

6. Diskussion:

Die Pathomechanismen, die zur besonderen Vulnerabilität Frühgeborener gegenüber Infektionen führen, sind nur zum Teil bekannt.

Die häufig perakuten Verläufe, insbesondere der gramnegativen Sepsis bei Neugeborenen, lassen darauf schließen, dass ein wesentliches Defizit der primären unspezifischen Immunantwort vorliegt.

In dieser Arbeit wurde die Aktivierbarkeit von PNG und Monozyten durch LPS bei Neugeborenen untersucht mit einem besonderen Augenmerk auf den Membranrezeptor CD14, der eine zentrale Rolle in der primären unspezifischen Immunantwort hat.⁴⁹⁻⁵¹

Es stellte sich heraus, dass die PNG und Monozyten Frühgeborener bei Exposition gegenüber Endotoxin eine deutlich verminderte Stimulierbarkeit im Vergleich zu Reifgeborenen und Erwachsenen zeigten. Im Speziellen wurde gezeigt, dass insbesondere bei Frühgeborenen zwei wichtige antibakterielle Effektorfunktionen, nämlich die Expression von CD11b und die Sezernierung von Neutrophilen Elastase (PML-Elastase), durch LPS nur gering stimuliert werden.

Expression der Membranrezeptoren CD14 und CD11b. Die Expression von CD14 war sowohl auf ruhenden als auch auf LPS stimulierten PNG Frühgeborener verringert. Die Expression des Membranrezeptors CD14 wurde in dieser Arbeit untersucht, weil er zusammen mit einem oder mehreren Toll-like Rezeptoren und dem MD2-Adapterprotein für die LPS Bindung auf PNG und deren anschließende Aktivierung verantwortlich ist^{25,52-56}. Eindeutig belegt werden konnte die Bedeutung von CD14 durch Untersuchungen an CD14 knock-out Mäusen und an Mäusen, die humanes CD14 exprimieren (hCD14 transgenic mice). Die Leukozyten von Mäusen, die kein CD14 exprimierten, konnten kaum durch LPS stimuliert werden, wohingegen die Leukozyten von Mäusen mit einer hohen Expressionsdichte von humanem CD14 mit einer deutlich erhöhten Mortalität auf LPS Stimulation reagierten, verglichen mit den Wildtypmäusen^{57,58}.

Darüber hinaus wurde der Membranrezeptor CD11b untersucht, weil er ein wichtiges Effektormolekül auf der PNG Oberfläche ist und weil seine Expression auf

der Zelloberfläche nach Aktivierung von PNG zunimmt. CD11b ist ein β 2-Integrin, das zahlreiche Funktionen bei der Abwehr von Infektionen übernimmt. Es vermittelt die Anhaftung von PNG an den Gefäßwänden, die Extravasation von PNG, die Aufnahme mikrobieller Artikel und die Aktivierung von Phagozyten. Die CD11b Expression auf ruhenden und mit LPS stimulierten PNG von Frühgeborenen war verringert.

Zur Expressionsdichte von CD11b bei Neugeborenen gibt es widersprüchliche Ergebnisse. Sowohl geringere als auch gleiche Expressionsdichte von CD11b wurden für Frühgeborene im Vergleich zu Reifgeborenen beschrieben⁵⁹⁻⁶³. Jedoch gab es bisher keine Daten, die in einem Vollblutassay und Frühgeborene mit einem Gestationsalter unter 32 SSW gemessen wurden. Die hier vorgestellten Ergebnisse stehen im Widerspruch zu einigen bisher veröffentlichten Arbeiten^{59,60} und verdeutlichen den Vorteil eines Vollblutassays gegenüber Messungen an isolierten Zellkulturen. Alle vorherigen Arbeiten zur CD11b Messung wurden an isolierten Zellkulturen gemacht. Rebuck⁶⁴ konnte jedoch zeigen, dass die Zellisolation durch einen Dichtegradienten die Expressionsdichte von CD11b auf Reifgeborenen PNG wesentlich stärker reduziert als auf adulten Zellen. Die einzig verfügbare Studie, die ebenfalls einen Vollblutassay verwendete und keinen Unterschied zwischen Frühgeborenen und Reifgeborenen beobachtete, hat Frühgeborenen bis zu einem Gestationsalter von >36 SSW eingeschlossen. Diese Kinder sind nicht mit den von uns untersuchten, wesentlich unreiferen Frühgeborenen zu vergleichen. Ein Nachteil des Vollblutassays bei Frühgeborenen ist allerdings, dass sich die einzelnen Zellpopulationen nur unzureichend voneinander abgrenzen lassen. Insbesondere die Monozyten lassen sich im FSC/SSC nur schwer von den interferierenden Normoblasten unterscheiden. Deshalb benutzten wir bei der Messung der CD14 Expression auf Monozyten die Methode des Rück-Gatings (siehe Methodenteil). Dadurch wurden die Monozyten eindeutig erfasst, allerdings nur die, die CD14 exprimierten. Die kleine Population CD14-negativer Monozyten⁶⁵ wurde also in dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

