

**Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. E. Herting**

Charakterisierung der durch *Staphylococcus epidermidis* induzierten
Immunantwort bei Früh- und Neugeborenen und deren Beeinflussung
durch anti-inflammatorische Substanzen

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Ines Osthues

aus Oelde

Lübeck 2013

1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Christoph Härtel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med Peter Kujath

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.2013

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 31.10.2013

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

I	INHALTSVERZEICHNIS	
II	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	4
III	TABELLENVERZEICHNIS	4
IV	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1	EINLEITUNG.....	7
1.1	Frühgeburtlichkeit.....	7
1.2	Neonatale Sepsis	8
1.3	Immunsystem des Frühgeborenen	10
1.4	Zytokine	13
1.4.1	Interleukin-6.....	14
1.4.2	Tumornekrosefaktor- α	14
1.4.3	Interleukin-10.....	15
1.4.4	Transforming Growth Faktor- β	15
1.5	Ibuprofen und Indomethacin.....	16
1.6	Staphylococcus epidermidis	17
2	FRAGESTELLUNG.....	20
3	MATERIAL UND METHODEN	21
3.1	Reagenzien.....	21
3.2	Geräte, Hilfsmittel	21
3.3	Stimulantien	22
3.4	Medikamente	22
3.5	Antikörper.....	22
3.6	Computerprogramme	23
3.7	Blutproben von Probanden und Patienten	23
3.7.1	Probanden der einzelnen Versuchsreihen	24
3.8	Messung intrazellulärer Zytokine	24
3.8.1	Vollblutkulturansatz.....	24
3.8.2	Vorbereitung der Zellen und intrazelluläre Zytokinfärbung	26
3.8.3	Durchflusszytometrische Messung	28
3.9	Bestimmung der Zytokinsekretion in Kulturüberständen mittels ELISA	28
3.10	Statistik	28

4	ERGEBNISSE.....	29
4.1	Etablierung eines Staphylococcus epidermidis-Sepsis-Modell in-vitro	29
4.2	Inflammatorische Immunantwort auf Staphylococcus epidermidis und LPS in Abhängigkeit vom Gestationsalter	32
4.2.1	Pro-inflammatorische Immunantwort auf Staphylococcus epidermidis ist abhängig vom Gestationsalter	32
4.2.2	Anti-inflammatorische Immunantwort auf Staphylococcus epidermidis ist unabhängig vom Gestationsalter	35
4.3	Verschiedene Stämme von Staphylococcus epidermidis induzieren eine unterschiedliche IL-6-Antwort	36
4.4	Immunmodulatorischer Einfluss durch anti-inflammatorische Substanzen	37
5	DISKUSSION	40
6	ZUSAMMENFASSUNG	49
V	LITERATURVERZEICHNIS	51
VI	ANHANG.....	60
6.1	Definition einer Sepsis bei Früh- und Neugeborenen nach dem Surveillance- Protokoll	60
VII	PUBLIKATIONEN	61
VIII	DANKSAGUNG	62
IX	LEBENS LAUF.....	63

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 a: IL-6 Messung nach Stimulation mit zwei verschiedenen S. epidermidis Konzentrationen	30
Abbildung 1 b: TNF- α Messung nach Stimulation mit zwei verschiedenen S. epidermidis Konzentrationen	31
Abbildung 2 a: IL-6 Produktion nach S. epidermidis Stimulation in Abhängigkeit vom Gestationsalter	33
Abbildung 2 b: TNF- α Produktion nach S. epidermidis Stimulation in Abhängigkeit vom Gestationsalter	34
Abbildung 3: IL-6 Produktion nach Stimulation mit verschiedenen S. epidermidis Stämmen	37

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Risikofaktoren der Sepsis bei Frühgeborenen	9
Tabelle 2: Unreife des körpereigenen Abwehrsystems bei sehr kleinen Frühgeborenen (in Anlehnung an die Tabelle von Faust et al., 2011)	12
Tabelle 3: Reagenzien für den Zellkulturansatz	26
Tabelle 4: Reagenz zur Permeabilisation.....	27
Tabelle 5: Klinische Daten von allen in der Studie aufgenommenen Frühgeborenen	32
Tabelle 6: Zytokinproduktion in Vollblutkulturüberständen in Korrelation mit dem Gestationsalter	35
Tabelle 7: Einfluss von Indomethacin auf die Zytokinproduktion bei Neugeborenen	38
Tabelle 8: Einfluss von Ibuprofen auf die Zytokinproduktion bei Neugeborenen.....	39
Tabelle 9: Einfluss von Ibuprofen auf die Zytokinproduktion beim Erwachsenen	39
Tabelle 10: Definition einer Sepsis bei Früh- und Neugeborenen nach dem Surveillance-Protokoll NEO-KISS des NRZ (Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen des Robert Koch Institutes)	60

IV Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
al.	alii
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
C	Celsius
ca.	circa
CARS	Compensatory anti-inflammatory response syndrome
CD	Cluster of Differentiation
COX	Cyclooxygenase
CRP	C-reaktives Protein
CTG	Cardiotocographie
E. coli	Escherichia coli
ELBW	Extremely-low-birth-weight infant (Geburtsgewicht <1000g)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EOS	Early-onset Sepsis
ica	intercellular adhesion
IFN- γ	Interferon-gamma
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IVH	Intraventrikuläre Hämorrhagie
KBE	koloniebildende Einheit
KI	Konfidenzintervall
KNS	Koagulase-negative Staphylokokken
LBW	Low-birth-weight infant (Geburtsgewicht <2500g)
LOS	Late-onset Sepsis
LPS	Lipopolysaccharid
ml	Milliliter
NIPS	Neugeborenen Intensivpflegestation
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
PAN	Prävalenz angeborener Herzfehler bei Neugeborenen
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffer Solution

PCR	Polymerasekettenreaktion
PDA	Patent Ductus arteriosus
PFA	Paraformaldehyd
PGE2	Prostaglandin E 2
PIA	Polysaccharide intercellular adhesin
S. epidermidis	Staphylococcus epidermidis
SD	Standardabweichung
SSW	Schwangerschaftswoche
TGF- β	Transforming Growth Faktor-beta
Th	T-Helferzelle
TLR2	Toll-like Rezeptor 2
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
U	Umdrehung
VLBW	Very-low-birth-weight infant (Geburtsgewicht <1500g)
vs.	versus
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

1.1 Frühgeburtlichkeit

Ein Frühgeborenes ist gemäß der WHO-Definition ein Kind, das nach Beginn der 22. Schwangerschaftswoche und vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche geboren wurde. Wird ein Kind vor der abgeschlossenen 32. Schwangerschaftswoche geboren, spricht man von einem sehr frühen Frühgeborenen. Man teilt die Frühgeborenen anhand ihres Geburtsgewichts in drei verschiedene Gruppen ein: unter 2500g = niedriges Geburtsgewicht (LBW: low-birth-weight infant), unter 1500g = sehr niedriges Geburtsgewicht (VLBW: very-low-birth-weight infant) und unter 1000g = extrem niedriges Geburtsgewicht (ELBW: extremely-low-birth-weight infant). Laut Bundesverband für das frühgeborene Kind e.V. wurden im Jahr 2008 in Deutschland insgesamt 60.354 Kinder zu früh geboren, das waren 9,0 % aller Geburten. Der Anteil der unter der 32. SSW geborenen Kinder betrug 1,4 %. 9.133 Kinder wogen weniger als 1.500 Gramm (BQS-Länderauswertung Geburtshilfe 2008).

Als Auslöser für eine Frühgeburt spielen verschiedene Faktoren eine Rolle. Mütterliche Risikofaktoren, z.B. allgemeine Faktoren wie Präeklampsie, Nikotinkonsum, Diabetes oder lokale Faktoren wie z.B. Gebärmuttermyome, Blutungen, vorzeitige Wehen und vorzeitiger Blasensprung sind dabei bedeutsam. Auch gibt es fetale Risikofaktoren; dazu zählen unter anderem Mehrlingsschwangerschaften, intrauterine Wachstumsverzögerung oder chromosomale Anomalien. Die häufigste Ursache für eine Frühgeburt sind aufsteigende urogenitale Infektionen der Mutter. In vielen Fällen bleibt jedoch die Ursache für verfrühte Wehen und/oder einen vorzeitigen Blasensprung unklar (Goldenberg et al., 2008).

Die Frühgeburtlichkeit stellt die häufigste Ursache der perinatalen Mortalität und Morbidität in den industrialisierten Ländern dar. Aufgrund der Unreife ihrer Organe besteht bei Frühgeborenen ein erheblich höheres Risiko für das Auftreten schwerer Erkrankungen, wie z.B. Infektionen, Hirnblutungen (intraventrikuläre Hämorrhagie), Hirnschäden (periventrikuläre Leukomalazie), Lungenerkrankungen (Atemnotsyndrom, BPD), Darmerkrankungen (nekrotisierende Enterocolitis) und Retinopathien.

Durch optimierte intensivmedizinische Maßnahmen konnte in den letzten Jahrzehnten die Überlebenschance der Frühgeborenen verbessert werden. Dennoch beträgt die Letalität bei den Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g ca. 10 %

(Stichtenoth et al., 2012), wobei Erkrankungen der Lunge und Sepsis die wichtigsten Ursachen darstellen.

1.2 Neonatale Sepsis

Die neonatale Sepsis stellt eines der Hauptprobleme in der Neonatologie dar. Bakterielle Infektionen sind mit 1,1-2,7% der Lebendgeborenen die häufigsten Erkrankungen in der Neugeborenenperiode (Sitzmann, 2002). Eine Neugeborenen-sepsis, definiert als klinische Infektion innerhalb der ersten 28 Lebenstage mit Erreger-positiver Blutkultur, tritt bei ca. 1-10 /1000 Lebendgeburten auf (Gladstone et al., 1990; Martinot et al., 1997). Aufgrund der unterschiedlichen Pathogenese und des Erregerspektrums kann das Krankheitsbild der neonatalen Sepsis in early-onset und late-onset Sepsis unterteilt werden. Tritt die Sepsis innerhalb der ersten drei Lebenstage (<72 h post partum) auf, so spricht man von einer Frühsepsis (early-onset). Hier werden die Erreger schon intrauterin oder peripartal auf das Kind übertragen. Es handelt sich dabei meistens um B-Streptokokken und E.coli. Beginnt die Infektion nach dem 3. Lebenstag (>72 h post partum), handelt es sich um eine Spätsepsis (late-onset). Die Erreger entstammen der patienteneigenen Flora oder dem Hospitalkeimen der Klinik (nosokomiale Infektion). Typischerweise treten sie zwischen dem 7. und 21. Lebenstag auf (Schneeweiß, 2001; Faust et al., 2011).

Late-onset Septitiden (LOS) stellen bei Frühgeborenen ein häufiges und schweres Problem dar. Durch ihr unausgereiftes Immunsystem sind Frühgeborene anfälliger für Infektionen. Je geringer das Gestationsalter und je niedriger das Geburtsgewicht ist, desto höher ist das Risiko, eine nosokomiale Infektion zu entwickeln (Freeman et al., 1990). Bei VLBW Frühgeborenen liegt das nosokomiale Sepsisrisiko bei 10-30% (Makhoul et al., 2002; Stoll et al., 2002; Faust et al., 2011). Die Mortalität liegt zwischen 5-21% in Abhängigkeit vom Gestationsalter (Martinot et al., 1997; Fanaroff et al., 1998; Rodriguez et al., 1998). Neben der Unreife ihres Immunsystems spielen weitere Faktoren eine Rolle, die das Infektionsrisiko der Frühgeborenen erhöhen. Im Gegensatz zu gesunden Termingeborenen müssen Frühgeborene im Rahmen ihrer lebensnotwendigen intensivmedizinischen Behandlung häufiger mit intravenösen Zugängen und endotrachealen Tuben versorgt werden. Somit werden natürliche Schutzmechanismen wie die Ziliarfunktion der Atemwegsepithelien oder die Hautbarriere durch invasive Therapie- und Diagnostikverfahren gestört und

ermöglichen so den Hautkeimen den Eintritt in die Blutbahn. Studien belegen, dass 66-74,1 % der Septitiden auf neonatologischen Intensivstationen Gefäßkatheter –assoziiert sind (Raymond et al., 2000; Gastmeier, 2008). Auch steigt das Risiko, eine Sepsis zu entwickeln, mit der Länge des stationären Aufenthaltes (Fanaroff et al., 1998; Freeman et al., 1990).

Weitere Faktoren, die zur erhöhten Infektanfälligkeit bei Frühgeborenen beitragen könnten, sind immunmodulatorische Medikamente die im Rahmen der intensivmedizinischen Betreuung eingesetzt werden. Gelegentlich werden in der Neonatologie zur Verbesserung der respiratorischen Funktion immunsuppressiv-wirkende Steroide eingesetzt. Zum einen antenatal zur Induktion der Lungenreife, zum anderen postnatal bei Kindern mit BPD-Risikoerhöhung. Studien belegen ein höheres Sepsisrisiko bei der Anwendung von postnatalen Steroiden (Johnson-Robbins et al., 1996; Stoll et al., 1999).

Des Weiteren werden die antiphlogistisch wirkenden Substanzen Indomethacin und Ibuprofen bei hämodynamisch wirksamem offenen Ductus arteriosus Botalli eingesetzt, über deren Beeinflussung des neonatalen Immunsystems ist noch wenig bekannt.

In Tabelle 1 sind die wichtigsten Risikofaktoren der Sepsis bei Frühgeborenen aufgezählt.

Risikofaktoren der Sepsis	Referenz
Gestationsalter	Freeman et al., 1990; Stoll et al., 2002; Faust et al., 2011
Geburtsgewicht	Freeman et al., 1990; Stoll et al., 2002; Faust et al., 2011
Invasive Beatmung und Beatmungsdauer	Stoll et al., 2002; Makhoul et al., 2002
Verweildauer auf der NIPS	Freeman et al., 1990; Couto et al., 2006
Parenteralen Ernährung	Faranoff et al., 1998; Freeman et al., 1990; Sohn et al., 2001
Versorgung mit Kathetern, Traumata der Haut und Schleimhäute	Raymond und Aujard, 2000; Sohn et al., 2001; Chien et al., 2002
Gabe von immunsupprimierenden Medikamenten	Johnson-Robbins et al., 1996; Stoll et al., 1999
Unreife des Immunsystems	(siehe Tabelle 2)

Tabelle Risikofaktoren der Sepsis bei Frühgeborenen

Die häufigsten Erreger der nosokomialen Sepsis sind wenig –virulente, koagulase-negative Staphylokokken (KNS). Ca. 50-60 % der late-onset Septitiden werden durch KNS verursacht (Stoll et al., 2002; Isaacs et al., 2003; Faust et al., 2011). Der am häufigsten in Blutkulturen nachgewiesene Keim ist der zur KNS-Spezies gehörende *Staphylococcus epidermidis* (S. epidermidis).

Eine frühzeitige Diagnose und Behandlung einer Sepsis ist von großer Bedeutung. Jedoch ist die Diagnose häufig schwer zu stellen, da die klinischen Symptome bei Frühgeborenen und Neugeborenen sehr unspezifisch sind. Neben klinischen Zeichen wie Lethargie, Tachykardie, Hypotension, Apnoen, Hypo-/Hyperthermie oder gastrointestinaler Symptomatik, helfen auffällige Laborparameter bei der Diagnosestellung. Ein Keimnachweis in Blutkulturen gelingt nur selten (ca. 10-20 % (Faust et al., 2011)). Da ein Erregernachweis häufig nicht möglich ist, wurden differenzierte Definitionen der primären Sepsis bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht < 1500 g nach dem Surveillance-Protokoll NEO-KISS des NRZ (Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen des Robert Koch Institutes) etabliert. Dabei werden drei verschiedene Sepsisformen unterschieden: die klinische Sepsis ohne Erregernachweis, die mikrobiologisch bestätigte Sepsis und die mikrobiologisch bestätigte Sepsis durch KNS (Geffers et al., 2005) (Kriterien: siehe Anhang).

1.3 Immunsystem des Frühgeborenen

Die Aufgabe des Immunsystems besteht darin, körperfremde Strukturen zu erkennen und zu beseitigen. Das Immunsystem wird in eine angeborene (unspezifische) und adaptive (spezifische) Infektionsabwehr eingeteilt. Dabei stehen die angeborene und die adaptive Immunität in enger Wechselbeziehung. Das angeborene Immunsystem ist für die frühe Abwehr von Mikroorganismen zuständig. Sie ist unspezifisch und somit gegen eine Vielzahl von Pathogenen gerichtet. Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Killerzellen bilden die zelluläre Abwehr des angeborenen Immunsystems. Zu den molekularen Bestandteilen gehören Akute-Phase-Proteine, das Komplementsystem, antimikrobielle Peptide sowie die von Monozyten und Makrophagen gebildeten Zytokine. Eine weitere Komponente ist die physiko-chemische Barriere der Haut und Schleimhäute.

Die spezifische Abwehr wird durch zwei Klassen von Lymphozyten vermittelt, B- und T-Zellen. Sie ist spezifisch gegen Antigene eines bestimmten Erregers gerichtet. Wichtiger Bestandteil sind die von Plasmazellen gebildeten Immunglobuline (Janeway et al., 2002 a).

Im Vordergrund der Infektabwehr bei Neugeborenen steht das angeborene Immunsystem. Das Immunsystem des Frühgeborenen ist bei der Geburt noch nicht vollständig ausgereift. Es lassen sich Defizite in verschiedenen Bereichen des körpereigenen Abwehrsystems nachweisen.

So sind Frühgeborene im Gegensatz zu älteren Kindern und Erwachsenen nicht in der Lage, aufgrund einer verminderten Knochenmarkreserve während akuter bakterieller Infektionen die Zahl der zirkulierenden Neutrophilen drastisch zu erhöhen (Carr und Huizinga, 2000). Studien belegen, dass außerdem funktionelle Aktivitäten wie z.B. Adhärenz, Verformbarkeit, Chemotaxis, Rezeptor-Expression und Phagozytose neonataler Neutrophiler herabgesetzt sind (Chirico et al., 1985; Anderson, 1989; Falconer et al., 1995; Carr, 2000). Die opsonisierende Aktivität und Phagozytosefähigkeit der neonatalen Granulozyten ist abhängig vom Gestationsalter (Fleer et al., 1985). Die Granulozyten Frühgeborener weisen außerdem eine verminderte oxidative Aktivität auf (Drossou et al., 1997). Auch konnte gezeigt werden, dass bei Frühgeborenen der Spiegel vom Granulozyten-stimulierenden Faktor abhängig vom Gestationsalter ist (Chirico et al., 1997). Es ist davon auszugehen, dass der quantitative und der qualitative Mangel im phagozytären System einen Großteil der erhöhten Infektanfälligkeit der Frühgeborenen ausmachen.

