhalb und unterhalb der 32. SSW und Frühgeborene mit Infektion wurden getrennt betrachtet. Alle Frühgeborenen zeigten sowohl spontan als auch nach Endotoxinstimulation eine ausreichende Zytokinproduktion. Frühgeborene oberhalb der 32. SSW bildeten höhere Mengen proinflammatorischer Zytokine als die Erwachsenen; die IL-6-Produktion Frühgeborener unterhalb der 32. SSW war vermindert. Ein Einfluss des Geburtsmodus konnte nicht nachgewiesen werden. Es bestand eine positive Korrelation zwischen der spontanen IL-6-Bildung und dem Gestationsalter. Die immunsuppressive Wirkung von Kortikosteroiden, die nach Vorinkubation mit Dexamethason untersucht wurde, führte zu einer verminderten Bildung proinflammatorischer Zytokine. Diese war bei den sehr kleinen Frühgeborenen besonders ausgeprägt. Der Nachweis des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 war im Vergleich zu Erwachsenen bei Reif- und Frühgeborenen deutlich vermindert. Zudem demonstrierte der Einsatz von rekombinanten IL-10 eine deutlich verminderte suppressive Wirkung von IL-10 auf die Sekretion proinflammatorischer Zytokine bei Früh- und Reifgeborenen im Vergleich zu Erwachsenen. Untersuchungen mit Anti-TNF- α -Antikörpern führten zu einer deutlichen Suppression der TNF- α -Mengen, hatten jedoch bei keiner der Gruppen entscheidenden Einfluss auf die Sekretion weiterer proinflammatorischer Zytokine.

Im Gegensatz zu der bestehenden Meinung, die Zytokinbildung bei Frühgeborenen sei unzureichend, konnte in der vorliegenden Arbeit eine mit der von Erwachsenen

vergleichbare, zum Teil sogar stärkere Produktion proinflammatorischer Zytokine nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist besonders relevant, da eine Beteiligung proinflammatorischer Zytokine an der Entstehung diverser neonataler Erkrankungen diskutiert wird. Die geringe Bildung von IL-10 und die verminderte Hemmung der Bildung von proinflammatorischen Zytokinen durch IL-10 verstärken den oben beschriebenen Effekt. Der Ablauf einer wirksamen Immunreaktion ist von dem Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Komponenten abhängig. Vor dem Hintergrund der gewebeschädigenden Wirkung von TNF- α , IL-6 und IL-8 könnte das hier gezeigte Ungleichgewicht der inflammatorischen Zytokine bei Frühgeborenen entscheidend zu der Entstehung neonataler Erkrankungen infolge einer Infektion beitragen.

7 Literaturverzeichnis

Asadullah K, Sterry W, Volk HD (2003) Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev* 55: 241-69.

Astiz M, Saha D, Lustbader D, Lin R, Rackow E (1996) Monocyte response to bacterial toxins, expression of cell surface receptors, and release of anti-inflammatory cytokines during sepsis. *J Lab Clin Med* 128: 594-600.

Bagchi A, Viscardi RM, Taciak V, Ensor JE, McCrea KA, Hasday JD (1994) Increased activity of interleukin-6 but not tumor necrosis factor-alpha in lung lavage of premature infants is associated with the development of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res* 36: 244-52.

Balkwill FR, Burke F (1989) The cytokine network. *Immunol Today* 10: 299-304.

Barton L, Hodgman JE, Pavlova Z (1999) Causes of death in the extremely low birth weight infant. *Pediatrics* 103: 446-51.

Baumgartner SW (2000) Tumor necrosis factor inactivation in the management of rheumatoid arthritis. *South Med J* 93: 753-9.

Berner R, Niemeyer CM, Leititis JU, Funke A, Schwab C, Rau U, Richter K, Tawfeek MS, Clad A, Brandis M (1998) Plasma levels and gene expression of granulocyte colony-stimulating factor, tumor necrosis factor-alpha, interleukin (IL)-1beta, IL-6, IL-8, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in neonatal early onset sepsis. *Pediatr Res* 44: 469-77.

