

Aus der Klinik für Geburtsmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Quantitative mRNA-Bestimmung von Zytokinen aus  
mononukleären Nabelschnurblutzellen nach Geburten von  
Schwangeren mit Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom  
mittels real-time TaqMan RT-PCR

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jens Stupin

aus Dresden

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. U. Büscher  
2. Priv.-Doz. Dr. med. A. Luttkus  
3. Prof. Dr. med. A. Plagemann

Datum der Promotion: 03.09.2010

Meinen Eltern

Ob nicht Natur zuletzt sich doch ergründe?

J. W. von Goethe

<b>Inhalt</b>	<b>Seite</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Amnioninfektionssyndrom</b>	<b>8</b>
<b>1.2 Histologische Chorioamnionitis</b>	<b>14</b>
<b>1.3 Neonatale Infektion</b>	<b>17</b>
<b>1.4 Zytokine</b>	<b>21</b>
1.4.1 Allgemein	21
1.4.2 Inflammatorische Zytokine	24
1.4.3 Anti-inflammatorische Zytokine	26
1.4.4 Rolle der Zytokine beim Amnioninfektionssyndrom	27
1.4.5 Rolle der Zytokine bei neonataler Infektion	28
<b>1.5 Fragestellung und Zielsetzungen der Arbeit</b>	<b>29</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>33</b>
<b>2.1 Patientenkollektiv</b>	<b>33</b>
<b>2.2 Untersuchung der Blutproben</b>	<b>35</b>
2.2.1 Lyse und Entfernung der Erythrozyten aus Vollblut	35
2.2.2 Isolation totaler RNA aus Vollblut	36
2.2.3 Synthese der cDNA (komplementäre DNA)	37
2.2.4 Polymeraseketten-Reaktion (PCR)	38
2.2.4.1 Prinzip der PCR	38
2.2.4.2 Praktischer Ablauf der PCR	42
2.2.4.3 Nachweis und Untersuchung des Amplikons	46
<b>2.3 Datenauswertung und statistische Analyse</b>	<b>49</b>
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>50</b>
<b>3.1 Rahmendaten des Gesamtkollektivs</b>	<b>50</b>
3.1.1 Schwangere	50
3.1.1.1 Parameter des Amnioninfektionssyndroms bei den Schwangeren der Risikogruppe	51

	Seite	
3.1.2	Neugeborene	51
3.1.2.1	Parameter des Amnioninfektionssyndroms bei den Neugeborenen der Risikogruppe	52
3.1.2.2	Daten der Neugeborenen mit early-onset Infektion	53
3.1.3	Plazentahistologie	53
3.1.3.1	Neonatale Infektion und Plazentahistologie	54
<b>3.2</b>	<b>Vergleich der Studiengruppen</b>	<b>54</b>
3.2.1	Schwangere	54
3.2.2	Neugeborene	57
3.2.3	Plazentahistologie	58
<b>3.3</b>	<b>mRNA-Bestimmung der inflammatorischen und anti-inflammatorischen Zytokine</b>	<b>59</b>
3.3.1	Vergleich der Studiengruppen	59
3.3.1.1	Inflammatorische Zytokine	59
3.3.1.2	Anti-inflammatorische Zytokine	61
3.3.2	Vergleich infizierter und nicht infizierter Neugeborener in der Risikogruppe	62
3.3.2.1	Inflammatorische Zytokine	62
3.3.2.2	Anti-inflammatorische Zytokine	64
3.3.3	Vergleich histologische Chorioamnionitis und Normalbefunde in der Risikogruppe	65
3.3.3.1	Inflammatorische Zytokine	65
3.3.3.2	Anti-inflammatorische Zytokine	67
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>68</b>
4.1	<b>Anwendung der real-time TaqMan RT-PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression der Zytokine</b>	<b>70</b>
4.2	<b>Rolle der inflammatorischen und anti-inflammatorischen Zytokine bei Verdacht auf Amnioninfektionssyndrom</b>	<b>73</b>

	Seite	
<b>4.3</b>	<b>Rolle der inflammatorischen und anti-inflammatorischen Zytokine bei Neugeborenen mit early-onset Infektion</b>	78
4.3.1	Rolle der inflammatorischen Zytokine	79
4.3.2	Rolle der anti-inflammatorischen Zytokine	82
<b>4.4</b>	<b>Rolle der inflammatorischen und anti-inflammatorischen Zytokine bei histologischer Chorioamnionitis</b>	84
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	89
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	91
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	111
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	113
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	114
<b>10</b>	<b>Publikationen</b>	116
<b>11</b>	<b>Erklärung</b>	118

# 1 Einleitung

## 1.1 Amnioninfektionssyndrom

Das Amnioninfektionssyndrom stellt eine Gefährdung von Mutter und Kind bei unspezifischer Infektion der Fruchthöhle mit dem gemeinsamen Substrat der Amnionitis und Chorioamnionitis dar. Es kommt selten bei stehender Fruchtblase vor (Dudenhausen, 2001, Romero et al., 2006). Als klinisches Krankheitsbild wurde es erstmals 1959 durch Blanc beschrieben.

Bei 0,1 bis 4 % aller Geburten tritt ein Amnioninfektionssyndrom auf, besonders häufig bei Frühgeburten und nach vorzeitigem Blasensprung (Gilstrap et al., 1988, Gibbs und Duff, 1991, Wendel et al., 1994, Briese, 1999). In 2 % aller Schwangerschaften kommt es zum vorzeitigem Blasensprung, wovon 20 – 40 % vor 37 vollendeten Schwangerschaftswochen auftreten (Romero et al., 2006). Bei Frühgeburten mit vorzeitigem Blasensprung und Wehen besteht ein 10-fach erhöhtes Risiko, ein Amnioninfektionssyndrom zu entwickeln (Romero et al., 2007a).