Des Weiteren besitzen Frühgeborene unter der 32. SSW unzureichende Immunglobulinspiegel, da die Übertragung mütterlicher Antikörper über die Plazenta auf den Fetus erst ab der 17. SSW stattfindet, vor allem aber während des letzten Schwangerschaftstrimenons. Der protektive Effekt („Nestschutz“) der mütterlichen IgG Antikörper durch opsoninabhängige Phagozytose ist somit bei den Frühgeborenen vermindert. Die Immunglobulinkonzentration der Frühgeborenen korreliert mit dem Gestationsalter (Ballow et al., 1986). Eine weitere Ursache der erhöhten Infektionsneigung ist, dass Frühgeborene einen deutlichen Mangel an Komplementfaktoren zeigen. Die Konzentration von Komplementfaktoren ist umso niedriger je geringer das Gestationsalter des Kindes ist (Wolach et al., 1997). Auch zeigt sich bei Frühgeborenen eine verminderte Aktivität der natürlichen Killerzellen (Gasparoni et al., 2003).

Des Weiteren weist das spezifische Immunsystem der Frühgeborenen Defizite auf. Die Unreife der T- und B-Zellen ist unter anderem durch eine reduzierte Lymphozytenproliferation und eine verminderte Antikörperproduktion charakterisiert (Splawski et al., 1991; Voeten et al., 1993).

Tabelle 2 verdeutlicht die Funktionseinschränkung der einzelnen Abwehrsysteme beim Frühgeborenen.

Abwehrsystem	Funktionseinschränkung beim Frühgeborenen	Referenz
Haut	Dünnere Keratinschicht, fehlendes Unterhaut Fettgewebe, damit Barrierefunktion vermindert, hoher Wasserverlust über die Haut, dadurch Entstehung eines feuchten Milieu Fehlende Mikroflora	Kalia et al., 1998 Rutter, 1996 Chiou et al., 2004
Schleimhaut	Gastrische Säureproduktion reduziert, Verlangsamte Peristaltik (Magenentleerung), Vulnerable Schleimhaut, reduzierte lokale Abwehr (Peyer-Plaques, IgA, intraepitheliale Granulozyten) Fehlende Mikroflora	Rognum et al., 1992 Mallow et al., 1996
„Nestschutz“ (Transfer mütterlicher Immunität)	Transfer der mütterlichen Immunglobuline (IgG) größtenteils erst nach der 28. SSW	Ballow et al., 1986
Angeborenes Immunsystem	Reduzierte Knochenmarkspeicher von Granulozyten Reduzierter Spiegel von Granulozyten-stimulierender Faktor Reduzierte Komplementaktivität Reduzierte Ausschüttung von Zytokinen Reduzierte Phagozytoseaktivität von Makrophagen Opsonisierungsaktivität unreif Unreifer „Oxydativer Burst“ Verminderte Bildung von Adhäsions-Molekülen	Carr u. Hurz., 2000 Chirico et al., 1997 Wolach et al., 1997 Drossou et al., 1997 Falconer et al., 1995 Fleer et al., 1985 Drossou et al., 1997 Strunk et al., 2004
Adaptives Immunsystem	Lymphozytenproliferation reduziert Reduzierte Antikörperproduktion Unreife Zytokinproduktion durch T-Lymphozyten Verminderte anti-inflammatorische Zytokinproduktion Unreife der natürlichen Killerzellen	Splawski et al., 1991 Voeten et al., 1993 Schultz et al., 2002 Schultz et al., 2004 Gasparoni et al., 2003

Tabelle : Unreife des körpereigenen Abwehrsystems bei sehr kleinen Frühgeborenen (in Anlehnung an die Tabelle von Faust et al., 2011)

Eine Besonderheit des fetalen Immunsystems ist eine dominierende Th2 – Immunantwort.

T-Helferzellen können sich unter Einfluss von Zytokinen in zwei Untergruppen, die Th1- und Th2-Zellen, ausdifferenzieren, die jeweils unterschiedliche Zytokine produzieren. Die Th1-Zellen führen zur zellvermittelten Immunität, insbesondere durch die Sekretion von pro-inflammatorisch wirkenden Zytokinen wie TNF- α , IFN- γ und IL-2. Von den Th2-Zellen werden die anti-inflammatorischen Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 freigesetzt, welche die Sekretion von Immunglobulinen stimulieren. Somit fördern Th2-Zellen die humorale Immunreaktion (Janeway et al., 2002b).

Die Dominanz der Th2-Immunantwort entsteht durch die hormonelle Umstellung während der Schwangerschaft im Rahmen einer physiologischen Immunsuppression (Toleranz). Die Differenzierung des maternalen und fetalen Immunsystems in Richtung Th2 ist für eine erfolgreiche Implantation, Plazentaentwicklung und das Überleben des Fetus unabdingbar (Dealtry et al., 2000; Raghupathy et al., 2000). Dadurch entsteht eine Verschiebung im Gleichgewicht der Th1/Th2- Zytokine zugunsten der anti-inflammatorisch wirkenden Th2-Zytokine (Dealtry et al., 2000; Levy, 2005; Morein et al., 2007). Durch die Th2-Dominanz steht folglich die humorale Immunantwort im Vordergrund, die zellvermittelte Immunität wird unterdrückt.

1.4 Zytokine

Zytokine sind lösliche Moleküle, die als Botenstoffe Interaktionen zwischen Zellen vermitteln.

Im Rahmen einer Infektion koordinieren sie das Zusammenspiel immunkompetenter Zellen und besitzen daher eine zentrale Rolle in einer adäquaten Immunantwort. Sie regulieren positiv und negativ eine Vielzahl verschiedener biochemischer Prozesse in der Entzündungskaskade. Zur Gruppe der Zytokine gehören Chemokine, Interferone, Interleukine, Wachstumsfaktoren und Tumornekrosefaktoren. Zytokine weisen vielfältige Funktionen auf, sie umfassen Chemotaxis, Aktivierung und Wachstumsregulation von Zielzellen, Angiogenese, Hämatopoese und Kontrolle der Apoptose. Sie werden von Makrophagen, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen und Fibroblasten gebildet. Die Wirkung der Zytokine erfolgt über eine Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Membran von Zielzellen. Zytokine werden aufgrund ihrer zentralen Rolle in der Immunantwort als biochemische Marker im Rahmen von Infektionen eingesetzt (Janeway et al., 2002c).

Zytokine besitzen einen fördernden und einen hemmenden Einfluss auf die Entzündungsreaktion. Entzündungsreaktionsfördernde Zytokine werden pro-inflammatorisch, hemmende Zytokine werden anti-inflammatorisch genannt.

Wichtig ist ein funktionierendes Gleichgewicht zwischen pro-inflammatorischer und anti-inflammatorischer Reaktion. Eine überschießende pro-inflammatorische Reaktion kann gewebetoxische Wirkungen haben und bis zum septischen Schock, Multi-Organversagen oder Tod führen. Die Effekte der pro-inflammatorischen Zytokine werden durch die hemmende Wirkung der anti-inflammatorischen Zytokine reguliert.

In Studien werden Zusammenhänge zwischen erhöhten pro-inflammatorischen Zytokin-Spiegeln und neonataler Organdysfunktionen hergestellt. So spielen beispielsweise erhöhte pro-inflammatorische Zytokine bei der Genese der periventrikulären Leukomalazie (Yoon et al., 1997) und des Atemnotsyndroms (Hitti et al., 1997) eine Rolle.

Frühere Studien zeigen, dass Früh- und Neugeborene durchaus in der Lage sind, ausreichende Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-6, IL-8, TNF- α) zu bilden. Die Expression der anti-inflammatorischen Zytokine (IL-10) ist jedoch im Vergleich zu Erwachsenen deutlich verringert (Dembinski et al., 2003; Schultz et al., 2002; Schultz et al., 2004).

Da Zytokine quantitativ messbare Botenstoffe sind, können sie als indirekte Parameter der Immunfunktion gedeutet werden. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Zytokine zu quantifizieren; ein etabliertes Verfahren ist der Vollblutassay mit Bestimmung der Zytokinexpression mittels Durchflusszytometrie oder ELISA.

In dieser Arbeit werden vor allem die folgenden vier Zytokine näher untersucht:

1.4.1 Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) ist ein pro-inflammatorisch wirkendes Zytokin. Als Hauptproduzent gelten die durch Antigenkontakt aktivierten Monozyten und Makrophagen. Zu den vielfältigen Effekten von IL-6 zählt die Stimulation des Wachstums und der Differenzierung von Lymphozyten, insbesondere der antigenproduzierenden B-Zellen. Außerdem stimuliert es die Hepatozyten zur Bildung von Akute-Phase-Proteinen und regt im Knochenmark die Proliferation der hämatopoetischen Stammzellen an (Borden et Chin., 1994). IL-6 ist ein Marker der Aktivität der Zytokin-Kaskade; die Konzentrationen im Serum korrelieren mit der Schwere und dem Outcome einer Sepsis (Damas et al., 1992; Hotoura et al., 2011). Da IL-6 mit hoher Sensitivität ein Frühindikator einer Sepsis ist, wird es in manchen Kliniken zu diagnostischen Zwecken eingesetzt.

1.4.2 Tumornekrosefaktor- α

Der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) wird hauptsächlich von Makrophagen ausgeschüttet. Er spielt eine zentrale Rolle bei der Koordination einer inflammatorischen Reaktion und in der Aktivierung der Zytokin-Kaskade. TNF- α fördert die Bildung von weiteren pro-inflammatorischen Zytokinen wie z.B. IL-6 und

IL-8. TNF- α induziert eine lokale entzündliche Reaktion, indem er die vaskuläre Permeabilität erhöht, die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten an die Gefäßwand fördert und eine intravasale Gerinnung hervorruft. Er kann auf entsprechende Zielzellen direkt zytotoxisch wirken und regt außerdem Makrophagen zur Phagozytose an. Systemisch induziert TNF- α Fieber und stimuliert die Bildung von Akute-Phase-Proteinen in der Leber. Eine überschießende Freisetzung von TNF- α kann durch die massive Vasodilatation, Plasmaverlust durch die Aktivierung des Gefäßendothels und intravasaler Gerinnung mit Verbrauchskoagulopathie, zu einem septischen Schock führen (Janeway et al., 2002c). TNF- α spielt eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie von entzündlichen Erkrankungen wie z.B. dem M. Crohn und der rheumatoiden Arthritis (Feldmann et al., 1996; Plevy et al., 1997).

1.4.3 Interleukin-10

Interleukin-10 (IL-10) gehört zur Klasse der anti-inflammatorisch wirkenden Zytokine. Gebildet wird es vor allem von stimulierten Th2-Zellen und Monozyten. Es unterdrückt die Proliferation des Monozyten-Makrophagen-Systems und verhindert somit überschießende Entzündungsreaktionen. Es reguliert die Synthese pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α und fördert die Proliferation der B-Lymphozyten und stimuliert diese zur Antigenproduktion (Janeway et al., 2002d; More et al., 2001).

1.4.4 Transforming Growth Faktor- β

Der Transforming Growth Faktor- β (TGF- β) wird in erster Linie von Monozyten und Makrophagen produziert. Er ist ein multifunktionelles Zytokin, das verschiedenste biologische Effekte wie Proliferation, Zelldifferenzierung, Embryonalentwicklung, Migration und Apoptose beeinflusst. TGF- β wirkt auf das Immunsystem supprimierend. Er inhibiert unter anderem die Zytokin-stimulierte Proliferation und Differenzierung von T- und B-Zellen und die zytotoxische Wirkung von zytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen (Ahuja et al., 1993; Janeway et al., 2002e). Eine weitere anti-inflammatorische Wirkung von TGF- β ist die Hemmung der Produktion von IL-1, IL-2, TNF- α und IFN- γ (Turner et al., 1990). TGF- β besitzt auch pro-inflammatorische Eigenschaften wie z.B. die Chemotaxis von Makrophagen (Wahl et al., 1987).

1.5 Ibuprofen und Indomethacin

In der Neonatologie kommen verschiedene Medikamente zum Einsatz, die das Immunsystem beeinflussen. Zu den häufig angewendeten Medikamenten gehören Ibuprofen und Indomethacin. Sie lassen sich in die Gruppe der nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) einordnen. Die Wirkung der NSAR beruht auf der Hemmung der Cyclooxygenasen (COX), die die Synthese von Prostaglandinen aus der Arachidonsäure katalysieren.

Es sind drei Isoenzyme der Cyclooxygenase nachgewiesen worden, COX I, COX II und COX III. Durch die COX I werden wichtige physiologische Vorgänge (gastrointestinale Zytrotektion, vaskuläre Homeostase und Nierenfunktion) reguliert. Sie kommt in vielen Geweben vor und wird konstitutiv exprimiert. Die COX II wird vor allem durch akute oder chronische Entzündungsprozesse induziert.

Im Rahmen einer Entzündung sind Prostaglandine wichtige immunmodulatorische Moleküle. Sie regulieren Prozesse wie z.B. Schmerzempfinden, Temperaturanstieg, Vasodilatation und Exsudation. Durch die Hemmung der Prostaglandinsynthese besitzen NSAR drei hauptsächliche Wirkungsqualitäten, die unterschiedlich stark ausgeprägt sein können, fiebersenkend (antipyretisch), analgetisch und entzündungshemmend (antiphlogistisch) (Smith et al., 2000).

Die häufigste Indikation von Ibuprofen und Indomethacin in der Neonatologie ist ein nach der Geburt persistierender Ductus arteriosus. Das Persistieren des Ductus arteriosus gehört zu den häufigsten kardialen Problemen in der Neonatalzeit. Vor allem bei Frühgeborenen ist damit ein erhöhtes Risiko für Hirnblutungen, Lungenblutungen, periventrikuläre Leukomalazie, bronchopulmonale Dysplasie und nekrotisierende Enterocolitis assoziiert (Bancalari et al., 2005; Capozzi und Santoro, 2011). Nach einer Studie von Stoll et al. 2010 liegt die Inzidenz bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g bei 46 %.

Unter anderem wird die vasodilatierende Wirkung von Prostaglandin E (PGE₂) für das Persistieren des Ductus arteriosus verantwortlich gemacht (Chang et al., 2010). Durch ihren hemmenden Effekt auf die Prostaglandinsynthese werden Ibuprofen und Indomethacin zur Therapie intravenös eingesetzt. Es ist bislang nicht bekannt, inwieweit diese Substanzen das Immunsystem von Früh- und Neugeborenen beeinflussen.

1.6 Staphylococcus epidermidis

Staphylococcus epidermidis (*S. epidermidis*) ist ein grampositives Bakterium, das zur normalen Haut- und Nasenflora des Menschen gehört und zur Spezies der KNS gezählt wird.

Trotz ihrer geringen Pathogenität gehören KNS zu den am häufigsten nachgewiesenen LOS-Erregern beim Frühgeborenen. Aus ätiologischer Sicht sind *S. epidermidis*-Infektionen bei Früh- und Neugeborenen hauptsächlich mit notwendigen intensivmedizinischen Prozeduren assoziiert, z.B. die Anlage peripher-venöser und zentralvenöser Katheter und Beatmung, weil dadurch die Eintrittspforte von Hautkeimen in den Organismus gegeben ist.

Bedeutend für die Pathogenität von *S. epidermidis* ist die Fähigkeit, an der Oberfläche von künstlichen Materialien wie z.B. Kathetern, Endotrachealtuben und Magensonden zu adherieren und einen Biofilm auszubilden. Dieser besteht aus mehreren kompakten Zellschichten, die von einer extrazellulären Matrix umhüllt sind. Beweisend für die Pathogenität ist, dass Biofilm-bildende KNS wesentlich häufiger bei signifikanten Infektionen angetroffen werden als Biofilm-negative Stämme (Hall et al., 1987; Eiff et al., 2002; Ziebuhr et al., 2006).

Bei der Biofilmbildung kann man drei Phasen unterscheiden. Die schnelle primäre Adhäsion einzelner Zellen an eine Polymer-Oberfläche, die darauf folgende Proliferations- und Akkumulationsphase zu einem mehrschichtigen Biofilm und schließlich die Ablösungsphase, in der einzelne Zellen oder Zellaggregate aus dem Biofilm freigesetzt werden (Streuung der Infektion) (Otto, 2008). Bei der interzellulären Adhäsion der Bakterien spielt das extrazelluläre Polysaccharid PIA (polysaccharide intercellular adhesin) eine bedeutende Rolle (Mack, 1999). Synthetisiert wird PIA durch die Enzyme, die im intercellular adhesin (*ica*) Operon codiert werden. Dieses besteht aus den vier Genen *icaA*, *icaD*, *icaB* und *icaC* (Heilmann et al., 1996).

KNS sind oft gegenüber einem breiten Spektrum von Antibiotika resistent, unter anderem gegenüber Penicillin und Aminoglykosiden (Klingenberg et al., 2004). Ein besonderes Problem ist die weit verbreitete Methicillin-Resistenz. Sie beruht auf der Ausbildung eines *mecA* Genes, welches ein Penicillin-Bindeprotein (PBP2a) mit nur geringer Affinität für β -Laktamantibiotika codiert (Suzuki et al., 1992).