Beutler B, Milsark IW, Cerami AC (1985) Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 229: 869-71.

Blackwell TS, Christman JW (1996) Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth* 77: 110-7.

Blahnik MJ, Ramanathan R, Riley CR, Minoo P (2001) Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha and IL-10 production by lung macrophages from preterm and term neonates. *Pediatr Res* 50: 726-31.

Blanco-Quiros A, Arranz E, Solis G, Villar A, Ramos A, Coto D (2000) Cord blood interleukin-10 levels are increased in preterm newborns. *Eur J Pediatr* 159: 420-3.

Borden EC, Chin P (1994) Interleukin-6: a cytokine with potential diagnostic and therapeutic roles. *J Lab Clin Med* 123: 824-9.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 3666-70.

Cassatella MA, Meda L, Bonora S, Ceska M, Constantin G (1993) Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 178: 2207-11.

- Chang M, Suen Y, Lee SM, Baly D, Buzby JS, Knoppel E, Wolpe S, Cairo MS (1994) Transforming growth factor-beta 1, macrophage inflammatory protein-1 alpha, and interleukin-8 gene expression is lower in stimulated human neonatal compared with adult mononuclear cells. *Blood* 84: 118-24.
- Chheda S, Palkowetz KH, Garofalo R, Rassin DK, Goldman AS (1996) Decreased interleukin-10 production by neonatal monocytes and T cells: relationship to decreased production and expression of tumor necrosis factor-alpha and its receptors. *Pediatr Res* 40: 475-83.
- Clark MA, Plank LD, Connolly AB, Streat SJ, Hill AA, Gupta R, Monk DN, Shenkin A, Hill GL (1998) Effect of a chimeric antibody to tumor necrosis factor-alpha on cytokine and physiologic responses in patients with severe sepsis--a randomized, clinical trial. *Crit Care Med* 26: 1650-9.
- Dammann O, Leviton A (1997) Maternal intrauterine infection, cytokines, and brain damage in the preterm newborn. *Pediatr Res* 42: 1-8.
- Dammann O, Leviton A (2000a) Brain damage in preterm newborns: biological response modification as a strategy to reduce disabilities. *J Pediatr* 136: 433-8.
- Dammann O, Leviton A (2000b) Role of the fetus in perinatal infection and neonatal brain damage. *Curr Opin Pediatr* 12: 99-104.
- De Dooy JJ, Mahieu LM, Van Bever HP (2001) The role of inflammation in the development of chronic lung disease in neonates. *Eur J Pediatr* 160: 457-63.
- De Groote D, Zangerle PF, Gevaert Y, Fassotte MF, Beguin Y, Noizat-Pirenne F, Pirenne J, Gathy R, Lopez M, Dehart I, et al. (1992) Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine* 4: 239-48.
- de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE (1991) Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174: 1209-20.
- Dhainaut JF, Vincent JL, Richard C, Lejeune P, Martin C, Fierobe L, Stephens S, Ney UM, Sopwith M (1995) CDP571, a humanized antibody to human tumor necrosis factor-alpha: safety, pharmacokinetics, immune response, and influence of the antibody on cytokine concentrations in patients with septic shock. CPD571 Sepsis Study Group. *Crit Care Med* 23: 1461-9.
- Dinarello CA (1991) Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 77: 1627-52.
- Dinarello CA (2000) Proinflammatory cytokines. *Chest* 118: 503-8.
- Dinarello CA (2001) Anti-cytokine therapies in response to systemic infection. *J Invest Dermatol Symp Proc* 6: 244-50.
- Doyle LW, Rogerson S, Chuang SL, James M, Bowman ED, Davis PG (1999) Why do preterm infants die in the 1990s? *Med J Aust* 170: 528-32.
- Ertel W, Kremer JP, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, Trentz O, Schildberg FW (1995) Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood* 85: 1341-7.
- Feldmann M, Maini RN (2003) Lasker Clinical Medical Research Award. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Med* 9: 1245-50.