Regulation der CD11b Expression. Die CD11b Expression wird über die Bindung von LPS an CD14 stimuliert, aber es gibt auch eine CD14 unabhängige Regulation

der CD11b Expression. Es konnte in dieser Arbeit eindeutig gezeigt werden, dass auch bei Reifgeborenen die CD11b Expression durch LPS Bindung an CD14 erhöht wird, denn die Blockade von CD14 auf reifgeborenen PNG verhinderte die Hochregulation von CD11b durch LPS bei Reifgeborenen wie bei Erwachsenen. CD14 ist also auch bei Reifgeborenen entscheidend für die Regulation der CD11b Expression. Daher lässt sich vermuten, dass die verringerte CD14 Expression bei Frühgeborenen mitverantwortlich sein könnte für die geringe Stimulierbarkeit von CD11b durch LPS.

Aber auch die CD14 unabhängige Regulation der CD11b Expression ist bei Frühgeborenen beeinträchtigt. Die CD14 unabhängige Stimulation mit TNF α oder dem bakteriellen Peptid FMLP führte nur zu geringen Anstiegen von CD11b. TNF α und FMLP induzieren eine Vielzahl von PNG Funktionen, wie Degranulation, oxidativer „Burst“, Chemotaxis⁶⁶. Die geringe CD14 unabhängige Induzierbarkeit der CD11b Expression deutet darauf hin, dass auch die Signalübertragung parallel zu oder hinter CD14 bei Frühgeborenen verändert ist. Außerdem wurde gezeigt, dass die Stimulation mit PMA nicht nur geringe Auswirkungen auf die CD11b Expression bei Frühgeborenen hatte, sondern auch bei Reifgeborenen. PMA wirkt wie der physiologische second messenger Diacylglycerol und aktiviert direkt die Proteinkinase C (PKC). Die geringe Stimulierbarkeit neonataler PNG durch PMA könnte also die Folge einer geringeren Proteinkinase C Aktivität sein. Dies wäre in Zusammenhang mit dem erhöhten Risiko einer B-Streptokokken Infektion von Reifgeborenen ein wichtiger Hinweis, da eine geringe PKC Aktivität das intrazelluläre Überleben von B-Streptokokken begünstigt.

Messung der PML-Elastase im Serum. Als einen weiteren Indikator für die PNG Aktivität wurde die PML-Elastase bestimmt, eine stark wirksame Serumprotease, die in der azurophilen Granula von PNG gespeichert wird und essentiell für die Zellmigration ist. PML-Elastase wird nur von PNG sezerniert⁶⁷⁻⁶⁹. Bisher gab es keine Daten zur Sekretion von PML-Elastase im Serum Frühgeborener. Die Konzentration von PML-Elastase im Serum Frühgeborener lässt sich durch die Stimulation mit LPS nicht steigern. Im Serum Reifgeborener steigt die Konzentration nach Stimulation an, ist jedoch niedriger als bei Erwachsenen. Auch andere Proteine, die aus den azurophilen Granula stammen und in der inflammatorischen

Primärantwort eine Rolle spielen, wie das bactericidal/permeability increasing protein (BPI), sind bei Neugeborenen erniedrigt⁷⁰.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass PNG von sehr unreifen Frühgeborenen von LPS nur schwach stimuliert werden. Dies könnte zum Teil an einer reduzierten Expression von CD14 auf der Zelloberfläche liegen, das die LPS Bindung mitvermittelt, aber auch an der Unreife CD14-unabhängiger Regulationsmechanismen. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass eine Defizienz in der primären unspezifischen Immunantwort Frühgeborener vorliegt, die sie besonders anfällig für systemische bakterielle Infektionen macht.