Biofilm-produzierende KNS weisen häufig ein noch breiteres Antibiotikaresistenzmuster auf. Einerseits liegt dies an der verminderten Diffusion bzw.

unmöglichen Penetration des Antibiotikums durch die extrazelluläre Matrix des Biofilms und andererseits weisen die Bakterien im Biofilm eine verminderte Wachstumsrate auf und bieten somit Antibiotika, die in den Stoffwechsel der Bakterien eingreifen, kaum Angriffspunkte (Mah und O'Toole, 2001; Granslo et al., 2008). Zusätzlich erlaubt der in Biofilmen erleichterte horizontale Gentransfer eine schnelle Verbreitung von Resistenzgenen zwischen den einzelnen Bakterienzellen. Die Fähigkeit zur Biofilmbildung macht die KNS nicht nur resistent gegen bestimmte Antibiotika, sie ermöglicht ihnen auch, den Abwehrmechanismen des Körpers zu entgehen (Goldmann, 1993). Die Ausbildung des interzellulären Polysaccharid-Adhäsins schützt die Bakterien vor den Mechanismen des angeborenen Immunsystems, indem es den KNS maßgeblich Schutz vor Phagozytose durch neutrophile Zellen, vor dem Komplementsystem, Chemotaxis und antimikrobiellen Peptiden bietet (Vuong et al., 2004; Kristian et al., 2008). Eine reduzierte Immunreaktion auf Biofilm-bildende *S. epidermidis* wird z.B. durch eine verminderte CRP-Bildung deutlich. Biofilm-positive *S. epidermidis*-Stämme führen zu niedrigeren CRP-Spiegeln als Biofilm-negative Isolate (Klingenberg et al., 2005). Der genaue Mechanismus der verminderten Immunantwort auf Biofilm-bildende *S. epidermidis* ist bisweilen nicht vollständig geklärt.

Im Allgemeinen ist die Immunreaktion des Menschen auf *S. epidermidis* noch unzureichend erforscht. Eine Studie von Strunk et al. 2010 konnte erstmalig aufzeigen, dass der Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) eine große Bedeutung für die Erkennung und Eliminierung von *S. epidermidis* hat. Über den TLR2 wird die Immunantwort eingeleitet und die Zytokinproduktion aktiviert.

Die hohe Inzidenz der KNS-Sepsis bei Frühgeborenen wird allgemein auf das unreife Immunsystem zurückgeführt. Doch der genaue Mechanismus dieser Anfälligkeit ist noch unklar. Unter anderem spielt der IgG-Mangel der Frühgeborenen und die verminderte Komplementaktivität und die damit verbundene reduzierte Opsonophagozytose-Aktivität dabei eine Rolle.

Gegenwärtig ist auch die Zytokinantwort auf eine KNS-Exposition nur sehr wenig erforscht. Die wenigen verfügbaren Daten konzentrieren sich hauptsächlich auf Untersuchungen von Erwachsenen. Es mangelt an Informationen über eine KNS-induzierte Zytokinantwort von Früh- und Neugeborenen, die notwendig wären, um die Pathogenese besser zu verstehen und langfristig Strategien zur Prävention zu entwickeln.

Im Vergleich zu anderen Erregern verläuft eine KNS-Sepsis bei Frühgeborenen selten fulminant und weist eine geringere Letalität (ca. 1-2 %) auf (Isaacs, 2003; Makhoul et al., 2005). Jedoch kann eine systemische KNS-Infektion das Risiko der Frühgeborenen für Folgeerkrankungen, wie z.B. eine bronchopulmonale Dysplasie, deutlich erhöhen (Liljedahl et al., 2004; Härtel et al., 2009; Lahra et al., 2009).

Der Nachweis von KNS in den Blutkulturen ist häufig ein diagnostisches Problem. Wegen der ubiquitären Besiedelung des Menschen mit KNS ist häufig schwer zu unterscheiden, ob es sich um eine Kontamination der Probe handelt oder um einen klinisch bedeutsamen KNS-Keim.

2 Fragestellung

Aufgrund ihres unausgereiften Immunsystems sind Frühgeborene anfällig für schwere Infektionen; je geringer das Gestationsalter desto höher ist das Risiko, eine Sepsis zu entwickeln. Unter anderem wird eine unzureichende Zytokinproduktion der Frühgeborenen für die Anfälligkeit für Infektionen verantwortlich gemacht. Die häufigsten Erreger der LOS bei Frühgeborenen sind KNS, wobei in den meisten Fällen *S. epidermidis* in den Blutkulturen nachgewiesen wird.

Die meisten in-vitro Voruntersuchungen konzentrieren sich jedoch auf LPS (Wandbestandteil gramnegativer Bakterien) als spezifisches Antigen zur Auslösung der angeborenen Immunantwort. Die durch spezifische Bakterien induzierte Immunantwort ist bei Früh- und Neugeborenen noch unzureichend charakterisiert.

Ziel der Arbeit ist die Charakterisierung der durch *S. epidermidis* induzierten Immunantwort bei Frühgeborenen und reifen Neugeborenen.

Denn die genauere Kenntnis der neonatalen Zytokinbildungsfähigkeit ermöglicht ein besseres Verständnis der Pathogenese der systemischen Entzündungsantwort und könnte langfristig der Prävention von Folgeschäden, die durch die eigene unbalancierte inflammatorische Antwort auf Infektionen entstehen, dienen.

Die Arbeit ist in 4 Teilprojekte unterteilt:

1. Zunächst soll ein in-vitro *S. epidermidis*-Sepsis Modell etabliert werden. Es wird untersucht, ob eine Immunantwort in-vitro induzierbar und anhand von Zytokinmessungen quantifizierbar ist.
2. Im Folgenden soll die Fähigkeit zur Bildung pro- und anti-inflammatorischer Zytokine in Abhängigkeit von Gestationsalter untersucht werden.
3. Desweiteren soll geprüft werden, ob unterschiedliche Stämme von *S. epidermidis*, die aus dem Blut von Frühgeborenen isoliert werden konnten, die pro-inflammatorische Zytokinproduktion beeinflussen.
4. Schließlich soll im letzten Teil der Einfluss von immunmodulatorischen Medikamenten wie Ibuprofen und Indomethacin auf die Zytokinproduktion näher betrachtet werden.

3 Material und Methoden

Im Folgenden sind nur diejenigen Materialien aufgeführt, die zusätzlich zur Standard-Laboraausstattung verwendet wurden.

3.1 Reagenzien

- Aqua destillata
- RPMI 1640 Medium mit 2 g/l NaHCO₃ ohne L-Glutamin (Seromed Biochrome, Berlin, Deutschland)
- Penicillin/ Streptomycin (Seromed Biochrom, Berlin, Deutschland)
- N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin 200mM (Seromed Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Nicht-essentielle Aminosäuren (NEA) (Seromed Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Natriumpyruvat 100mM (Seromed Biochrom, Berlin, Deutschland)
- PBS-1 pH 7,2, 500ml (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Monensin (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- HEPES Puffer (Seromed Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Magermilchpulver (kommerziell erhältlich)
- Paraformaldehyd PFA (Riedel de Haen AG, Seelze, Deutschland)
- Saponin (Riedel de Haen AG, Seelze, Deutschland)

3.2 Geräte, Hilfsmittel

- Coulter ACT8 (Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland)
- Sicherheitswerkbank (Heraeus, Hanau Deutschland)
- Sterile 6- und 24-Well-Platten (Nune AIS Kamstrupvej, Denmark)
- Lithium-Heparin tubes 4.5 ml (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland)
- Brutschrank (37°C / 5% CO₂) (Heraeus 6000, Hanau, Deutschland)
- Falcon 15 ml Röhrchen (Greiner, Labortechnik, Frickhausen, Deutschland))
- Zentrifuge (Hettich Rotunda 46 RSC, Tuttlingen, Deutschland)

- Durchflusszytometer BD FACS-Canto (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)
- Columbus Washer (Tecan Crailsheim, Deutschland)
- Sunrise absorbance Reader (Tecan, Crailsheim, Deutschland)
- ELISA Kit: Quantikine®: IL-6, IL-10, TNF- α (R+D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland)

3.3 Stimulantien

- LPS (Lipopolysaccharid)
- Bakterium: Staphylococcus epidermidis
 - Stamm ATCC 12228 (Kontrolle): IcaABD negativ
 - Stamm 94B080 (1): Geotyp A nach der von Björkqvist et al. 2002 etablierten Klassifikation. IcaABD positiv (Biofilm Produktion), MecA positiv (Methizillin/Aminoglycosid Resistenz), isoliert von einem 26 SSW alten Frühgeborenem mit klinischer Sepsis
 - Stamm 94B575 (2): Genotype „single isolate“ A nach der von Björkqvist et al. 2002 etablierten Klassifikation IcaABD und MecA negativ, isoliert von einem 31 SSW alten Frühgeborenen mit klinischer Sepsis

Eingesetzte Konzentrationen: 1 und 10 koloniebildende Einheiten/Leukozyt

3.4 Medikamente

- Ibuprofen, Pedeo 5mg/ml (Orphan Europe SARL, Puteaux, Frankreich)
- Indomethacin, Confortid, 50 mg/ml (Alphapharma-ISIS GmbH&Co.KG, Langenfeld, Deutschland)

3.5 Antikörper

Monoklonale Fluoreszenz-konjugierte Antikörper

- IL-6 – FITC MQ2-13A5, Ratte IgG1 (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)

- TNF- α - FITC MAb11, Maus IgG1 (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)
- CD14-PE RMO52, Maus IgG2a (Beckmann Coulter, Marseille, Frankreich)

3.6 Computerprogramme

- SPSS® 9.0 Statistik Software (SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.)
- Sigma Plot 2000® Version 6.0, Graphik Software (SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.)
- EPICS XL System II™, Version 1.0, Software (Coulter-Electronics)
- ELISA-Software, Magellan, Version 1.60
- FACS- Software, Facs Diva 5.0

3.7 Blutproben von Probanden und Patienten

Die Nabelschnurblutproben stammen von Frühgeborenen (24+0 - 36+6 SSW) und Reifgeborenen, die in der Zeit von 2005-2007 in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein-Campus Lübeck (Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Diedrich) geboren wurden. Das für die Studien notwendige Blut wurde unmittelbar nach Geburt im Rahmen der medizinisch notwendigen Blutentnahme aus dem kindlichen Anteil der abgeklemmten Nabelschnur an der Plazenta entnommen. Die Blutentnahmen erfolgten nach Aufklärung und Einholen des Einverständnisses der Eltern sowie Zustimmung zur Speicherung verschlüsselter, personenbezogener Daten. Ausschlusskriterien der Studie waren eine nachgewiesene Infektion des Kindes, Fehlbildungen, ein bekannter Immundefekt in der Familie oder eine Entbindung wegen eines Amnioninfektionssyndroms.

Als Kontrolle dienten durch periphere Venenpunktion entnommene Blutproben von gesunden Blutspendern (Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Lübeck, Leitung: Prof. Dr. med. Siegfried Görg). Wie Vorversuche zeigten, konnten die Proben bis zu 24 Stunden bei Raumtemperatur in Lithium-Heparin Röhrchen bis zur Weiterverarbeitung gelagert werden, ohne die Ergebnisse signifikant zu beeinflussen (Schultz et al., 2002). Eine

Genehmigung der Untersuchung durch die Ethik Kommission des UK-SH Campus liegt vor (A05-105).

3.7.1 Probanden der einzelnen Versuchsreihen

Reihe 1:

- 11 Spender (3 weiblich, 8 männlich, Alter: Mittelwert: 44 Jahre (38-50))
- 14 Neugeborene (6 weiblich, 8 männlich, Gestationsalter: Mittelwert: 39 SSW (37,5-40,5 SSW))

Reihe 2:

- 115 Frühgeborene (55 weiblich, 60 männlich, Gestationsalter: Mittelwert: 31,6 SSW (24,0-36,0))
- 127 Neugeborene (59 weiblich, 68 männlich, Gestationsalter: Mittelwert: 39,1 SSW (37,0-43,0))

Reihe 3:

- 11 Neugeborene (5 weiblich, 6 männlich, Gestationsalter: Mittelwert: 38,5 SSW (37,3-40,2))

Reihe 4:

- Indomethacin: 11 Neugeborene (6 weiblich, 5 männlich, Gestationsalter: Mittelwert: 38,4 SSW (34,3-41,6))
- Ibuprofen: 22 Neugeborene (7 weiblich, 15 männlich, Gestationsalter: Mittelwert 39,3 SSW (32,5-41,4))
- 14 Spender (8 weiblich, 6 männlich, Alter: Mittelwert 42 Jahre (22-63))

3.8 Messung intrazellulärer Zytokine

3.8.1 Vollblutkulturansatz

Zunächst erfolgte die Messung der Leukozytenzahl der Vollblutproben im Lithium-Heparin Röhrchen maschinell durch den vollautomatischen Hämatozytometer. Der Vollblutstimulationstest wurde gemäß des Protokolls (Härtel et al., 1999; Schultz, 2003) durchgeführt. Die Blutproben wurden mit RPMI Kulturmedium, das mit Penicillin 100U/ml, Streptomycin 100µg/ml, N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin 2mmol/l, nicht-essentiellen Aminosäuren (NEA) und Natriumpyruvat 1mmol/l (Zusammensetzung:

siehe Tabelle 3) angereichert war, auf einheitliche Konzentrationen von 5×10^6 Leukozyten /ml verdünnt. Zu 1000 μ l der Zellverdünnung wurden 500 μ l Nährmedium zugegeben und in sterile 24-Wellplatten überführt. Es folgte die Stimulation mit LPS (30ng/ml) oder *S. epidermidis* (1-10 koloniebildende Einheiten/Leukozyt). Anschließend wurde, um die extrazelluläre Ausschüttung der Zytokine aus den Zellen zu verhindern, der zelluläre Golgi-Apparat durch Gabe von 50 μ l Monensin zu allen Proben geblockt. Die Proben wurden anschließend 4 Stunden bei einer Temperatur von 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Von jeder Probe wurde auch ein unstimulierter Ansatz angefertigt, der auf gleiche Art und Weise wie die stimulierten Proben behandelt wurde.

Nach der Inkubation wurden die Proben in Spitzbodenglasröhrchen überführt und mit PBS-Puffer bei 1200U 10 Minuten gewaschen. Danach erfolgte durch Zugabe von 4% PFA-Lösung die Fixierung der Zellen. Nach 10minütiger Inkubation wurden die Proben erneut mit PBS-Puffer gewaschen und mit 5% Magermilch zur Unterdrückung unspezifischer Bindungen versetzt. Es folgte eine Lagerung der Proben über Nacht bei +4°Celsius.

Vorgehensweise bei den verschiedenen Versuchsreihen:

Reihe 1: Stimulation der Proben mit zwei verschiedenen Konzentrationen von *S. epidermidis* (1 und 10 KBE/Leukozyt), unstimulierte Kontrolle

Reihe 2: Stimulation der Proben mit *S. epidermidis* (1 KBE/Leukozyt) und LPS, unstimulierte Kontrolle

Reihe 3: Stimulation mit 3 verschiedenen *S. epidermidis* Stämmen (Kontrolle, M1, M2), unstimulierte Kontrolle

Reihe 4: 1 Stunde Vorinkubation der Proben mit Ibuprofen (1 und 10 μ l/ml) und Indomethacin (0,1, 1, 10 μ l/ml), Stimulation mit *S. epidermidis* und LPS, jeweils unstimulierte und unvorinkubierte Kontrolle

Protokoll:

- Bestimmung der Leukozytenzahl im Hämatozytometer

Folgende Arbeitsschritte sind unter sterilen Bedingungen durchzuführen

- Vollblut mit Nährmedium auf 5×10^6 Leukozyten bei Erwachsenenblut und Nabelschnurblut verdünnen
- 1000 μ l Zellverdünnung in sterilen 24-Well mit 500 μ l Nährmedium versetzen

- Stimulation mit 50 µl LPS oder *S. epidermidis* (1 und 10 KBE/Leukozyt)
- Nach 1 Minute Zugabe von 50 µl Monensinansatz
- 4 Stunden bei 37°C / 5% CO₂ im Brutschrank inkubieren
- Waschen der Zellen mit PBS, Zentrifugieren: 10 Minuten bei 1200U
- Fixierung mit 1ml PFA 4% , 10 Minuten Inkubation bei 4°C
- Weiterer Waschgang mit PBS, Zentrifugieren: 10 Minuten bei 1200U
- 1ml Magermilch zufügen, Aufbewahrung im Kühlschrank

Reagenz	Zusammensetzung
Nährmedium	19,2ml RPMI 1640 + 200 µl Penicillin/Streptomycin + 200 µl N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin 200mM +200 µl Nicht-essentielle Aminosäuren +200 µl Natriumpyruvat 100mM
Lipopolysaccharid (LPS)	Stocklösung: 10mg LPS + 10 ml PBS Eingesetzte Konzentration: 30 ng/ml
Monensinlösung	Stocklösung: 69,29mg Monensin (Molekulargewicht 692,9 g/l) ad 10ml Ethanol Eingesetzte Konzentration: 3,1µM
Paraformaldehydlösung (PFA)	1 g PFA plus 25 ml PBS
Magermilchlösung	2,5 mg Non-fat, dry Milkpowder 50ml PBS-1

Tabelle : Reagenzien für den Zellkulturansatz

3.8.2 Vorbereitung der Zellen und intrazelluläre Zytokinfärbung

Am folgenden Tag wurde die Magermilch abzentrifugiert und die Zellen mit PBS gewaschen. Mit Hilfe einer Saponinlösung wurde für die intrazelluläre Färbung der Zytokine die Zellmembran reversibel permeabilisiert. Um die Monozytenpopulation zu markieren, wurden CD-14 spezifischer PE-konjugierte Oberflächenantikörper in Reaktionsgefäße vorgelegt und anschließend die Zell-Aliquots dorthin überführt. Die Zytokine wurden mit entsprechenden konjugierten spezifischen Antikörpern (IL-6 - FITC, TNF- α - FITC) ebenfalls markiert. Die Inkubation der Proben mit den Antikörpern betrug 20 Minuten. Im Anschluss daran wurden die überschüssigen, nicht gebundenen Antikörper mit Saponinpuffer herausgewaschen.

Als Negativkontrolle diente die Vorinkubation mit unkonjugierten spezifischen Antikörper des jeweiligen Zytokins im Überschuss. Die Proben wurden bis zur Messung bei 4°C dunkel gelagert.