- Ferrieri P (1990) Neonatal susceptibility and immunity to major bacterial pathogens. *Rev Infect Dis* 12 Suppl 4: S394-400.
- Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR (1989) Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170: 2081-95.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A (1991) IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 147: 3815-22.
- Fisher CJ, Jr., Opal SM, Dhainaut JF, Stephens S, Zimmerman JL, Nightingale P, Harris SJ, Schein RM, Panacek EA, Vincent JL, et al. (1993) Influence of an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. The CB0006 Sepsis Syndrome Study Group. *Crit Care Med* 21: 318-27.
- Gerard C, Bruyns C, Marchant A, Abramowicz D, Vandenaabee P, Delvaux A, Fiers W, Goldman M, Velu T (1993) Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J Exp Med* 177: 547-50.
- Ghezzi F, Gomez R, Romero R, Yoon BH, Edwin SS, David C, Janisse J, Mazor M (1998) Elevated interleukin-8 concentrations in amniotic fluid of mothers whose neonates subsequently develop bronchopulmonary dysplasia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 78: 5-10.
- Goldenberg RL, Rouse DJ (1998) Prevention of premature birth. *N Engl J Med* 339: 313-20.
- Gomez R, Romero R, Edwin SS, David C (1997) Pathogenesis of preterm labor and preterm premature rupture of membranes associated with intraamniotic infection. *Infect Dis Clin North Am* 11: 135-76.
- Gomez R, Romero R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Berry SM (1998) The fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 179: 194-202.
- Hagberg H, Gilland E, Bona E, Hanson LA, Hahin-Zoric M, Blennow M, Holst M, McRae A, Soder O (1996) Enhanced expression of interleukin (IL)-1 and IL-6 messenger RNA and bioactive protein after hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Pediatr Res* 40: 603-9.
- Hille ET, den Ouden AL, Bauer L, van den Oudenrijn C, Brand R, Verloove-Vanhorick SP (1994) School performance at nine years of age in very premature and very low birth weight infants: perinatal risk factors and predictors at five years of age. Collaborative Project on Preterm and Small for Gestational Age (POPS) Infants in The Netherlands. *J Pediatr* 125: 426-34.
- Hitti J, Krohn MA, Patton DL, Tarczy-Hornoch P, Hillier SL, Cassen EM, Eschenbach DA (1997) Amniotic fluid tumor necrosis factor-alpha and the risk of respiratory distress syndrome among preterm infants. *Am J Obstet Gynecol* 177: 50-6.
- Horwood J, Mogridge N, Darlow B (1999) Cognitive, educational and behavioural outcomes at 7 to 8 years. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 80: F78.
- Howard M, Muchamuel T, Andrade S, Menon S (1993) Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J Exp Med* 177: 1205-8.
- Hultgren O, Eugster HP, Sedgwick JD, Korner H, Tarkowski A (1998) TNF/lymphotoxin-alpha double-mutant mice resist septic arthritis but display increased mortality in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 161: 5937-42.

Janeway CA, Travers P (2002) Die angeborene Immunität. In: Janeway CA, Travers P (Hrsg.) Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 37-96

Jones CA, Cayabyab RG, Kwong KY, Stotts C, Wong B, Hamdan H, Minoos P, deLemos RA (1996a) Undetectable interleukin (IL)-10 and persistent IL-8 expression early in hyaline membrane disease: a possible developmental basis for the predisposition to chronic lung inflammation in preterm newborns. *Pediatr Res* 39: 966-75.

Jones CA, Cayabyab RG, Kwong KY, Stotts C, Wong B, Hamdan H, Minoos P, deLemos RA (1996b) Undetectable interleukin (IL)-10 and persistent IL-8 expression early in hyaline membrane disease: a possible developmental basis for the predisposition to chronic lung inflammation in preterm newborns. *Pediatr Res* 39: 966-75.

Jonsson B, Li YH, Noack G, Brauner A, Tullus K (2000) Downregulatory cytokines in tracheobronchial aspirate fluid from infants with chronic lung disease of prematurity. *Acta Paediatr* 89: 1375-80.

Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C (1993) Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* 159: 197-207.

Kashlan F, Smulian J, Shen-Schwarz S, Anwar M, Hiatt M, Hegyi T (2000) Umbilical vein interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha plasma concentrations in the very preterm infant. *Pediatr Infect Dis J* 19: 238-43.

Klein JO (2001) Bacterial sepsis and meningitis. In: Remington JS, Klein JO (ed.) *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*, Chapter 21. WB Saunders Company, Philadelphia, USA, pp. 943-998

Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, Elner SG, Strieter RM (1992) Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 258: 1798-801.

Kotiranta-Ainamo A, Rautonen J, Rautonen N (1997) Interleukin-10 production by cord blood mononuclear cells. *Pediatr Res* 41: 110-3.

Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W (1993) Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75: 263-74.

Kundsin RB, Leviton A, Allred EN, Poulin SA (1996) *Ureaplasma urealyticum* infection of the placenta in pregnancies that ended prematurely. *Obstet Gynecol* 87: 122-7.

Leviton A, Paneth N (1990) White matter damage in preterm newborns--an epidemiologic perspective. *Early Hum Dev* 24: 1-22.

Liechty KW, Koenig JM, Mitchell MD, Romero R, Christensen RD (1991) Production of interleukin-6 by fetal and maternal cells in vivo during intraamniotic infection and in vitro after stimulation with interleukin-1. *Pediatr Res* 29: 1-4.

Marchant A, Bruyns C, Vandenabeele P, Abramowicz D, Gerard C, Delvaux A, Ghezzi P, Velu T, Goldman M (1994) The protective role of interleukin-10 in endotoxin shock. *Prog Clin Biol Res* 388: 417-23.

Martinez E, Figueroa R, Garry D, Visintainer P, Patel K, Verma U, Sehgal PB, Tejani N (1998) Elevated Amniotic Fluid Interleukin-6 as a Predictor of Neonatal Periventricular Leukomalacia and Intraventricular Hemorrhage. *Journal of Maternal-Fetal Investigation* 8: 101-107.