Protokoll:

- Zellen bei Raumtemperatur mit 1200 U 10 Minuten abzentrifugieren, Überstand verwerfen
- Zellen in 1000 µl Saponinlösung resuspendieren, 10 Minuten Inkubation
- Die fluoreszenz-konjugierten Antikörper (IL-6, TNF-α) in FACS- Röhren vorlegen:

Pipettierschema:

- 10 µl CD14-PE Oberflächenantikörper unverdünnt
- 10 µl mit PBS 1:20 verdünnte mit FITC-konjugierte Zytokinantikörper
- Negativkontrolle: 5 µl des unkonjugierten Antikörpers (Isotyp-Kontrollen)
- In alle Proben 200 µl Zelllösung pipettieren, vortexen
- 20 Minuten bei +4° C inkubieren
- Alle Proben mit 1000 µl Saponinlösung auffüllen, vortexen
- Alle Proben bei 1000U 5 Minuten abzentrifugieren und den Überstand verwerfen
- In die Proben mit unkonjugierten Antikörpern nun 10 µl des jeweiligen 1:20 verdünnten konjugierten Antikörper pipettieren, vortexen, inkubieren, und waschen wie zuvor
- Alle Zellsedimente nun in jeweils 500 µl PBS aufnehmen
- Resuspendierte Leukozyten bis zur Messung bei +4° C dunkel aufbewahren

Reagenz	Zusammensetzung
Saponinlösung	98 ml HBSS plus 1ml 10% Saponin plus 1ml 1M HEPES

Tabelle : Reagenz zur Permeabilisation

3.8.3 Durchflusszytometrische Messung

Die mit spezifischen Antikörpern markierten intrazellulären Zytokine wurden mit Hilfe des Durchflusszytometers der Firma BD FACS Canto gemessen. Mindestens 2000 CD14-positive Monozyten wurden für jede Probe untersucht. Apoptotische oder nekrotische Zellen wurden identifiziert und von der Auswertung ausgeschlossen. Der Schwellenwert der Zytokinmessung wurde anhand der Kontrolle mit unkonjugierten Antikörpern bestimmt. Die Daten wurden als Prozentzahl der CD-14 positiven Zellen angegeben.

3.9 Bestimmung der Zytokinsekretion in Kulturüberständen mittels ELISA

Um die Zytokin-Sekretion zu messen, wurden die Vollblutkulturen unter gleichen Bedingungen angesetzt, ohne jedoch im weiteren Schritt Monensin dazuzugeben. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂. Die Kulturüberstände wurden bei -80°C bis zur Messung aufbewahrt. Aus den Überständen wurden dann mittels ELISA-Kit nach Protokoll des Herstellers (R+D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) die Zytokine IL-10, IL-6, TGF-β und TNF-α bestimmt.

3.10 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte in den einzelnen Teilstudien nach Beratung mit Prof. Dr. Inke König (Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck, Direktor: Prof. Dr. Andreas Ziegler). Hypothesen wurden mit dem Fisher's-Exact-Test (zwei-seitig), ANOVA-Test (Gen-Dosis-Effekt) sowie logistischen Regressionsmodellen (Multivarianzanalyse) überprüft. Statistische Differenzen wurden für gepaarte Daten mit dem Wilcoxon-Rank-Sum-Test berechnet, während der Mann-Whitney-U-Test für die statistische Analyse von Differenzen zwischen zwei unterschiedlichen Gruppen, z.B. Neugeborene versus Erwachsene, angewendet wurde. Um Korrelationen zu berechnen, z.B. zwischen Zytokinproduktion und Gestationsalter, kam der Spearman-Rho-Test zur Anwendung. Als signifikant wurden p-Werte < 0.05 für Einzelvergleiche definiert. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Software SPSS® Versionen 9.0-15.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) vorgenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung eines *Staphylococcus epidermidis*-Sepsis-Modell in-vitro

Um herauszufinden, ob es möglich ist, in-vitro eine Immunantwort der Zellen auf gram-positive Bakterien hervorzurufen, wurden Zellansätze mit zwei verschiedenen Konzentrationen von *S. epidermidis* stimuliert. Heparinisiertes Nabelschnurblut von 14 reifen Neugeborenen wurde mit 1 Millionen *S. epidermidis* und 10 Millionen *S. epidermidis* pro 10^6 Leukozyten (=1 bzw. 10 KBE/ Leukozyt) 4 Stunden infiziert. Das mittlere Gestationsalter der Neugeborenen lag bei 39 Wochen (95% KI 37,5-40,5 Wochen, 6 weiblich, 8 männlich) Als Vergleichsgruppe wurden die Ergebnisse aus den Untersuchungen von 11 peripher venösen Blutproben adulter Probanden aufgenommen. Hier betrug das durchschnittliche Alter 44 Jahre (95 % KI 38,7-50,9 Jahre, 3 männlich, 8 weiblich). Bei beiden Gruppen wurde die spontane Zytokinproduktion durch einen unstimulierten Kontrollansatz mitgemessen. Mit Hilfe des Durchflusszytometers wurde der Anteil an CD-14 positiven Zellen detektiert, welche die verschiedenen Fluoreszenzmarkierten Zytokine (IL-6 oder TNF- α) intrazellulär produziert hatten. Es stellte sich heraus, dass die intrazelluläre Produktion von IL-6 bei Neugeborenen abhängig von der *S. epidermidis* Konzentration ist (1 KBE/Leukozyt: Median 12,6 (95% KI: 10,9 bis 31,9)% vs. 10 KBE/ Leukozyt: Median 43,6 (95% KI 29,3 bis 49,4) %; $p=0,025$; $n=14$). Die Werte sind vergleichbar mit denen der Erwachsenen-Kontrollgruppe. Auch hier zeigte sich bei steigender *S. epidermidis* Anzahl eine Zunahme der intrazellulären IL-6 Bildung (1 KBE/Leukozyt: Median 30,1 (95% KI 8,9 bis 34,9)% vs. 10 KBE/Leukozyt: Median 41,2 (95% KI 19,0 bis 51,5)%; $p=0,005$; $n=11$) (siehe Abbildung 1a).

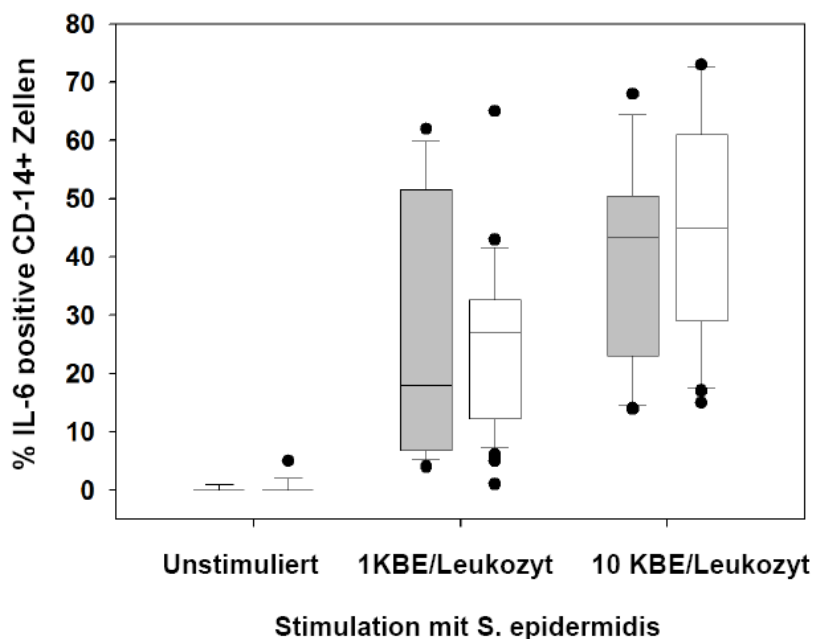


Abbildung 1 : IL-6 Messung nach Stimulation mit zwei verschiedenen *S. epidermidis* Konzentrationen

Die Abbildung zeigt die quantitative Analyse der intrazytoplasmatischen IL-6 Expression mittels Durchflusszytometrie in Nabelschnurblut von Neugeborenen und peripherem Blut von Erwachsenen nach vierstündiger Inkubation mit 0, 1 und 10 KBE/Leukozyt. Die Darstellung erfolgte als Säulendiagramm (Box plots) unter Angabe des Medians, 25. und 75. Perzentile. Die dunkler hinterlegten Säulen stellen die Neugeborenenengruppe dar, die heller hinterlegten die Erwachsenenengruppe. Gemessen wurde der Prozentsatz der IL-6 positiven Monozyten nach der jeweiligen Stimulation mit *S. epidermidis*.

Bei der intrazellulären TNF- α Messung war bei den Neugeborenen keine Abhängigkeit von der Anzahl der Erreger zu verzeichnen (1 KBE/Leukozyt: Median 4,5 (95% KI 2,8 bis 11,9)% vs. 10 KBE/Leukozyt: Median 6,2 (95% KI 4,3 bis 20,5)%; $p=0,12$; $n=13$). Im Gegensatz zu den Neugeborenen zeigte sich bei den Erwachsenen eine Zunahme der TNF- α produzierenden Zellen bei zunehmender Erregeranzahl von *S. epidermidis* (1 KBE/Leukozyt: Median 5,6 (95% KI 2,5 bis 13,2)% vs. 10 KBE/Leukozyt: Median 16,7 (95% KI 5,9 bis 23,8)%; $p=0,008$; $n=10$) (siehe Abbildung 1b).

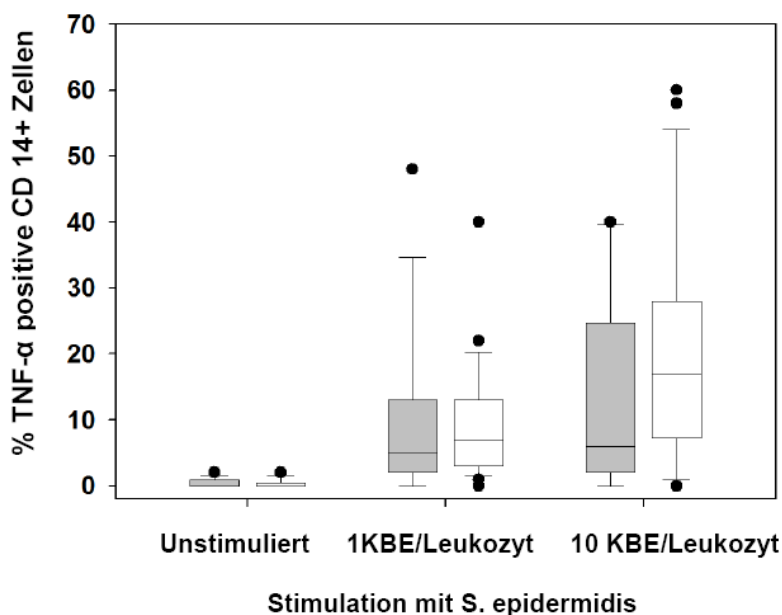


Abbildung 1 : TNF- α Messung nach Stimulation mit zwei verschiedenen *S. epidermidis* Konzentrationen

Die Abbildung zeigt die intrazytoplasmatische Expression (Anteil positiver Zellen; Median, 25/75 Perzentile) von TNF- α beim Neugeborenen (grau) und Erwachsenen (weiß) nach vierstündiger Inkubation mit 0, 1 und 10 KBE/Leukozyt.

Insgesamt zeigte die erste Versuchsreihe, dass reife Neugeborene in der Lage waren, mit Erwachsenen vergleichbare Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen zu bilden. Da keine Steigerung der TNF- α Produktion durch Erhöhung der *S. epidermidis* Konzentration zu verzeichnen war, wurde die Stimulation in den folgenden Versuchsreihen mit der niedrigeren Konzentration (1KBE/Leukozyt) durchgeführt. Die spontane IL-6 und TNF- α Produktion in den unstimulierten Proben zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen der Erwachsenengruppe und der Neugeborenenengruppe.

4.2 Inflammatorische Immunantwort auf Staphylococcus epidermidis und LPS in Abhängigkeit vom Gestationsalter

4.2.1 Pro-inflammatorische Immunantwort auf Staphylococcus epidermidis ist abhängig vom Gestationsalter

Insgesamt 150 Frühgeborene wurden im Untersuchungszeitraum geboren. Es konnten nur 115 Ergebnisse in die Auswertung einbezogen werden, da von 33 Probanden die Einverständniserklärung der Eltern fehlte und von 2 Kindern aufgrund von Sprachbarrieren der Eltern ein Einverständnis nicht möglich war.

Die folgende Tabelle (Tabelle 5) zeigt klinische Daten von allen in der Studie aufgenommenen Frühgeborenen.

Weil bei den Frühgeborenen acht Kinder entweder eine Amnioninfektion entwickelten (n=7) oder Blutkulturen eine Early-Onset Sepsis zeigten (n=1), wurden auch diese aus der Auswertung ausgeschlossen.

Bei den Reifgeborenen (n=127) lag das mittlere Geburtsgewicht (\pm SD, Spannweite) bei 3463 ± 473 (2250-4640) g und das mittlere Gestationsalter (\pm SD, Spannweite) bei 39.1 ± 1.55 (37.0-43.0) Wochen. Männlichen Geschlechts waren 53,5 %. Per Kaiserschnitt entbunden wurden 29,7 % der Reifgeborenen.

Parameter	n= 115
Geburtsgewicht (Mittelwert \pmSD, Spannweite) (g)	1728 \pm 618 (454-3810)
Gestationsalter (Mittelwert \pmSD, Spannweite) (Wochen)	31.6 \pm 3.1 (24.0-36.0)
Männliches Geschlecht (%)	52
Kaiserschnitt Entbindung (%)	77
Mechanische tracheale Beatmung (%)	18
Nabelschnurarterien pH < 7.1 (%)	4
Fünf Minuten APGAR < 7 (%)	4
Pränatale Steroidgabe (%)	52
Ursache der Frühgeburt (%)	
- vorzeitige Wehen	65
- vorzeitiger Blasensprung	8
- Amnioninfektion	7.0
- Präeklampsie	8
- intrauterine Wachstumsretardierung	17
- Plazentaablösung	4
- pathologisches CTG	19
Outcome %	
- Blutkultur-positive Sepsis	4
- IVH Grad I oder II	3
- IVH Grad III oder IV	3
- Periventrikuläre Leukomalazie	1
- Bronchopulmonale Dysplasie	1
- Tod	4

Tabelle : Klinische Daten von allen in der Studie aufgenommenen Frühgeborenen

In der zweiten Versuchsreihe wurden Nabelschnurproben von Früh- und Neugeborenen mit einer Millionen Einheiten *S. epidermidis* pro 10^6 Leukozyten (1 KBE/Leukozyt) oder LPS stimuliert.

Um die pro-inflammatorische Immunantwort zu beurteilen, wurde die intrazelluläre IL-6 und TNF- α Produktion der Monozyten in Korrelation zum Gestationsalter gesetzt. Das Gestationsalter der Versuchsreihe lag im Bereich der 24. bis 43. SSW.

Nicht von allen Frühgeborenen stand ausreichend Nabelschnurblut für beide Stimulationsstrategien zur Verfügung.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei beiden Stimulationsstrategien sowohl die intrazelluläre IL-6 als auch die TNF- α Produktion eine Anhängigkeit zum Gestationsalter aufweist.

Mit steigendem Gestationsalter war eine deutliche Zunahme der IL-6 -Produktion nach Stimulation mit LPS ($R=0,371$, 95% KI 0,24 bis 0,49; $p<0,001$; $n=193$) und *S. epidermidis* zu verzeichnen ($R=0,279$, 95% KI 0,10 bis 0,44; $p=0,002$; $n=121$) (siehe Abbildung 2 a).

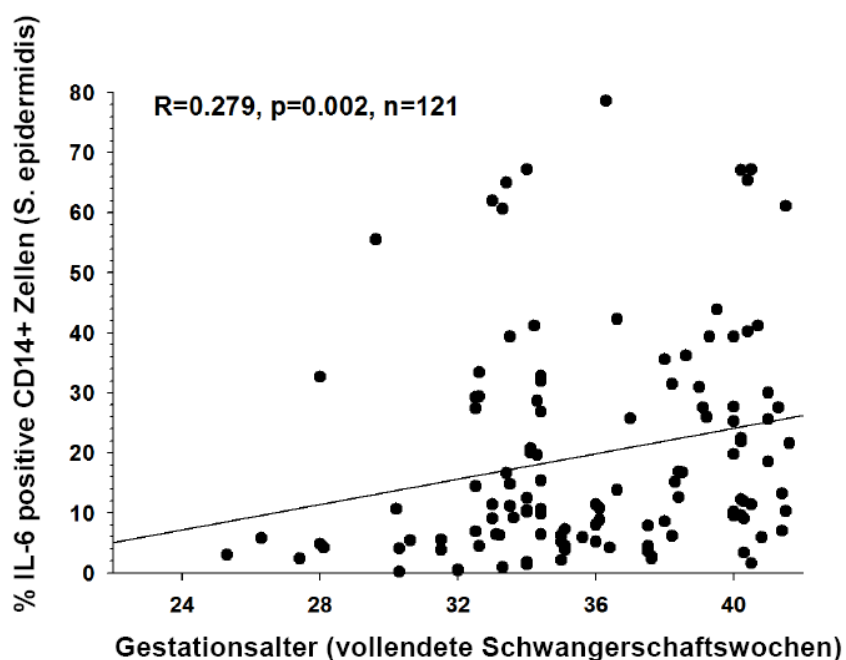


Abbildung 2 : IL-6 Produktion nach *S. epidermidis* Stimulation in Abhängigkeit vom Gestationsalter

Die IL-6 Produktion nach Stimulation mit *S. epidermidis* steht in Korrelation mit dem Gestationsalter. Die Vollblutkulturen wurden für 4 h mit 1 Million Einheiten *S. epidermidis* stimuliert. Die Daten sind dargestellt als % IL-6 positive Monozyten und als individuelle Punkte aufgetragen

Auch bei der Messung der intrazytoplasmatischen TNF- α Produktion zeigte sich bei LPS ($R=0,344$, 95% KI 0,21 bis 0,47, $p<0,001$; $n=193$) und *S. epidermidis* ($R=0,251$, 95% KI 0,07 bis 0,41; $p=0,005$; $n=121$) eine Abhängigkeit zum Gestationsalter (siehe Abbildung 2 b).

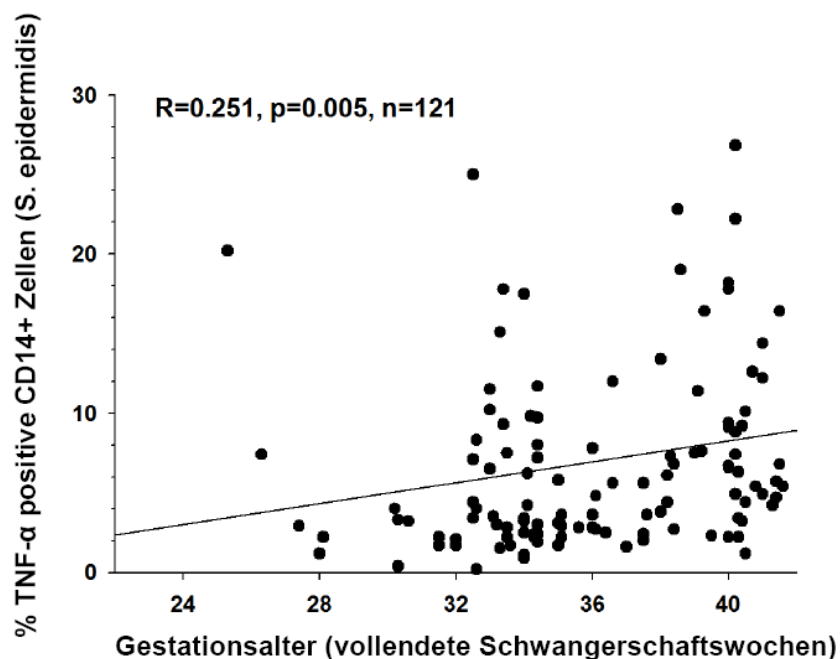


Abbildung 2 : TNF- α Produktion nach *S. epidermidis* Stimulation in Abhängigkeit vom Gestationsalter

Nach Stimulation der Monozyten mit *S. epidermidis* zeigt die intrazelluläre Produktion von TNF- α eine Korrelation zum Gestationsalter. Die Vollblutkulturen wurden für 4 h mit 1 Million Einheiten *S. epidermidis* stimuliert. Die Daten sind dargestellt als % TNF- α positive Monozyten und als individuelle Punkte aufgetragen.

Außerdem wurde die basale Produktion von IL-6 und TNF- α in den unstimulierten Proben gemessen. Hier zeigte sich keine Abhängigkeit vom Gestationsalter, das heißt IL-6 ($R=0,06$, $p=0,31$, $n=234$), TNF- α ($R=-0,03$; $p=0,64$, $n=216$).

Des Weiteren wurde die Zytokin Sekretion von IL-6 in den Probenüberständen gemessen. Es zeigte sich das gleiche Ergebnis wie bei der intrazellulären IL-6 Messung: eine Korrelation zum Gestationsalter sowohl bei LPS- ($R=0,252$, $p=<0,001$, $n=223$) als auch bei *S. epidermidis*-Stimulation ($R=0,275$, $p=0,005$, $n=168$).

Der Vergleich der Zytokinproduktion von IL-6 und TNF- α beider Stimulationsstrategien zeigte einen klaren Zusammenhang zwischen der jeweiligen Zytokin-Bildung nach LPS- und *S. epidermidis* –Stimulation. Dies konnte sowohl bei der Messung der Proteinsekretion in den Überständen (IL-6: R=0,431, 95% KI 0,29 bis 0,55; p<0,001; n=161, TNF- α : R=0,370, 95% KI 0,18 bis 0,47; p<0,001; n=160) als auch bei der Bestimmung der intrazellulären Zytokinproduktion (IL-6: R= 0,423, p<0,001; n=120, TNF- α : R= 0,299, p<0,001; n=120) festgestellt werden.

4.2.2 Anti-inflammatorische Immunantwort auf *Staphylococcus epidermidis* ist unabhängig vom Gestationsalter

Bei der Messung der anti-inflammatorischen Zytokine nach Stimulation mit *S. epidermidis* zeigte sich keine Abhängigkeit zum Gestationsalter. Es wurde die IL-10 und TGF- β Produktion mittels ELISA-Methode ermittelt und wiederum in Korrelation mit dem Gestationsalter gesetzt. Bei *S. epidermidis* besteht nur ein Zusammenhang bei der pro-inflammatorischen Immunantwort (IL-6) mit dem Gestationsalter. Bei LPS hingegen zeigt sowohl die pro-inflammatorische (IL-6) als auch die anti-inflammatorische (IL-10, TGF- β) Immunantwort eine Korrelation zum Gestationsalter (siehe Tabelle 6).

Zytokin	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Lipopolysaccharid
IL-6	R = 0,250 (95% KI: 0,11-0,38, p = 0,001)	R = 0,288 (95% KI: 0,16-0,40, p < 0,001)
IL-10	R = 0,140 (95% KI: -0,003-0,27, p = 0,06)	R = 0,321 (95% KI: 0,19-0,43, p < 0,001)
TGF- β	R = 0,229 (95% KI: -0,03-0,46, p = 0,07)	R = 0,322 (95% KI: 0,07-0,53, p = 0,007)

Tabelle : Zytokinproduktion in Vollblutkulturüberständen in Korrelation mit dem Gestationsalter

Bestimmung der Zytokinproduktion in den Probenüberständen nach 24 stündiger Inkubation mit LPS oder *S. epidermidis* mittels ELISA-Methode. Die Korrelationen zum Gestationsalter wurden als bivariater Faktor R (Spearman's-Rho-Test) und Konfidenzintervalle (nach Bonnett, 2000) angegeben.

Des Weiteren zeigte sich bei der Stimulation mit *S. epidermidis* keine Korrelation zwischen der pro-inflammatorischen IL-6 und der anti-inflammatorischen IL-10 Produktion ($R=0,153$, 95% KI- 0,002 bis 0,3, $p=0,06$, $n=161$).

Im Gegensatz dazu war bei LPS eine Korrelation in der Produktion von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen ($R=0,266$, 95% KI 0,14 bis 0,39; $p<0,001$, $n=223$) nachzuweisen.

4.3 Verschiedene Stämme von *Staphylococcus epidermidis* induzieren eine unterschiedliche IL-6-Antwort

In der dritten Versuchsreihe wurden verschiedene Stämme von *S. epidermidis*, die klinische Sepsis-Isolate bei VLBW-Frühgeborenen darstellen, verglichen. Es wurde die IL-6 Produktion der Monozyten von 11 Neugeborenen (5 weiblich, 6 männlich, mittleres Gestationsalter 38,5 (95% KI: 37,3- 40,2) Wochen, 3/11 Kaiserschnittentbindung) nach Stimulation mit den unterschiedlichen Stämmen gemessen.

Bei Stamm 1 handelt es sich um ein bei einem 26 SSW alten Frühgeborenem mit klinischer Sepsis isolierten *S. epidermidis* mit Fähigkeit zur Biofilmproduktion und Methicillin/Aminoglycosid Resistenz (94B080 – Genotyp A entsprechend der Einteilung nach Björkqvist et al. (2002), IcaABD positiv (Biofilm Produktion), MecA positiv (Methicillin/Aminoglycosid Resistenz)). Stamm 2 wurde bei einem 31 SSW alten Frühgeborenen mit klinischer Sepsis nachgewiesen (94B575 – Genotyp “single isolate”, IcaABD und MecA negativ).

Es zeigte sich in den Überständen der Zellen, die mit dem Biofilm-produzierenden *S. epidermidis* (Stamm 1) stimuliert worden waren, im Vergleich zum IcaABD negativen ATCC Stamm 2 und der Kontrolle eine verringerte IL-6 Produktion ($p=0,001$) (siehe Abbildung 3).

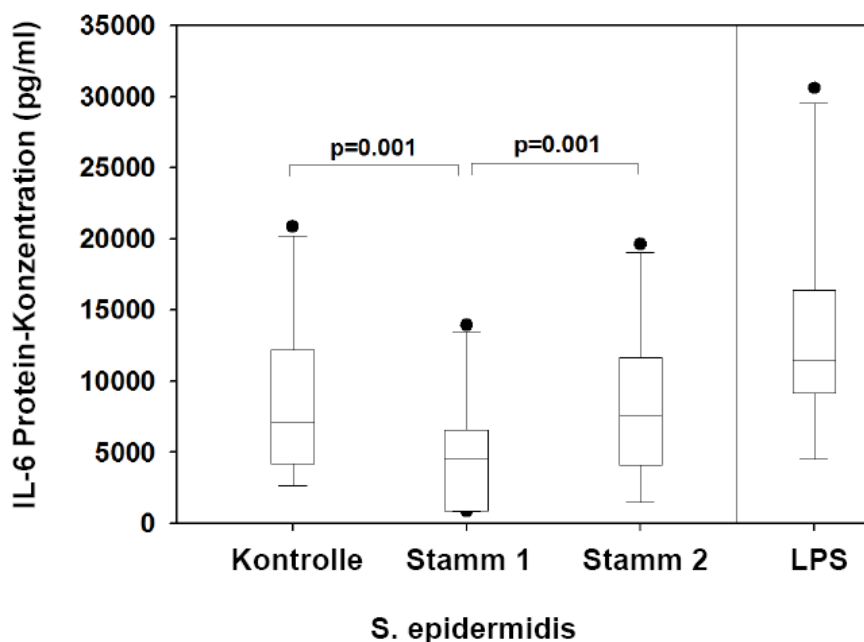


Abbildung 3: IL-6 Produktion nach Stimulation mit verschiedenen *S. epidermidis* Stämmen

Verschiedene *S. epidermidis* Stämme induzieren eine unterschiedliche IL-6 Antwort. Mittels ELISA wurde die IL-6 Sekretion nach Stimulation mit den verschiedenen Stämmen gemessen. Mittlere IL-6 Sekretion in den Probenüberständen (pg/ml) \pm SD, n=11; ATCC Kontrolle: 8677 ± 5668 vs. Stamm 1: 4792 ± 4173 pg/ml vs. Stamm 2: 8079 ± 5601 . Die Darstellung erfolgte als Säulendiagramm (Box plots) unter Angabe des Medians, 25. und 75. Perzentile. Die statistische Analyse wurde mittels Wilcoxon-Rank-Sum-Test durchgeführt, ein p-Wert $< 0,05$ als signifikant betrachtet.

Auch die Messung der intrazellulären IL-6 Produktion nach Inkubation mit den verschiedenen *S. epidermidis* Stämmen zeigte signifikant niedrigere Werte bei Stamm 1 im Vergleich zu den nicht Biofilm-bildenden Stamm 2 und der Kontrolle (p=0,012).

4.4 Immunmodulatorischer Einfluss durch anti-inflammatorische Substanzen

In der vierten Versuchsreihe wurde der immunmodulatorische Einfluss von Indomethacin und Ibuprofen auf die Zytokinproduktion ermittelt.

Es wurde zunächst Nabelschnurblut von 11 Neugeborenen (5 männlich, 6 weiblich, mittleres Gestationsalter 38,4 (95% KI: 35,7-41,1) Wochen mit drei verschiedenen Konzentrationen Indomethacin inkubiert und anschließend die Zytokinproduktion

mittels Durchflusszytometrie nach Stimulation durch LPS oder *S. epidermidis* gemessen.

Es zeigte sich in Abhängigkeit von der Indomethacin-Konzentrationen eine signifikant verminderte IL-6 Bildung nach Stimulation mit LPS ($p=0,005$). Kein Effekt wurde bei der IL-6 Produktion nach Stimulation mit *S. epidermidis* beobachtet ($p=0,8$).

Indomethacin führte bei beiden Stimulationsstrategien (LPS: $p=0,013$; *S. epidermidis*: $p=0,028$) zu einer Steigerung der TNF- α -Produktion (siehe Tabelle 7).

Indomethacin-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) n=11 Neugeborene	0	0.1	1	10	p Wilcoxon 0 vs. 10	p Friedman
IL-6 - LPS	63,4 (9,1)	60,5 (6,5)	59,8 (9,7)	57,4 (8,8)	0,005	0,004
IL-6 - <i>S. epidermidis</i>	13,2 (6,1)	12,7 (5,6)	12,8 (6,5)	13,3 (6,9)	0,8	0,7
TNF- α - LPS	13,2 (8)	19,8 (11)	19,2 (10,9)	18,4 (10)	0,013	0,07
TNF- α - <i>S. epidermidis</i>	4,6 (2,1)	5 (2,3)	5,9 (3,1)	6,7 (3,5)	0,028	0,113

Tabelle : Einfluss von Indomethacin auf die Zytokinproduktion bei Neugeborenen

Daten sind dargestellt als Mittelwert der Prozentzahl Zytokin-positiver Zellen (Standardabweichung), statistisch mit zwei verbundenen Stichproben (0 vs. 10 $\mu\text{g/ml}$, Wilcoxon) bzw. multiplen, verbundenen Stichproben (Friedman).

Als weiteres wurde das Nabelschnurblut von 22 Neugeborenen (15 männlich, 7 weiblich, mittleres Gestationsalter 39,3 (95% KI: 37,2-41,4) Wochen mit zwei verschiedenen Konzentrationen Ibuprofen vorinkubiert. Hier zeigte sich nach Stimulation mit LPS und *S. epidermidis* eine signifikante, konzentrationsabhängige Erhöhung der TNF- α Produktion (LPS: $p=0,001$; *S. epidermidis*: $p=0,001$) (siehe Tabelle 8).

Ibuprofen ($\mu\text{g/ml}$)/ n=22 Neugeborene	0	1	10	p Wilcoxon 0 vs. 10	p Friedman
IL-6 - LPS	60.3 (15.3)	59.9 (14.8)	60.5 (15.6)	0.44	0.3
IL-6 - S. epidermidis	16.6 (12.2)	17.0 (13.9)	16.3 (13)	0.41	0.83
TNF- α - LPS	24.8 (14.2)	31.1 (15.8)	35.9 (18.9)	0.001	<0.001
TNF- α - S. epidermidis	7.4 (5)	8.9 (6.7)	9.3 (6.3)	0.001	0.003

Tabelle : Einfluss von Ibuprofen auf die Zytokinproduktion bei Neugeborenen

Daten sind dargestellt als Mittelwert der Prozentzahl Zytokin-positiver Zellen (Standardabweichung), statistisch mit zwei verbundenen Stichproben (0 vs. 10 $\mu\text{g/ml}$, Wilcoxon) bzw. multiplen, verbundenen Stichproben (Friedman).

Als Vergleichsgruppe wurden die Ergebnisse aus den Untersuchungen von 14 peripher venösen Blutproben adulter Probanden aufgenommen (6 männlich, 8 weiblich, mittleres Alter 42 (95 % KI 22-63) Jahre). Diesbezüglich wurde eine Erhöhung der TNF- α produzierenden Makrophagen bei der Stimulation mit LPS und S. epidermidis (LPS: $p=0,001$; S. epidermidis: $p=0,004$) nachgewiesen. Bei den Erwachsenen zeigte sich zusätzlich auch eine Steigerung in der IL-6 Produktion nach Stimulation mit LPS ($p=0,044$) (siehe Tabelle 9).

Ibuprofen ($\mu\text{g/ml}$)/ n=14 Erwachsene	0	1	10	p Wilcoxon 0 vs. 10	p Friedman
IL-6 - LPS	80,9 (8,6)	81,8 (8,7)	82,4 (7,3)	0,044	0,019
IL-6 - S. epidermidis	11,5 (7,6)	12,4 (7,3)	11,5 (6,9)	0,9	0,81
TNF- α - LPS	40,3 (12,6)	46,7 (11,5)	55,5 (10,5)	0,001	<0,001
TNF- α - S. epidermidis	6,8 (3,1)	8,0 (3,8)	7,9 (3,2)	0,004	0,003

Tabelle : Einfluss von Ibuprofen auf die Zytokinproduktion beim Erwachsenen

Daten sind dargestellt als Mittelwert der Prozentzahl Zytokin-positiver Zellen (Standardabweichung), statistisch mit zwei verbundenen Stichproben (0 vs. 10 $\mu\text{g/ml}$, Wilcoxon) bzw. multiplen, verbundenen Stichproben (Friedman).

5 Diskussion

Bakterielle Infektionen spielen eine bedeutende Rolle in der Neonatologie. Vor allem bei Frühgeborenen sind sie die Hauptursache erhöhter Morbidität und Mortalität.

Studien haben belegt, dass niedriges Gestationsalter und Geburtsgewicht die Hauptrisikofaktoren für eine Sepsis darstellen (siehe Tabelle 1). Die Ursache der erhöhten Anfälligkeit für Infektionen wird auf die physiologische Unreife des Immunsystems der Frühgeborenen zurückgeführt. Der häufigste Erreger einer Late-Onset-Sepsis bei VLBW-Frühgeborenen ist *Staphylococcus epidermidis*.

In dieser Dissertation wurde erstmalig ein in-vitro-Vollblut Testsystem für eine Sepsis mit *S. epidermidis*-Vollkeim etabliert, das die Immunantwort mittels Messung der proinflammatorischen Zytokine evaluiert.

Wir wählten einen Vollblutstimulationstest aus, um möglichst in-vivo nahe Bedingungen zu schaffen und standardisierte Ausgangsvoraussetzungen zu gewährleisten. Durch das Vollblutmedium werden physiologische Gegebenheiten nachgeahmt, so dass z.B. die Möglichkeit von Zellinteraktionen im Wesentlichen erhalten bleibt. Außerdem sind Vollblutkulturen schonender für die zu untersuchenden Zellen, da sie hierbei nicht den Belastungen und Einflüssen eines Isolierungsprozesses ausgesetzt sind. Härtel et al. 2001 konnten zeigen, dass verschiedene Zellseparationsvorgänge die Zytokin-mRNA-Expression beeinflussen. Da keine vorherigen Isolierungsschritte notwendig sind, ist eine schnelle Verarbeitung der Proben möglich. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens ist, dass nur geringe Probenvolumina benötigt werden.