- Martinot A, Leclerc F, Cremer R, Leteurtre S, Fourier C, Hue V (1997) Sepsis in neonates and children: definitions, epidemiology, and outcome. *Pediatr Emerg Care* 13: 277-81.
- Marty C, Misset B, Tamion F, Fitting C, Carlet J, Cavaillon JM (1994) Circulating interleukin-8 concentrations in patients with multiple organ failure of septic and nonseptic origin. *Crit Care Med* 22: 673-9.
- Mathison JC, Wolfson E, Ulevitch RJ (1988) Participation of tumor necrosis factor in the mediation of gram negative bacterial lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. *J Clin Invest* 81: 1925-37.
- Mazolewski PJ, Barber A, Williams S, Simoni J, Davis S, Shires GT (1999) Attenuating tumor necrosis factor alpha does not ameliorate other cytokine and peroxidase products during sepsis. *Am J Surg* 178: 556-9.
- McColm JR, McIntosh N (1994) Interleukin-8 in bronchoalveolar lavage samples as predictor of chronic lung disease in premature infants. *Lancet* 343: 729.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19: 683-765.
- Morales WJ (1987) The effect of chorioamnionitis on the developmental outcome of preterm infants at one year. *Obstet Gynecol* 70: 183-6.
- Moreland LW, Schiff MH, Baumgartner SW, Tindall EA, Fleischmann RM, Bulpitt KJ, Weaver AL, Keystone EC, Furst DE, Mease PJ, Ruderman EM, Horwitz DA, Arkfeld DG, Garrison L, Burge DJ, Blosch CM, Lange ML, McDonnell ND, Weinblatt ME (1999) Etanercept therapy in rheumatoid arthritis. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 130: 478-86.
- Munoz C, Misset B, Fitting C, Bleriot JP, Carlet J, Cavaillon JM (1991) Dissociation between plasma and monocyte-associated cytokines during sepsis. *Eur J Immunol* 21: 2177-84.
- National Institute of Health Consensus development conference 1995 Effect of corticosteroids for fetal maturation and perinatal outcomes. *Am J Obstet Gynecol* 173: 253-344
- Newton ER, Piper J, Peairs W (1997) Bacterial vaginosis and intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 176: 672-7.
- Opsjön SL, Wathen NC, Tingulstad S, Wiedswang G, Sundan A, Waage A, Austgulen R (1993) Tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6 in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 169: 397-404.
- Pierce MR, Bancalari E (1995) The role of inflammation in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol* 19: 371-8.
- Pillay V, Savage N, Laburn H (1994) Circulating cytokine concentrations and cytokine production by monocytes from newborn babies and adults. *Pflugers Arch* 428: 197-201.
- Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E (1993) Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest* 103: 565-75.
- Quagliarello VJ, Wispelwey B, Long WJ, Jr., Scheld WM (1991) Recombinant human interleukin-1 induces meningitis and blood-brain barrier injury in the rat. Characterization and comparison with tumor necrosis factor. *J Clin Invest* 87: 1360-6.

- Rojas MA, Gonzalez A, Bancalari E, Claire N, Poole C, Silva-Neto G (1995) Changing trends in the epidemiology and pathogenesis of neonatal chronic lung disease. *J Pediatr* 126: 605-10.
- Romagnani S (2000) T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 85: 9-18; quiz 18, 21.
- Romero R, Gomez R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Edwin SS, Berry SM (1998) A fetal systemic inflammatory response is followed by the spontaneous onset of preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol* 179: 186-93.
- Rowen JL, Smith CW, Edwards MS (1995) Group B streptococci elicit leukotriene B4 and interleukin-8 from human monocytes: neonates exhibit a diminished response. *J Infect Dis* 172: 420-6.
- Saija A, Princi P, Lanza M, Scalese M, Aramnejad E, De Sarro A (1995) Systemic cytokine administration can affect blood-brain barrier permeability in the rat. *Life Sci* 56: 775-84.
- Salafia CM, Minior VK, Rosenkrantz TS, Pezzullo JC, Popek EJ, Cusick W, Vintzileos AM (1995) Maternal, placental, and neonatal associations with early germinal matrix/intraventricular hemorrhage in infants born before 32 weeks' gestation. *Am J Perinatol* 12: 429-36.
- Schibler KR, Liechty KW, White WL, Rothstein G, Christensen RD (1992) Defective production of interleukin-6 by monocytes: a possible mechanism underlying several host defense deficiencies of neonates. *Pediatr Res* 31: 18-21.
- Schibler KR, Trautman MS, Liechty KW, White WL, Rothstein G, Christensen RD (1993) Diminished transcription of interleukin-8 by monocytes from preterm neonates. *J Leukoc Biol* 53: 399-403.
- Schild PN, Charles BG (1994) Determination of dexamethasone in plasma of premature neonates using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 658: 189-92.
- Schultz C (2003) Intracytoplasmic detection of proinflammatory cytokines and chemokines in monocytes by flow cytometry. *Methods Mol Biol* 215: 29-39.
- Schultz C, Rott C, Richter N, Bucsky P (1999) Intracytoplasmic detection of cytokines in neonatal lymphocytes and monocytes by flow cytometry. *Blood* 93: 3566-7.
- Schultz C, Rott C, Temming P, Schlenke P, Moller JC, Bucsky P (2002a) Enhanced interleukin-6 and interleukin-8 synthesis in term and preterm infants. *Pediatr Res* 51: 317-22.
- Schultz C, Rott C, Temming P, von Puttkammer J, Bucsky P (2002b) Influence of specimen age and use of different negative controls in determination of intracytoplasmic levels of cytokines after whole-blood culture assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 295-8.
- Schultz C, Temming P, Gembruch U, Strunk T, Bucsky P (2002c) Polyclonal intravenous immunoglobulin to prevent brain injury in preterm infants. *Lancet* 359: 1522-3; discussion 1523-4.
- Schultz C, Tautz J, Reiss I, Moller JC (2003) Prolonged mechanical ventilation induces pulmonary inflammation in preterm infants. *Biol Neonate* 84: 64-6.
- Schultz C, Temming P, Bucsky P, Göpel W, Strunk T, Härtel C (2004) Immature anti-inflammatory response in neonates. *Clin Exp Immunol* 135: 130-6.

Splawski JB, Yamamoto K, Lipsky PE (1998) Deficient interleukin-10 production by neonatal T cells does not explain their ineffectiveness at promoting neonatal B cell differentiation. *Eur J Immunol* 28: 4248-56.

Stoll BJ, Gordon T, Korones SB, Shankaran S, Tyson JE, Bauer CR, Fanaroff AA, Lemons JA, Donovan EF, Oh W, Stevenson DK, Ehrenkranz RA, Papile LA, Verter J, Wright LL (1996a) Early-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *J Pediatr* 129: 72-80.

Stoll BJ, Gordon T, Korones SB, Shankaran S, Tyson JE, Bauer CR, Fanaroff AA, Lemons JA, Donovan EF, Oh W, Stevenson DK, Ehrenkranz RA, Papile LA, Verter J, Wright LL (1996b) Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *J Pediatr* 129: 63-71.

Stoll BJ (2004) Infections of the neonatal infant. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB (ed.) *Nelson Textbook of Pediatrics*, Chapter 98, Part XI, The fetus and the neonatal infant. WB Saunders Company, Philadelphia, USA, pp 623-40

Stoll BJ, Kliegman RM (2004) The high risk infant. In Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB (ed.) *Nelson Textbook of Pediatrics*, Chapter 86, Part XI, The fetus and the neonatal infant. WB Saunders Company, Philadelphia, USA, pp 547-59

Strieter RM, Kunkel SL, Bone RC (1993) Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation. *Crit Care Med* 21: S447-63.

Strunk T, Temming P, Gembruch U, Reiss I, Bucsky P, Schultz C (2004) Differential maturation of the innate immune response in human fetuses. *Pediatr Res* 56: 219-26.

Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, Rutgeerts PJ (1997) A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med* 337: 1029-35.

Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A (1987) Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 330: 662-4.

Van den Brande JM, Braat H, van den Brink GR, Versteeg HH, Bauer CA, Hoedemaeker I, van Montfrans C, Hommes DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ (2003) Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 124: 1774-85.

van der Poll T, Lowry SF (1995) Tumor necrosis factor in sepsis: mediator of multiple organ failure or essential part of host defense? *Shock* 3: 1-12.

van Deventer SJ (2001) Transmembrane TNF-alpha, induction of apoptosis, and the efficacy of TNF-targeting therapies in Crohn's disease. *Gastroenterology* 121: 1242-6.

van Dullemen HM, van Deventer SJ, Hommes DW, Bijl HA, Jansen J, Tytgat GN, Woody J (1995) Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology* 109: 129-35.

Vesikari T, Janas M, Gronroos P, Tuppurainen N, Renlund M, Kero P, Koivisto M, Kunnas M, Heinonen K, Nyman R, et al. (1985) Neonatal septicaemia. *Arch Dis Child* 60: 542-6.