Um ein möglichst realistisches Sepsis-Bild nachzuahmen, haben wir die Proben mit lebenden *S. epidermidis* exponiert. Vorausgegangene Studien wählten Hitze-inaktivierte KNS oder nur Bestandteile von *S. epidermidis* als Stimulans, doch diese spiegeln nicht das physiologische Bild einer Bakteriämie wieder und sind daher nur bedingt aussagefähig. Zum Vergleich der Ergebnisse erfolgte jeweils parallel eine LPS-Stimulation aller Proben.

Die Zytokinbildung von IL-6, TNF- α und IL-10 wurde intrazellulär in CD-14 positiven Makrophagen mittels Durchflusszytometrie und die Zytokinsekretion in den Probenüberständen mittels ELISA bestimmt.

Es zeigte sich im ersten Teil der Versuche, dass eine Stimulation mit *S. epidermidis* zu einer gesteigerten Zytokinproduktion führt und dass die Zytokinbildung zum Teil abhängig von der eingesetzten *S. epidermidis*-Erregermenge ist. Reife Neugeborene waren in der Lage, mit Erwachsenen vergleichbare Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen zu bilden. Dieses Ergebnis könnte erklären, warum eine *S. epidermidis*-Sepsis bei reifen Neugeborenen nur sehr selten diagnostiziert wird.

In der zweiten Versuchsreihe wurde der Zusammenhang zwischen Gestationsalter und der Fähigkeit zur Zytokinbildung als Ausdruck der zellvermittelten Immunabwehr anhand von Nabelschnurblutproben von Früh- und Neugeborenen untersucht. Sowohl bei der Stimulation mit LPS als auch bei *S. epidermidis* zeigte sich eine Abhängigkeit zwischen Gestationsalter und Menge an produzierten pro-inflammatorischen Zytokinen. Die Ergebnisse belegen, dass sich die Fähigkeit zur pro-inflammatorischen Immunantwort mit zunehmendem Gestationsalter entwickelt. Die Produktion der entzündungsfördernden Zytokine unterliegt somit einem altersabhängigen Reifungsprozess. Unser Ergebnis widerspricht teilweise einer vorausgegangenen Studie von Schultz et al. 2002. In dieser Studie mit ähnlichem Versuchsaufbau stellte sich heraus, dass Frühgeborene und Neugeborene im Vergleich zu Erwachsenen nach LPS Stimulation eine gesteigerte Zytokinbildung (IL-6 und IL-8) aufwiesen. Die allgemeine Datenlage jedoch unterstützt unser Resultat. Currie et al. 2011, Dembinski et al. 2003, Liechty et al. 1991, Schibler et al. 1992 und Yachie et al. 1992 wiesen ebenfalls eine Abhängigkeit in der Zytokinproduktion zum Gestationsalter nach. Die abweichenden Ergebnisse der einzelnen Studien könnten durch unterschiedliche Zellansätze (Vollblutverfahren vs. Zellisolation) und Stimulationswege (LPS vs. IL-1) begründet werden.

Die inadäquate pro-inflammatorische Zytokinproduktion könnte die erhöhte Anfälligkeit der Frühgeborenen für Infektionen und damit das erhöhte Sepsisrisiko bei Kindern mit niedrigem Gestationsalter erklären. Denn durch die nur unzureichende Fähigkeit zu Abwehrreaktionen, welche normalerweise durch die pro-inflammatorischen Zytokine eingeleitet werden, wie z.B. die Erhöhung der vaskulären Permeabilität und die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten an die Gefäßwand durch TNF- α , wird die Ausbreitung der eindringenden Keime begünstigt. Somit kann sich aufgrund der unreifen Immunabwehr bei Frühgeborenen aus einer zunächst lokal begrenzten Infektion rasch eine Sepsis entwickeln.

Da die Zytokinproduktion bei Frühgeborenen mit geringem Gestationsalter zunehmend eingeschränkt ist, stellt sich die Frage, ob extrem Frühgeborene überhaupt in der Lage sind, eine adäquate pro-inflammatorische Immunantwort zu bilden. Diesbezüglich konnte eine Studie von Strunk et al. 2004 aufzeigen, dass bereits fetale Monozyten zur Zytokinproduktion fähig waren.

In der zweiten Versuchsreihe wurde außerdem die anti-inflammatorische Immunantwort untersucht. Ein funktionierendes dynamisches Gleichgewicht zwischen den pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen ist von großer Bedeutung. Die pro-inflammatorischen Zytokine werden unter anderem durch den hemmenden Einfluss der anti-inflammatorischen Zytokine reguliert. Eine überschießende entzündungsfördernde Reaktion könnte gewebetoxische Wirkungen haben und bis zum septischen Schock, Multi-Organversagen oder Tod führen. Die entzündungshemmenden Zytokine IL-10 und TGF- β spielen eine zentrale Rolle beim Erreichen des Gleichgewichtes. Die anti-inflammatorischen Eigenschaften von IL-10 beruhen unter anderem auf der Suppression der Bildung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α .

Bei der Stimulation mit LPS zeigte sich in der Auswertung der Zytokinproduktion von IL-10 und TGF- β eine Abhängigkeit zum Gestationsalter; auch bestand eine Korrelation in der Produktion von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen. Dies bestätigen vorausgegangene Studien. Schultz et al. 2004 zeigten, dass Früh- und Neugeborene im Vergleich zu Erwachsenen eine verminderte quantitative Bildung von anti-inflammatorischen Zytokinen und somit nur unzureichend zur kompensatorischen, anti-inflammatorischen Gegenregulation (CARS, compensatory anti-inflammatory response syndrome) befähigt sind.

Bei der Untersuchung der anti-inflammatorischen Zytokine nach Stimulation mit *S. epidermidis* fiel jedoch auf, dass die Produktion von IL-10 und TGF- β nicht mit dem Gestationsalter im Zusammenhang steht. Desweiteren konnte im Vergleich zur Stimulation mit LPS bei *S. epidermidis* keine Korrelation zwischen der pro-inflammatorischen IL-6 und der anti-inflammatorischen IL-10 Produktion verzeichnet werden. Die anti-inflammatorische Zytokinbildung wird offenbar auf individuellem Niveau reguliert.

Es liegt also die Vermutung nahe, dass die Pathogenese einer Infektion mit Koagulase-negativen Staphylokokken sich in einigen Elementen unterscheidet und ein Ungleichgewicht zwischen der pro- und anti-inflammatorischen Immunantwort vorliegt. Eine Dysbalance zwischen entzündungsfördernden Zytokinen und mangelnder

Gegenregulation durch entzündungshemmende Zytokine führt scheinbar bei Frühgeborenen zu einem Überwiegen der Entzündungsreaktion. Das würde das gehäufte Auftreten schwerwiegender Komplikationen wie der Entwicklung eines „Systemischen Inflammatorischen Response Syndroms“ (SIRS) bei den Kindern erklären.

Studien belegen, dass ein Ungleichgewicht zugunsten der pro-inflammatorischen Seite eine entscheidende Rolle in der Pathogenese mehrerer neonataler Erkrankungen spielt. Die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine ist mit verschiedenen Krankheitsbildern assoziiert. So sind beispielweise erhöhte pro-inflammatorische Zytokinspiegel bei der Genese der periventrikulären Leukomalazie (Yoon et al., 1997) und der bronchopulmonalen Dysplasie (Hitti et al., 1997) involviert.

Ein weiterer Faktor, der das Ungleichgewicht zugunsten der pro-inflammatorischen Seite begünstigt, ist neben der verminderten quantitativen Bildung anti-inflammatorischer Zytokine auch ihre defizitäre Gegenregulation pro-inflammatorischer Kaskaden. Eine Studie von Schultz et al. 2002 fand heraus, dass IL-10 bei Früh- und Neugeborenen eine verminderte suppressive Wirkung auf die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine im Vergleich zum Erwachsenen hat. Der Defizienz der anti-inflammatorischen Immunantwort könnte eine verminderte IL-10 Rezeptor Expression zugrunde liegen (Schultz et al., 2007).

Die in unserer Studie beobachtete reduzierte anti-inflammatorische Gegenregulation auf S. epidermidis könnte ursächlich dafür sein, dass Früh- und Neugeborene für schwere Folgeerscheinungen durch infektiöse Erkrankungen prädisponiert sind. Studien belegen, dass eine KNS-Sepsis das Risiko der Entwicklung einer bronchopulmonalen Dysplasie erhöht (Liljedahl et al., 2004; Härtel et al., 2009; Lahra et al., 2009). Daher ist die Prävention, frühzeitige Diagnose und Behandlung von Infektionen bei Frühgeborenen von zentraler Bedeutung.

Die Interpretation unserer Daten muss mit Zurückhaltung erfolgen, da dass das mittlere Gestationsalter in der Frühgeborenengruppe 31,6 Wochen betrug. Somit standen für die Untersuchung Kinder mit hohem Risiko, also unter der 28. SSW, nur in eingeschränkter Anzahl zur Verfügung. Auch wurde die Gabe pränataler Steroide nicht miteinbezogen. 52% der Patienten aus der Frühgeborenengruppe erhielten zur Prävention von pulmonalen Erkrankungen Glukokortikosteroide. Ob und in wieweit die Steroide in unserer Studie zu einer immunsupprimierenden Wirkung geführt haben, wurde nicht gesondert berücksichtigt. In einer Studie Schultz et al. 2002 konnte in-vitro eine

immunsupprimierende Wirkung (Hemmung der Zytokinsekretion) durch Dexamethason nachgewiesen werden.

Im dritten Teil der Versuchsreihe zeigte sich, dass ein weiterer Einflussfaktor auf die Immunreaktion die genotypische/phänotypische Diversität des Erregers ist.

Wir untersuchten die IL-6-Bildungskapazität nach Inkubation von Nabelschnurblut mit verschiedenen aus Blutkulturen isolierten *S. epidermidis* Stämmen. Bei Stamm 1 handelt es sich um einen bei einem 26 SSW alten Frühgeborenen mit klinischer Sepsis isolierten *S. epidermidis* mit Fähigkeit zur Biofilmproduktion und Methizillin/Aminoglycosid-Resistenz. Der zweite Stamm, nicht fähig zur Biofilmproduktion und ohne Antibiotika-Resistenz, wurde bei einem 31 SSW alten Frühgeborenen mit klinischer Sepsis nachgewiesen.

Es resultierte eine signifikant verminderte IL-6 Produktion bei der Stimulation mit dem Biofilm-bildenden *S. epidermidis*-Stamm im Vergleich zu den Biofilm-negativen Stämmen. Unser Ergebnis zeigt also, dass eine verminderte pro-inflammatorische Immunreaktion auf Biofilm-produzierende *S. epidermidis*-Stämme vorliegt. Folglich kann *S. epidermidis* durch die Bildung eines Biofilms den inflammatorischen Abwehrmechanismen des Wirtes ausweichen.

Ein ähnliches Ergebnis zeigte die Studie von Klingenberg et al. 2005. Hier konnte nachgewiesen werden, dass bei Infektionen durch Biofilm-produzierende *S. epidermidis* Stämme signifikant niedrigere CRP Spiegel zu messen waren.

Die Fähigkeit zur Biofilmbildung ist eine wesentliche Ursache für die Pathogenität von *S. epidermidis*. Es ist bekannt, dass der Biofilm den Bakterien maßgeblich Schutz vor Phagozytose durch neutrophile Zellen, vor dem Komplementsystem, Immunglobulinen und antimikrobiellen Peptiden bietet (Vuong et al., 2004; Kristian et al., 2008). Des Weiteren weisen Biofilm-produzierende *S. epidermidis*-Stämme häufig Resistenzen gegen verschiedene Antibiotika, wie z.B. Penicillin, Amoxicillin und Methicillin auf. Der Biofilm bedingt eine erschwerte bzw. unmögliche Penetration des Antibiotikums (Farber et al., 1990; Hajdu et al., 2009). Durch den Biofilm besitzt *S. epidermidis* die Eigenschaft, an körperfremde Materialien anzuhafte und dort Mikrokolonien zu bilden. Durch die Kontamination und Besiedlung von Kathetern, Implantaten und medizinischen Instrumenten ist *S. epidermidis* die Hauptursache nosokomialer Fremdkörper-assoziiierter Infektionen (Eiff et al., 2002). Da Frühgeborene häufig mit notwendigen intensivmedizinischen Maßnahmen, wie z.B. parenterale Ernährung über

peripher-venöse und zentral-venöse Katheter, versorgt werden müssen, ist es nicht verwunderlich, dass vor allem VLBW-Frühgeborene ein hohes Risiko besitzen, eine *S. epidermidis* Infektion zu entwickeln. Der Hauterreger *S. epidermidis* gelangt durch die vulnerable Haut als Eintrittspforte in die Blutbahn und kann, indem er sich durch die Biofilmbildung einer Immunantwort entzieht, leicht zu einer *S. epidermidis*-Sepsis führen.

Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass auch der Darm der Frühgeborenen der Ausgangspunkt einer *S. epidermidis*-Sepsis darstellen kann. *S. epidermidis* besiedelt nicht nur die Haut- und Schleimhäute, sondern ist auch der am häufigsten nachgewiesene Keim der Darmflora beim Frühgeborenen (Gewolb et al., 1999). Aufgrund der Unreife der Mukosabarriere besitzen Frühgeborene eine gesteigerte intestinale Permeabilität, welche eine Translokation von Bakterien durch die Darmschleimhaut begünstigt (Westerbeek et al., 2006, McElroy und Weitkamp, 2011). Eine aktuelle Studie von Soeorg et al. 2012 konnte zeigen, dass ein Teil der nachgewiesenen KNS in den Blutkulturen von Frühgeborenen mit LOS genotypisch identisch war mit zuvor festgestellten KNS im Darm. Somit unterstützt dieses Ergebnis die Annahme, dass möglicherweise auch der Gastrointestinaltrakt der Frühgeborenen der Ursprungsort einer *S. epidermidis*-Sepsis sein kann.

Die gewonnenen Erkenntnisse geben Hinweise darauf, warum gerade *S. epidermidis* bei Frühgeborenen der am häufigsten in den Blutkulturen festgestellte Sepsis-Keim ist. Es wird deutlich, dass zur Prophylaxe von nosokomialen Infektionen vor allem eine strenge Einhaltung hygienischer Maßnahmen und der zurückhaltende Einsatz von invasiven Therapien (z.B. ZVK-Anlagen) von großer Bedeutung sind.

In der vierten Versuchsreihe ging es um die Beeinflussung der Immunantwort durch anti-inflammatorische Substanzen. Wir wählten die in der Neonatologie häufig verwendeten nicht-steroidalen Antiphlogistika Indomethacin und Ibuprofen. Beide Medikamente werden routinemäßig in der Therapie eines persistierenden Ductus arteriosus (PDA) eingesetzt. Um zu evaluieren, ob die Medikamente einen Effekt auf die Zytokinproduktion haben, wurden die Proben eine Stunde vor der Stimulation mit *S. epidermidis* und LPS mit Indomethacin oder Ibuprofen vorinkubiert und die Produktion von IL-6 und TNF- α intrazellulär mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Beide Medikamente führten sowohl bei der Stimulation mit LPS als auch mit

S. epidermidis bei den Neugeborenen zu einer gesteigerten TNF- α Produktion. Auch bei der Erwachsenenengruppe konnte durch Zugabe von Ibuprofen eine erhöhte Anzahl TNF- α positiver Makrophagen bei beiden Stimulationswegen festgestellt werden.

Dieses Ergebnis ist erstaunlich, da man bei den antiphlogistisch wirkenden Medikamenten eher mit einer verminderten pro-inflammatorischen Zytokinproduktion gerechnet hätte. Studien aus den letzten Jahren kamen aber auch zu vergleichbaren Ergebnissen. Härtel et al. 2004 zeigten bei ähnlichem Versuchsaufbau, dass NSAR bei Erwachsenen in-vitro nach Stimulation mit LPS entgegen der Erwartung zu einer gesteigerten IL-6 und TNF- α Produktion führten. Eine Studie von Page et al. 2010 konnte belegen, dass NSAR in Monozyten von Erwachsenen die Produktion von TNF- α sowohl in-vitro, als auch in-vivo erhöhen.

Man geht davon aus, dass die Erhöhung der TNF- α Produktion auf die teilweise anti-inflammatorische Eigenschaft von PGE2 zurückzuführen ist. Durch die Hemmung der COX II durch die NSAR wird die Bildung von PGE2 unterdrückt. PGE2 hat bedeutende immunmodulatorische Wirkungen, wobei es im Allgemeinen durch die Beeinflussung der Zytokinproduktion eine immunsuppressive Wirkung besitzt. Es dient als negative Rückkopplung bei Makrophagen, indem es die TNF- α Produktion inhibiert und so die Entzündungsaktivität begrenzt (Kunkel et al., 1988). Außerdem wirkt PGE2 fördernd auf die IL-10 Produktion (Stolina et al., 2000). Durch die verminderte PGE2-Synthese fehlt offenbar der negative Feedbackmechanismus, und es resultiert eine gesteigerte TNF- α Produktion. Ein Beweis dafür ist, dass durch die Zugabe von PGE2 der Effekt der NSAR auf die TNF- α Produktion rückgängig gemacht werden kann (Härtel et al., 2004; Page et al., 2010).

Da die Medikamente Ibuprofen und Indomethacin eine gesteigerte TNF- α Produktion hervorrufen, haben sie einen pro-inflammatorischen Einfluss auf das Immunsystem. Durch diese iatrogenen Veränderungen könnte das sensible Immunsystem der Frühgeborenen aus dem Gleichgewicht gebracht werden. In Anbetracht der Tatsache, dass pro-inflammatorische Zytokine eine wichtige Rolle bei der Entstehung neonataler Erkrankungen spielen, sollten diese immunmodulatorischen Medikamente folglich mit Bedacht angewendet werden.

Es sollte betont werden, dass in dieser Versuchsreihe Proben von Neugeborenen untersucht wurden. Diese spiegeln jedoch nicht das eigentlich betroffene Patientenkollektiv wieder. Denn bei reifen Neugeborenen beträgt die Prävalenz des isolierten persistierenden Ductus arteriosus 0,04 % (PAN-Studie, Kompetenznetz

angeborene Herzfehler (Schwedler et al., 2011)). Es sind vor allem Frühgeborene, bei denen dieses Krankheitsbild ein Problem darstellt. Bei Frühgeborenen < 1500g Geburtsgewicht liegt die Inzidenz eines persistierenden PDA bei 46 % (Stoll et al., 2010). Daher sind in Zukunft weitere Versuche notwendig, die den Einfluss der immunmodulatorischen Medikamente gezielt auf das noch nicht ausgereifte Immunsystem der Frühgeborenen untersuchen.

Außerdem muss einschränkend gesagt werden, dass nur eine geringe Probenanzahl vorlag. Um die Hypothese zu prüfen, müsste die Anzahl der untersuchten Vollblutproben deutlich erhöht werden, zumal die nachgewiesenen Effekte (<10 %) klinisch eine untergeordnete Rolle spielen dürften.

Insgesamt sind unsere Ergebnisse nur bedingt übertragbar und mit Vorsicht zu interpretieren, da es sich in unseren gesamten Versuchen um ein in-vitro Modell handelt. Mit Hilfe des Vollblutsystems haben wir versucht, ansatzweise in-vivo nahe Bedingungen zu schaffen, doch sicherlich ist das Verfahren nicht in der Lage, die Vielzahl und Komplexität von Interaktionen zwischen Immunsystem und Metabolismus zu imitieren oder zu regulieren. Außerdem haben wir nur eine kleine Anzahl von verschiedenen Zytokinen bestimmt. Sie stellen nur eine limitierte Auswahl der zahlreichen Mediatoren des Immunsystems dar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zytokinproduktion von Früh- und Neugeborenen bei einer *S. epidermidis* Infektion maßgeblich vom Gestationsalter und vom Genotyp/Phänotyp des Erregers beeinflusst wird. Frühgeborene weisen bei einer *S. epidermidis* Infektion eine Abhängigkeit zwischen pro-inflammatorische Zytokinproduktion und Gestationsalter auf, wohingegen die anti-inflammatorische Zytokinproduktion nicht mit dem Gestationsalter assoziiert ist. Diese reduzierte anti-inflammatorische Gegenregulation könnte Früh- und Neugeborene für schwere Folgeerscheinungen durch infektiöse Erkrankungen prädisponieren und ein Schlüsselement in der Anfälligkeit für KNS-Infektionen darstellen. Folglich ist eine frühzeitige Diagnose und Behandlung von grampositiven Infektionen von großer Bedeutung.

Des Weiteren konnten wir die Bedeutung des Virulenzfaktors einer Biofilmbildung durch eine verminderte Zytokinproduktion darstellen. Unsere Versuche zeigten außerdem, dass häufig eingesetzte Medikamente wie Ibuprofen und Indomethacin das

Immunsystem pro-inflammatorisch beeinflussen, indem sie zu einer gesteigerten TNF- α -Produktion führen.

Durch die durchgeführten Versuche konnte ein kleiner Einblick in die durch *S. epidermidis* induzierte Immunantwort bei Früh- und Neugeborenen erlangt werden. Zukünftige Studien sollten weitere Detailkenntnisse zu klinischen und genetischen Einflussfaktoren der Immunantwort der Kinder erbringen und die Interaktionen zwischen Erreger und Wirt näher charakterisieren. Denn weitere Erkenntnisse zur Immunantwort der Frühgeborenen auf KNS-Infektionen sind notwendig, um die Pathogenese besser zu verstehen und dadurch die Prävention und Behandlung zu optimieren. Ein langfristiges Ziel ist die Erstellung eines individuellen Risikoprofils, um die stärker gefährdeten Kinder besonders vor Infektionen und immunvermittelten Folgeerkrankungen zu schützen.

6 Zusammenfassung

Koagulase-negative Staphylokokken sind die häufigsten Erreger einer LOS bei VLBW-Frühgeborenen. In den meisten Fällen wird *S. epidermidis* in den Blutkulturen nachgewiesen. Die neonatale Sepsis stellt einen wichtigen Risikofaktor für die Letalität und Langzeitmorbidity von Früh- und Neugeborenen dar. Hauptrisikofaktoren einer Sepsis sind niedriges Gestationsalter und geringes Geburtsgewicht. Die erhöhte Empfänglichkeit der Frühgeborenen gegenüber Infektionen wird vor allem auf eine entwicklungsbedingte Unreife des Immunsystems zurückgeführt.

Hauptziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der *S. epidermidis* induzierten Immunantwort bei Früh- und Neugeborenen. Es gelang, ein in-vitro-Sepsis-Modell zu etablieren. Wir wählten ein Vollbluttestverfahren aus, um möglichst in-vivo nahe Bedingungen zu erreichen. Monozyten aus Nabelschnurblutproben von Früh- und Neugeborenen wurden im Vollblut mit lebenden *S. epidermidis* stimuliert und die Zytokinproduktion mittels Durchflusszytometrie oder ELISA quantifiziert.

Es zeigten sich keine Unterschiede in der Stimulierbarkeit von Nabelschnurblut oder adulten Spenderblut. Das Ausmaß der Zytokinproduktion war von der Anzahl der eingesetzten koloniebildenden Einheiten abhängig. Es konnte ein Zusammenhang zwischen der pro-inflammatorischen Zytokinproduktion und dem Gestationsalter der Frühgeborenen nachgewiesen werden. Die Zytokinbildung unterliegt somit einem altersabhängigen Reifungsprozess. Die zunehmend eingeschränkte Zytokinproduktion könnte die hohe Anfälligkeit der Frühgeborenen mit geringem Gestationsalter für KNS-Infektionen erklären. Im Gegensatz dazu war die anti-inflammatorische Zytokinproduktion nicht mit dem Gestationsalter assoziiert. Die anti-inflammatorischen Zytokine scheinen individuell reguliert zu werden. Die reduzierte anti-inflammatorische Gegenregulation könnte ursächlich dafür sein, dass Früh- und Neugeborene für chronische Folgeschäden durch KNS-Infektionen prädisponiert sind. Des Weiteren zeigten wir durch eine verminderte IL-6-Produktion nach Stimulation mit einem Biofilmbildenden *S. epidermidis*-Stamm, dass auch der Genotyp/Phänotyp des Erregers eine wichtige Rolle bei der Immunantwort spielt.

Außerdem wurden in-vitro-Effekte von Indomethacin und Ibuprofen auf die Zytokinbildung nachgewiesen. Die Medikamente führten zwar bei den Proben der Neugeborenen zu einer gesteigerten TNF- α Produktion, ob diese vergleichsweise

geringgradigen Effekte jedoch klinische Bedeutung haben, muss in in-vivo-Untersuchungen nachgeprüft werden.

Unsere Daten bieten eine deskriptive Basis für die Etablierung von Risikomodellen für eine *S. epidermidis*-Sepsis. Denn ein langfristiges Ziel ist die Erstellung eines individuellen Risikoprofils, um die gefährdeten Kinder besser vor Infektionen und die dadurch bedingten Folgeschäden zu schützen.

V Literaturverzeichnis

1. **Anderson DC.** Neonatal neutrophil dysfunction. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* Summer;11(2):224-6 (1989).
2. **Ahuja SS, Paliogianni F, Yamada H, Balow JE, Boumpas DT.** Effect of transforming growth factor-beta on early and late activation events in human T cells. *J Immunol.* Apr 15;150(8 Pt 1):3109-18 (1993).
3. **Ballow M, Cates KL, Rowe JC, Goetz C, Desbonnet C.** Development of the immune system in very low birth weight premature infants: concentration of plasma immunoglobulins and patterns of infections. *Pediatr Res;* 20 899-904 (1986).
4. **Bancalari E, Claire N, Gonzalez A.** Patent ductus arteriosus and respiratory outcome in premature infants. *Biol Neonate;* 88(3):192-201 (2005).
5. **Björkqvist M, Söderqvist B, Törnqvist E, Sjöberg L, Fredlund H, Kühn I, Colque-Navarro P, Schollin J.** Phenotypic and genotypic characterisation of blood isolates of coagulase-negative staphylococci in the newborn. *APMIS.* Apr;110(4):332-9 (2002).
6. **Borden EC, Chin P.** Interleukin-6: a cytokine with potential diagnostic and therapeutic roles. *J Lab Clin Med.* Jun;123(6):824-9 (1994).
7. **Capozzi G, Santoro G.** Patent ductus arteriosus: patho-physiology, hemodynamic effects and clinical complications. *J Matern Fetal Neonatal Med.* Oct;24 Suppl 1:15-6. Epub 2011 Sep 6 (2011).
8. **Carr R, Huizinga T.** Low soluble FcRIII receptor demonstrates reduced neutrophil reserves in preterm neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* September; 83(2): F160 (2000).
9. **Carr R.** Neutrophil production and function in newborn infants. *Br J Haematol.* Jul;110(1):18-28 (2000).
10. **Chang HY, Locker J, Lu R, Schuster VL.** Failure of postnatal ductus arteriosus closure in prostaglandin transporter-deficient mice. *Circulation.* Feb 2;121(4):529-36 (2010).
11. **Chien LY, Macnab Y, Aziz K, Andrews W, McMillan DD, Lee SK.** Canadian Neonatal Network. Variations in central venous catheter-related infection risks among Canadian neonatal intensive care units. *Pediatr Infect Dis J.* Jun;21(6):505-11 (2002).
12. **Chiou YB, Blume-Peytavi U.** Stratum corneum maturation. A review of neonatal skin function. *Skin Pharmacol Physiol.* Mar-Apr;17(2):57-66 (2004).
13. **Chirico G, Ciardelli L, Cecci P, Amici M, Gasparoni A, Rondini G.** Serum concentration of granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) in term and preterm infants. *Eur J Pediatr;* 156:269-271 (1997).

14. **Chirico G, Marconi M, De Amici M, Gasparoni A, Mingrat G, Chiara A, Rondini G, Ugazio AG.** Deficiency of neutrophil bactericidal activity in term and preterm infants. A longitudinal study *Biol Neonate*. 47(3):125-9 (1985).
15. **Couto RC, Pedrosa TM, Tofani Cde P, Pedroso ER.** Risk factors for nosocomial infection in a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. Jun;27(6):571-5 (2006).
16. **Currie AJ, Curtis S, Strunk T, Riley K, Liyanage K, Prescott S, Doherty D, Simmer K, Richmond P, Burgner D.** Preterm infants have deficient monocyte and lymphocyte cytokine responses to group B streptococcus. *Infect Immun*. Apr;79(4):1588-96 (2011).
17. **Damas P, Ledoux D, Nys M, Vrindts Y, De Grootte D, Franchimont P, Lamy M.** Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Ann Surg*. April; 215(4): 356–362 (1992).
18. **Dealtry GB, O'Farrell MK, Fernandez N.** The Th2 cytokine environment of the placenta. *Int Arch Allergy Immunol*, 123:107-19 (2000).
19. **Dembinski J, Behrendt D, Martini R, Heep A, Bartmann P.** Modulation of pro- and anti-inflammatory cytokine production in very preterm infants. *Cytokine*. Feb 21;21(4):200-6 (2003).
20. **Drossou V, Kanakoudi F, Tzimouli V, Sarafidis K, Taparkou A, Bougiouklis D, Petropoulou T, Kremenopoulos G.** Impact of prematurity, stress and sepsis on the neutrophil respiratory burst activity of neonates. *Biol Neonate*.72(4):201-9 (1997).
21. **Eiff C, Peters G, Heilmann C.** Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis*. Nov;2(11):677-85 (2002).
22. **Falconer AE, Carr R, Edwards SW.** Impaired Neutrophil Phagocytosis in Preterm Neonates: Lack of Correlation with Expression of Immunoglobulin or Complement Receptors. *Neonatology*, Vol. 68, No. 4 (1995).
23. **Fanaroff AA, Korones SB, Wright LL, Verter J, Poland RL, Bauer CR, Tyson JE, Philips JB 3rd, Edwards W, Lucey JF, Catz CS, Shankaran S, Oh W.** Incidence, presenting features, risk factors and significance of late onset septicemia in very low birth weight infants. The National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *Pediatr Infect Dis J*. Jul;17(7):593-8 (1998).
24. **Farber BF, Kaplan MH, Clogston AG.** Staphylococcus epidermidis extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide antibiotics. *J Infect Dis*. Jan;161(1):37-40 (1990).
25. **Faust K, Göpel W, Herting E, Härtel C.** Sepsis bei Frühgeborenen mit einem sehr niedrigen Geburtsgewicht. *Chemother J*, 20: 1-8 (2011).
26. **Feldmann M, Brennan FM, Maini RN.** Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 14:397-440 (1996).

27. **Fleer A, Gerards LJ, Aerts P, Westerdaal NA, Senders RC, van Dijk H, Verhoef J.** Opsonic defense to *Staphylococcus epidermidis* in the premature neonate. *J Infect Dis.* Nov;152(5):930-7 (1985).
28. **Freeman J, Platt R, Epstein MF, Smith NE, Sidebottom DG, Goldman DA.** Birth weight and length of stay as determinants of nosocomial coagulase-negative staphylococcal bacteremia in neonatal intensive care unit populations: potential for confounding. *Am J Epidemiol* Dec;132 (6) : 1130-40 (1990).
29. **Gasparoni A, Ciardelli L, Avanzini A, Castellazzi AM, Carini R, Rondini G, Chirico G.** Age-related changes in intracellular TH1/TH2 cytokine production, immunoproliferative T lymphocyte response and natural killer cell activity in newborns, children and adults. *Biol Neonate.* 84(4):297-303 (2003).
30. **Gastmeier A.** Gefäßkatheter als Risikofaktoren für die nosokomiale Sepsis bei neonatologischen Intensivpatienten, *Med. Diss. Berlin* (2008).
31. **Geffers C, Bärwolff S, Schwab F, Rüden H, Gastmeier P.** Surveillance nosokomialer Infektionen auf pädiatrischen und neonatologischen Intensivstationen in Deutschland. *Padiatr Prax:* 66 73-82 (2005)
32. **Gewolb IH, Schwalbe RS, Taciak VL, Harrison TS, Panigrahi P.** Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Arch Dis Child Neonatal;* 80:167-173 (1999).
33. **Gladstone IM, Ehrenkranz RA, Edberg SC, Baltimore RS.** A ten-year review of neonatal sepsis and comparison with the previous fifty-year experience. *Pediatr Infect Dis J.*Nov;9(11):819-25 (1990).
34. **Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R.** Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet.* Jan 5;371(9606):75-84 (2008).
35. **Goldmann DA, Pier GB.** Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization. *Clin Microbiol Rev.* April; 6(2): 176-192 (1993).
36. **Granslo H, Gammelsrud KW, Fredheim EA, Flaegstad T, Klingenberg C.** Coagulase-negative staphylococci-biofilm and antibiotic resistance, *Tidsskr Nor Laegeforen.* Dec 4;128(23):2746-9 (2008).
37. **Härtel C, Bein G, Kirchner H, Klüter H.** A human whole-blood assay for analysis of T-cell function by quantification of cytokine mRNA. *Scand J Immunol.* Jun;49(6):649-54 (1999).
38. **Härtel C, Bein G, Müller-Steinhardt M, Klüter H.** Ex vivo induction of cytokine mRNA expression in human blood samples. *J Immunol Methods.* Mar 1;249(1-2):63-71(2001).
39. **Härtel C, Haase B, Browning-Carmo K, Gebauer C, Kattner E, Kribs A, Segerer H, Teig N, Wense A, Wieg C, Herting E, Göpel W.** Does the enteral feeding

- advancement affect short-term outcomes in very low birth weight infants? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* Apr;48(4):464-70 (2009).
40. **Härtel C, von Puttkamer J, Gallner F, Strunk T, Schultz C.** Dose-dependent immunomodulatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in human whole blood: potential role of cyclooxygenase-2 inhibition. *Scand J Immunol.* Oct;60(4):412-20 (2004).
 41. **Hajdu S, Lassnigg A, Graninger W, Hirschl AM, Presterl E.** Effects of vancomycin, daptomycin, fosfomycin, tigecycline, and ceftriaxone on *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Orthop Res.* Oct;27(10):1361-5 (2009).
 42. **Hall RT, Hall SL, Barnes WG, Izuegbu J, Rogolsky M, Zorbas I.** Characteristics of coagulase-negative staphylococci from infants with bacteremia. *Pediatr Infect Dis J.* Apr;6(4):377-83 (1987).
 43. **Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Götz F.** Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol.* Jun;20(5):1083-91 (1996).
 44. **Hitti J, Krohn MA, Patton DL, Tarczy-Hornoch P, Hillier SL, Cassen EM, Eschenbach DA.** Amniotic fluid tumor necrosis factor-alpha and the risk of respiratory distress syndrome among preterm infants. *Am J Obstet Gynecol.* Jul;177(1):50-6 (1997).
 45. **Hotoura E, Giapros V, Kostoula A, Spyrou P, Andronikou S.** Pre-inflammatory Mediators and Lymphocyte Subpopulations in Preterm Neonates with Sepsis. *Inflammation.* Dec 13 (2011).
 46. **Isaacs D.** Australasian Study Group For Neonatal Infections. A ten year, multicentre study of coagulase negative staphylococcal infections in Australasian neonatal units. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* Mar;88(2):F89-93 (2003).
 47. **Janeway CA, Travers P., Walport M., Shlomchik M.** *Immunologie*, 5. Aufl.- Heidelberg; Berlin: Spektrum, Akad. Verlage. S.3 -7 (2002a).
 48. **Janeway CA, Travers P., Walport M., Shlomchik M.** *Immunologie*, 5. Aufl.- Heidelberg; Berlin: Spektrum, Akad. Verlage. S.343-348, 421-427 (2002b).
 49. **Janeway CA, Travers P., Walport M., Shlomchik M.** *Immunologie*, 5. Aufl.- Heidelberg; Berlin: Spektrum, Akad. Verlage. S.74-92 (2002c).
 50. **Janeway CA, Travers P., Walport M., Shlomchik M.** *Immunologie*, 5. Aufl.- Heidelberg; Berlin: Spektrum, Akad. Verlage. S.422-423 (2002d).
 51. **Janeway CA, Travers P., Walport M., Shlomchik M.** *Immunologie*, 5. Aufl.- Heidelberg; Berlin: Spektrum, Akad. Verlage. S.580 (2002e).
 52. **Johnson-Robbins LA, el-Mohandes AE, Simmens SJ, Keiser JF.** *Staphylococcus epidermidis* sepsis in the intensive care nursery: a characterization of risk associations in infants < 1,000 g. *Biol Neonate.* 69(4):249-56 (1996).