- Watterberg KL, Demers LM, Scott SM, Murphy S (1996) Chorioamnionitis and early lung inflammation in infants in whom bronchopulmonary dysplasia develops. *Pediatrics* 97: 210-5.
- Wolke D, Meyer R (1999) Cognitive status, language attainment, and prereading skills of 6-year-old very preterm children and their peers: the Bavarian Longitudinal Study. *Dev Med Child Neurol* 41: 94-109.
- Wood NS, Marlow N, Costeloe K, Gibson AT, Wilkinson AR (2000) Neurologic and developmental disability after extremely preterm birth. EPICure Study Group. *N Engl J Med* 343: 378-84.
- Yachie A, Takano N, Ohta K, Uehara T, Fujita S, Miyawaki T, Taniguchi N (1992) Defective production of interleukin-6 in very small premature infants in response to bacterial pathogens. *Infect Immun* 60: 749-53.
- Yoon BH, Jun JK, Romero R, Park KH, Gomez R, Choi JH, Kim IO (1997a) Amniotic fluid inflammatory cytokines (interleukin-6, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha), neonatal brain white matter lesions, and cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol* 177: 19-26.
- Yoon BH, Kim CJ, Romero R, Jun JK, Park KH, Choi ST, Chi JG (1997b) Experimentally induced intrauterine infection causes fetal brain white matter lesions in rabbits. *Am J Obstet Gynecol* 177: 797-802.
- Yoon BH, Romero R, Jun JK, Park KH, Park JD, Ghezzi F, Kim BI (1997c) Amniotic fluid cytokines (interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8) and the risk for the development of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Obstet Gynecol* 177: 825-30.
- Yoon BH, Romero R, Kim CJ, Jun JK, Gomez R, Choi JH, Syn HC (1995) Amniotic fluid interleukin-6: a sensitive test for antenatal diagnosis of acute inflammatory lesions of preterm placenta and prediction of perinatal morbidity. *Am J Obstet Gynecol* 172: 960-70.
- Yoon BH, Romero R, Kim CJ, Koo JN, Choe G, Syn HC, Chi JG (1997d) High expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in periventricular leukomalacia. *Am J Obstet Gynecol* 177: 406-11.
- Yoon BH, Romero R, Kim KS, Park JS, Ki SH, Kim BI, Jun JK (1999) A systemic fetal inflammatory response and the development of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Obstet Gynecol* 181: 773-9.
- Yoon BH, Romero R, Park JS, Kim CJ, Kim SH, Choi JH, Han TR (2000) Fetal exposure to an intra-amniotic inflammation and the development of cerebral palsy at the age of three years. *Am J Obstet Gynecol* 182: 675-81.
- Yoon BH, Romero R, Yang SH, Jun JK, Kim IO, Choi JH, Syn HC (1996) Interleukin-6 concentrations in umbilical cord plasma are elevated in neonates with white matter lesions associated with periventricular leukomalacia. *Am J Obstet Gynecol* 174: 1433-40.
- Zeni F, Freeman B, Natanson C (1997) Anti-inflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: a reassessment. *Crit Care Med* 25: 1095-100.

8 Danksagung

Herrn PD Dr. med. Christian Schultz danke ich zunächst für die Überlassung des Themas. Darüber hinaus gilt ihm mein ganz besonderer Dank für die immer währende geduldige und konstruktive Unterstützung und Förderung meiner Arbeit und für die Vielzahl wertvoller Hinweise und Anregungen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Peter Bucsky für sein fortwährendes Interesse an meiner Arbeit bedanken; er legte den Grundstein für die Arbeit und gestaltete für mich Rahmenbedingungen, die ganz wesentlich zum Gelingen beitrugen.

Für die fachlich qualifizierte Anleitung und für die freundschaftliche Zusammenarbeit im Labor möchte ich mich besonders bei Frau Nina Klapproth bedanken. In ihrer großen Sorgfalt bei allen Arbeitsschritten war sie für mich ein nachahmenswertes Vorbild.

Des Weiteren danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Station 12 N und des Kreißsaals der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des UK-SH, Campus Lübeck, für die gute Zusammenarbeit bei der Gewinnung des Untersuchungsmaterials.

Bei dem Verein „Lübeck Hilfe für krebskranke Kinder e. V.“ möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung der Arbeit der hämatologisch-onkologischen Arbeitsgruppe bedanken.

Meiner Familie, besonders meinen Eltern und meinem Bruder Carsten, gilt an dieser Stelle ein ganz besonderer Dank. Durch ihre liebevolle Begleitung, ihr Vertrauen und ihre großzügige Unterstützung haben sie einen erheblichen Anteil am Zustandekommen dieser Arbeit.

Zudem möchte ich meinen Freundinnen und Freunden für ihr großes Verständnis, für ihre Motivation in schwierigen Phasen und für ihre tatkräftigen Beiträge zur Aufrechterhaltung meiner Interessen außerhalb des Doktorandenalltags vielmals danken.

9 Lebenslauf

Name, Vorname:	Temming, Petra
Geburtsort:	Osnabrück
Geburtsdatum:	1. November 1976
1983 - 1989	Antoniusgrundschule Holzhausen, Georgsmarienhütte, Orientierungsstufe Dom, Osnabrück
1989 - 1996	Ratsgymnasium Osnabrück, Abiturnote: 1,5
10.1996 - 05.2003	Studium der Humanmedizin: Medizinische Universität zu Lübeck
09.1998 - 07.1999	Studium der Humanmedizin: Universidad de Barcelona, Spanien
08.1998	Ärztliche Vorprüfung
seit 03.2000	Doktorandin an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des UK Schleswig-Holstein, Campus Lübeck (Experimenteller Teil in der Zeit von März 2000 bis Mai 2002)
08.2001	Erster Abschnitt ärztliche Prüfung
03.2002	Zweiter Abschnitt ärztliche Prüfung
04.2002 - 03.2003	Praktisches Jahr: <ol style="list-style-type: none">1. Pädiatrie, UK Schleswig-Holstein, Campus Lübeck2. Chirurgie, Hospital Clinic, Barcelona, Spanien3. Innere Medizin, Somerset Hospital, Kapstadt, Südafrika (Stipendiatin des Deutschen akademischen Austauschdienstes)
04.2003	Dritter Abschnitt ärztliche Prüfung, Gesamtnote der ärztlichen Prüfung: sehr gut
10.2003 – 09.2004	Ärztin im Praktikum an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des UK Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
10.2004	Approbation als Ärztin
seit 10.2004	Assistenzärztin an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des UK Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

Veröffentlichungen

Schultz C, Rott C, Temming P, Schlenke P, Möller JC, Bucsky P (2002) Enhanced interleukin-6 and interleukin-8 synthesis in term and preterm infants. *Pediatr Res* 51: 317-22.

Schultz C, Rott C, Temming P, von Puttkammer J, Bucsky P (2002) Influence of specimen age and use of different negative controls in determination of intracytoplasmic levels of cytokines after whole-blood culture assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 295-8.

Schultz C, Temming P, Gembruch U, Strunk T, Bucsky P (2002) Polyclonal intravenous immunoglobulin to prevent brain injury in preterm infants. *Lancet* 359: 1522-3; discussion 1523-4.

Schultz C, Temming P, Bucsky P, Göpel W, Strunk T, Härtel C (2004) Immature anti-inflammatory response in neonates. *Clin Exp Immunol* 135: 130-6.

Strunk T, Temming P, Gembruch U, Reiss I, Bucsky P, Schultz C (2004) Differential maturation of the innate immune response in human fetuses. *Pediatr Res* 56: 219-26.