53. **Kalia YN, Nonato LB, Lund CH, Guy RH.** Development of skin barrier function in premature infants. *J Invest Dermatol.* Aug;111(2):320-6 (1998).
54. **Klingenberg C, Aarag E, Rønnestad A, Sollid JE, Abrahamsen TG, Kjeldsen G, Flaegstad T.** Coagulase-negative staphylococcal sepsis in neonates. Association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response. *Pediatr Infect Dis J.* Sep;24(9):817-22 (2005).
55. **Klingenberg C, Sundsfjord A, Rønnestad A, Mikalsen J, Gaustad P, Flaegstad T.** Phenotypic and genotypic aminoglycoside resistance in blood culture isolates of coagulase-negative staphylococci from a single neonatal intensive care unit, 1989-2000. *J Antimicrob Chemother.* Nov;54(5):889-96 (2004).
56. **Kristian SA, Birkenstock TA, Sauder U, Mack D, Götz F, Landmann R.** Biofilm formation induces C3a release and protects *Staphylococcus epidermidis* from IgG and complement deposition and from neutrophil-dependent killing. *J. Infect.Dis.* 197:1028-1035 (2008).
57. **Kunkel SL, Spengler M, May MA, Spengler R, Larrick J, Remick D.** Prostaglandin E2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. *J Biol Chem.* Apr 15;263(11):5380-4 (1988).
58. **Lahra MM, Beeby PJ, Jeffery HE.** Intrauterine inflammation, neonatal sepsis, and chronic lung disease: a 13-year hospital cohort study. *Pediatrics.* May;123(5):1314-9 (2009).
59. **Levy O.** Innate immunity of the human newborn: distinct cytokine responses to LPS and other Toll-like receptor agonists. *J Endotoxin Res.* 11(2):113-6 (2005).
60. **Liechty KW, Koenig JM, Mitchell MD, Romero R, Christensen RD.** Production of interleukin-6 by fetal and maternal cells in vivo during intraamniotic infection and in vitro after stimulation with interleukin-1. *Pediatr Res.* Jan;29(1):1-4 (1991).
61. **Liljedahl M, Bodin L, Schollin J.** Coagulase-negative staphylococcal sepsis as a predictor of bronchopulmonary dysplasia. *Acta Paediatr.* Feb;93(2):211-5 (2004).
62. **Mack D.** Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *J Hosp Infect.* Dec;43 Suppl:S113-25 (1999).
63. **Mah TF, O'Toole GA.** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* Jan;9(1):34-9 (2001).
64. **Makhoul IR, Sujov P, Smolkin T, Lusky A, Reichman B.** Epidemiological, clinical, and microbiological characteristics of late-onset sepsis among very low birth weight infants in Israel: a national survey *Pediatrics.* Jan;109(1):34-9 (2002).
65. **Makhoul IR, Sujov P, Smolkin T, Lusky A, Reichman B.** Israel Neonatal Network. Pathogen-specific early mortality in very low birth weight infants with late-onset sepsis: a national survey. *Clin Infect Dis.* Jan 15;40(2):218-24 (2005).

66. **Mallow EB, Harris A, Salzman N, Russell JP, DeBerardinis RJ, Ruchelli E, Bevins CL.** Human enteric defensins. Gene structure and developmental expression. *J Biol Chem.* Feb 23;271(8):4038-45 (1996).
67. **Maródi L.** Innate cellular immune responses in newborns. *Clin Immunol.* 2006 Feb-Mar;118(2-3):137-44 (2006).
68. **Martinot A, Leclerc F, Cremer R, Leteurtre S, Fourier C, Hue V.** Sepsis in neonates and children: definitions, epidemiology, and outcome. *Pediatr Emerg Care.* Aug;13(4):277-81 (1997).
69. **McElroy S, Weitkamp JH.** Innate Immunity in the Small Intestine of the Preterm Infant. *Neoreviews.* September 1; 12(9): e517–e526 (2011).
70. **Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A.** Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*;19:683-765 (2001).
71. **Morein B, Blomqvist G, Hu K.** Immune responsiveness in the neonatal period. *J Comp Pathol.* Jul;137 Suppl 1:S27-31(2007).
72. **Otto M.** Staphylococcal Biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 322: 207–228 (2008).
73. **Page TH, Turner JJ, Brown AC, Timms EM, Inglis JJ, Brennan FM, Foxwell BM, Ray KP, Feldmann M.** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs increase TNF production in rheumatoid synovial membrane cultures and whole blood. *J Immunol.* 2010 Sep 15;185(6):3694-701 (2010).
74. **Plevy SE, Landers CJ, Prehn J, Carramanzana NM, Deem RL, Shealy D, Targan SR.** A role for TNF-alpha and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. *J Immunol.* Dec 15;159(12):6276-82 (1997).
75. **Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Omu A, Gupta M, Farhat R.** Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod.* Mar;15(3):713-8 (2003).
76. **Raymond J, Aujard Y.** Nosocomial infections in pediatric patients: a European, multicenter prospective study. *European study group, Infect Control Hostp Epidemiol* Apr; 21(4): 260-3 (2000).
77. **Rodríguez Cervilla J, Fraga JM, García Riestra C, Fernández Lorenzo JR, Martínez Soto I.** Neonatal sepsis: epidemiologic indicators and relation to birth weight and length of hospitalization time. *An Esp Pediatr.* Apr;48(4):401-8 (1998).
78. **Rognum TO, Thrane S, Stoltenberg L, Vege A, Brandtzaeg P.** Development of intestinal mucosal immunity in fetal life and the first postnatal months. *Pediatr Res.* Aug;32(2):145-9 (1992).
79. **Rutter N.** The immature skin. *Eur J Pediatr.* Aug;155 Suppl 2:S18-20 (1996).

80. **Schibler KR, Liechty KW, White WL, Rothstein G, Christensen RD.** Defective production of interleukin-6 by monocytes: a possible mechanism underlying several host defense deficiencies of neonates. *Pediatr Res.* Jan;31(1):18-21 (1992).
81. **Schneeweiß B.** Krankenhaus- und Praxishygiene. München, Jena Urban & Fischer: 551-564 (2001).
82. **Schultz C.** Intracytoplasmic detection of proinflammatory cytokines and chemokines in monocytes by flow cytometry. *Methods Mol Biol.* 215:29-39 (2003).
83. **Schultz C, Rott C, Temming P, Schlenke P, Möller JC, Bucsky P.** Enhanced interleukin-6 and interleukin-8 synthesis in term and preterm infants. *Pediatric Res.* 51:317-322 (2002).
84. **Schultz C, Strunk T, Temming P, Matzke N, Härtel C.** Reduced IL-10 production and -receptor expression in neonatal T lymphocytes. *Acta Paediatr.* Aug;96(8):1122-5 (2007).
85. **Schultz C, Temming P, Bucsky P, Göpel W, Strunk T, Härtel C.** Immature anti-inflammatory response in neonates. *Clin Exp Immunol;* 135:130-6 (2004).
86. **Schwedler G, Lindinger A, Lange PE, Sax U, Olchvary J, Peters B, Bauer U, Hense HW.** Frequency and spectrum of congenital heart defects among live births in Germany : a study of the Competence Network for Congenital Heart Defects. *Clin Res Cardiol.* Dec;100(12):1111-7 (2011).
87. **Sitzmann F.** Pädiatrie Duale Reihe, Thieme, Stuttgart; 2. Aufl. S. 117 (2002).
88. **Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM.** Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem.* 69:145-82 (2000).
89. **Soeorg H, Huik K, Parm U, Ilmoja ML, Metelskaja N, Metsvaht T, Lutsar I.** Genetic Relatedness of Coagulase-Negative Staphylococci from Gastrointestinal Tract and Blood of Preterm Neonates with Late-Onset Sepsis. *Pediatr Infect Dis J.* Oct 17 (2012).
90. **Sohn AH, Garrett DO, Sinkowitz-Cochran RL, Grohskopf LA, Levine GL, Stover BH, Siegel JD, Jarvis WR.** Pediatric Prevention Network. Prevalence of nosocomial infections in neonatal intensive care unit patients: Results from the first national point-prevalence survey. *J Pediatr* Dec;139(6):821-7 (2001).
91. **Splawski JB, Jelinek DF, Lipsky PE.** Delineation of the functional capacity of human neonatal lymphocytes. *J Clin Invest.* 1991 Feb;87(2):545-53.
92. **Stichtenoth G, Demmert M, Bohnhorst B, Stein A, Ehlers S, Heitmann F, Rieger-Fackeldey E, Olbertz D, Roll C, Emeis M, Mögel M, Schiffmann H, Wieg C, Wintgens J, Herting E, Göpel W, Härtel C.** Major contributors to hospital mortality in very-low-birth-weight infants: data of the birth year 2010 cohort of the German Neonatal Network. *Klin Padiatr.* Jul;224(4):276-81 (2012).

93. **Stolina M, Sharma S, Lin Y, Dohadwala M, Gardner B, Luo J, Zhu L, Kronenberg M, Miller PW, Portanova J, Lee JC, Dubinett SM.** Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. *J Immunol.* Jan 1;164(1):361-70 (2000).
94. **Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, Shankaran S, Laptook AR, Walsh MC, Hale EC, Newman NS, Schibler K, Carlo WA, Kennedy KA, Poindexter BB, Finer NN, Ehrenkranz RA, Duara S, Sánchez PJ, O'Shea TM, Goldberg RN, Van Meurs KP, Faix RG, Phelps DL, Frantz ID 3rd, Watterberg KL, Saha S, Das A, Higgins RD.** Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics.* Sep;126(3):443-56 (2010).
95. **Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Lemons JA, Donovan EF, Stark AR, Tyson JE, Oh W, Bauer CR, Korones SB, Shankaran S, Laptook AR, Stevenson DK, Papile LA, Poole WK.** Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics.* Aug;110(2 Pt 1):285-91 (2002).
96. **Stoll BJ, Temprosa M, Tyson JE, Papile LA, Wright LL, Bauer CR, Donovan EF, Korones SB, Lemons JA, Fanaroff AA, Stevenson DK, Oh W, Ehrenkranz RA, Shankaran S, Verter J.** Dexamethasone therapy increases infection in very low birth weight infants. *Pediatrics.* Nov;104(5):e63 (1999).
97. **Strunk T, Temming P, Gembruch U, Reiss I, Bucsky P, Schultz C.** Differential maturation of the innate immune response in human fetuses. *Pediatr Res.* Aug;56(2):219-26 (2004).
98. **Suzuki E, Hiramatsu K, Yokota T.** Survey of methicillin-resistant clinical strains of coagulase-negative staphylococci for mecA gene distribution. *Antimicrob Agents Chemother.* Feb;36(2):429-34 (1992).
99. **Turner M, Chantry D, Feldmann M.** Transforming growth factor beta induces the production of interleukin 6 by human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine.* May;2(3):211-6 (1990).
100. **Voeten EA, Semmekrot BA, Weemaes CM.** Immunoglobulin levels in premature infants on a neonatology unit. *Tijdschr Kindergeneeskd.* Jun;61(3):87-93 (1993).
101. **Vuong C, Voyich JM, Fischer ER, Braughton KR, Whitney AR, DeLeo FR, Otto M.** Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol.* Mar;6(3):269-75 (2004).
102. **Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, Sporn MB.** Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* August; 84(16): 5788-5792 (1987).

103. **Westerbeek EA, van den Berg A, Lafeber HN, Knol J, Fetter WP, van Elburg RM.** The intestinal bacterial colonisation in preterm infants: a review of the literature. *Clin Nutr.* Jun;25(3):361-8 (2006).
104. **Wolach B, Dolfin T, Regev R, Gilboa S, Schlesinger M.** The development of the complement system after 28 weeks' gestation. *Acta Paediatr.* May;86(5):523-7 (1997).
105. **Yachie A, Takano N, Ohta K, Uehara T, Fujita S, Miyawaki T, Taniguchi N.** Defective production of interleukin-6 in very small premature infants in response to bacterial pathogens. *Infect Immun.* Mar;60(3):749-53 (1992).
106. **Yoon BH, Romero R, Kim CJ, Koo JN, Choe G, Syn HC, Chi JG.** High expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in periventricular leukomalacia. *Am J Obstet Gynecol.* Aug;177(2):406-11 (1997).
107. **Ziebuhr W, Hennig S, Eckart M, Kränzler H, Batzilla C, Kozitskaya S.** Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *Int J Antimicrob Agents.* Aug;28 Suppl 1:S14-20 (2006).

VI Anhang

6.1 Definition einer Sepsis bei Früh- und Neugeborenen nach dem Surveillance-Protokoll

Sepsis	Kriterien
Klinische Sepsis (ohne Erregernachweis)	<ul style="list-style-type: none"> • Betreuender Arzt beginnt geeignete antimikrobielle Therapie für Sepsis für mindestens 5 Tage • Kein Keimwachstum in der Blutkultur oder nicht getestet • Keine offensichtliche Infektion an anderer Stelle • Zwei der klinischen Zeichen und Symptome *
Mikrobiologisch bestätigte Sepsis (aber kein KNS)	<ul style="list-style-type: none"> • Erreger aus Blut oder Liquor isoliert und andere als KNS (Keim ist mit Infektion an anderer Stelle nicht verwandt) • Zwei der klinischen Zeichen und Symptome *
Mikrobiologisch bestätigte Sepsis (nur KNS)	<ul style="list-style-type: none"> • Ausschließlich KNS aus Blutkultur oder intravasalem Katheter isoliert • Zwei der klinischen Zeichen und Symptome * • Ein Laborparameter *

Tabelle : Definition einer Sepsis bei Früh- und Neugeborenen nach dem Surveillance-Protokoll NEO-KISS des NRZ (Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen des Robert Koch Institutes)

* Klinischen Zeichen und Symptome

- Fieber (> 38 °C) oder Temperaturinstabilität (häufiges Nachstellen des Inkubators) oder Hypothermie (< 36.5 °C)
- unerklärte metabolische Azidose (BE < -10 mval/l)
- Tachykardie (> 200/min) oder neu/vermehrte Bradykardien (< 80/min)
- neu aufgetretene Hyperglykämie (> 140 mg/dl)
- Rekapillarierungszeit > 2s
- anderes Sepsiszeichen: Hautkolorit (nur wenn Rekapillarierungszeit nicht verwendet), erhöhter Sauerstoffbedarf (Intubation), instabiler AZ, Apathie
- neu oder vermehrte Apnoe(en) (> 20s)

* Ein Laborparameter

- CRP > 2,0 mg/dl oder Interleukin
- Thrombozyten < 100/nl
- I/T-Ratio > 0,2 (unreife Granulozyten / gesamt Granulozyten)
- Leukozyten < 5/nl (ohne Erythroblasten)

<http://www.nrz-hygiene.de/fileadmin/nrz/download/NEOKISSProtokoll221209.pdf>

VII **Publikationen**

1. Härtel C, **Osthues I**, Rupp J, Haase B, Röder K, Göpel W, Herting E, Schultz C. Characterization of the host inflammatory response to Staphylococcus epidermidis in neonatal whole blood. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2008; 93: F140-5. (IF 2,3)
2. Härtel C, Rupp J, Iblher P, Puzik A, **Osthues I**, Schultz C, Müller-Steinhardt M. Immunomodulatory effects of Sanglifehrin A in the innate and acquired immune response of neonatal whole blood cells. Immunobiology. 2009;214(3):235-43. Epub 2008 Oct 11.(IF 3,3)

VIII Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei all denen bedanken, die mich unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank meinem Doktorvater Privatdozent Dr. med. Christoph Härtel für die spannende Aufgabenstellung und hervorragende Betreuung. Ich danke ihm für die sehr engagierte Begleitung und seine hilfreichen Ratschläge bei der Ausgestaltung dieser Dissertationsschrift.

Auch danke ich den beteiligten Instituten für die Unterstützung unseres Projektes, zum einen gilt mein Dank Prof. Dr. med. Christian Rupp aus dem Institut für Mikrobiologie, zum anderen Prof. Dr. med. Siegfried Görg, Leiter des Institutes für Immunologie und Transfusionsmedizin für die Bereitstellung der Keime und Spenderblutproben.

Ich bedanke mich auch bei Prof. Dr. med. Klaus Dietrich, Direktor der Frauenklinik und Geburtshilfe für die Kooperation und insbesondere für die zur Verfügung gestellten Nabelschnurblutproben für unser Forschungsprojekt.

Bedanken möchte ich mich besonders bei Anja Sewe; sie hat mir geduldig die entsprechenden Labortechniken beigebracht und war mir eine kompetente und unschätzbare Hilfe im Labor. Vielen Dank für die unvergessliche Forschungszeit und die anhaltende Freundschaft.

Ich danke meiner Familie, die mich immer wieder motiviert und an mich geglaubt hat. Besonders meiner Mutter und meiner Schwester herzlichen Dank für die Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit.

Auch bedanke ich mich bei meinen Freunden, -namentlich vor allem bei Telja Pursche- die mich ermutigt haben, nicht aufzugeben und mich in vielen Angelegenheiten unterstützt haben.

IX Lebenslauf**PERSÖNLICHE DATEN**

Name	Osthues, Ines
Geburtsdatum	24.07.1982

BERUFLICHER WERDEGANG

Seit 04/2009	Assistenzärztin in der Inneren Medizin im Maria-Josef Hospital in Greven
--------------	--

HOCHSCHULSTUDIUM

10/2008	Staatsexamen (zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung)
08/2007 – 07/2008	Praktisches Jahr (PJ)
Seit 2005	Doktorandin an der Klinik für Kinder – und Jugendmedizin an der Universität zu Lübeck
2004 – 2008	Studium der Medizin an der Universität zu Lübeck, klinischer Teil
08/2004	Physikum (Ärztliche Vorprüfung)
2002 – 2004	Studium der Medizin an der Universität zu Lübeck, Vorklinik

SCHULABSCHLUSS

2002	Abitur am Gymnasium Laurentianum in Warendorf
------	---