Synonym wird auch der Begriff Chorioamnionitis gebraucht. Zur Präzisierung ist es vor allem in der englischsprachigen Literatur üblich, zwischen klinischer und histologischer Chorioamnionitis zu unterscheiden (Smulian et al., 1999a, Newton, 2005). Diese Unterscheidung wird auch in der vorliegenden Arbeit angewandt. Während die Diagnose des Amnioninfektionssyndroms klinisch gestellt wird, handelt es sich bei einer histologischen Chorioamnionitis um eine histopathologische, retrospektive Diagnose durch Untersuchung der Plazenta, der fetalen Membranen und der Nabelschnur (Edwards, 2005).

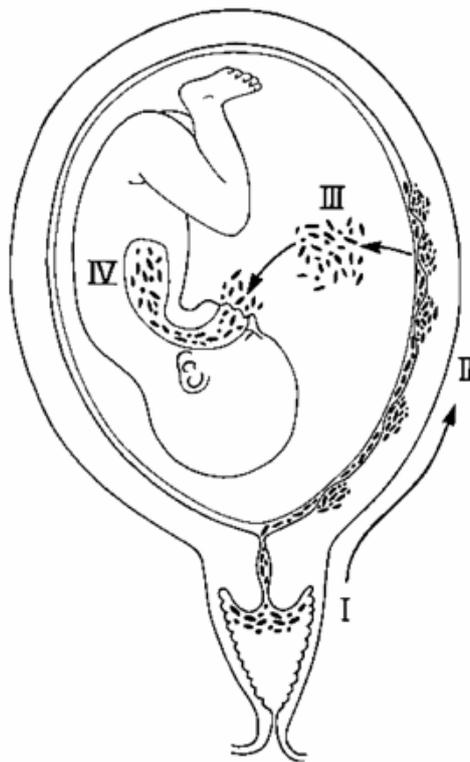
Der häufigste Entstehungsweg ist die ascendierende Infektion nach vorzeitigem Blasensprung und eröffneter Zervix (Romero und Mazor, 1988, Dudenhausen, 2001). Dabei wird die Amnionhöhle mit fakultativ pathogenen Erregern der Vaginalflora besiedelt. Diese bakterielle Infektion von Fruchtwasser, Eihäuten und Plazenta wird durch gramnegative Stäbchen, wobei vor allem *Escherichia coli* dominieren, daneben auch durch *Streptococcus faecalis*,  $\beta$ -hämolyisierende Streptokokken der Gruppe B, *Staphylococcus aureus*, *Chlamydia trachomatis*, *Bacteroides sp.*, *Gardnerella vaginalis* und *Myco-*

*plasma hominis* hervorgerufen (Romero und Mazor, 1988, Briese, 1999). *Escherichia coli* und  $\beta$ -hämolyisierende Streptokokken der Gruppe B werden für über 60 % der maternalen und neonatalen Bakteriämien verantwortlich gemacht (Gibbs und Duff, 1991). Bei der bakteriellen Vaginose kommt es durch die lokale Infektion im Bereich der Zervix zur Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub> und zur Freisetzung der Arachidonsäure und damit zur endogenen Prostaglandinsynthese mit nachfolgender Zervixreifung und Wehen. Eine wichtige Rolle spielen dabei Zytokine wie die Interleukine IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$ , die über die Phospholipase A<sub>2</sub> freigesetzt werden (Romero et al., 2007b).

Selten tritt eine Infektion der Amnionhöhle bei intakter Fruchtblase, hervorgerufen besonders durch Streptokokken der Gruppe B, auf. Als Folge der primären Infektion kommt es dann durch die endogene Prostaglandinsynthese zu Zervixreifung, Beginn von Wehen und vorzeitigem Blasensprung (Briese, 1999). Etwa 10 – 20 % aller Schwangeren mit vorzeitigem Wehen und intakten fetalen Membranen zeigen ein subklinisches Amnioninfektionssyndrom, bei dem sich Bakterien im Fruchtwasser nachweisen lassen (Baumann und Romero, 1995, Romero et al., 2003). Die Infektion der Amnionhöhle bei intakter Fruchtblase kann aber auch Folge einer transplazentaren hämatogenen Streuung infolge einer maternalen Bakteriämie, speziell bei Infektionen mit *Listeria monocytogenes*, sein (Silver, 1998) oder auf iatrogene Keimverschleppung in das Fruchtwasser, z. B. durch eine Amniozentese, zurückgehen (Romero et al., 2007b).

Einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis der Pathogenese des Amnioninfektionssyndroms hat die Arbeitsgruppe um Roberto Romero geleistet (Romero und Mazor, 1988, Romero et al., 2003, Romero et al., 2006). Sie schlägt ein 4-Stadien-Konzept vor, das zu einer intraamniotischen Infektion führt (Abbildung 1). Im Stadium I kommt es zu einer Vermehrung fakultativ pathogener oder dem Auftreten von pathogenen Bakterien in der Vagina bzw. Zervix und damit zu einer Veränderung der normalen Flora, z. B. bei einer bakteriellen Vaginose. Mit einem vorzeitigem Blasensprung oder einer Zervixöffnung tritt eine aufsteigende Infektion auf. Die Mikroorganismen bekommen Zugang zur Dezidua (Stadium II). Wenn diese Erreger über Chorion und Amnion in die Amnionhöhle eindringen, kommt es zum Stadium III. Es kann auch eine Besiedlung fetaler Gefäße auftreten. Da die Mikroorganismen auch intakte Eihäute durchdringen können, ist ein vorzeitiger Blasensprung keine Voraussetzung für eine intraamniotische Infektion. Im Stadium IV erhalten die im Fruchtwasser befindlichen Erreger Zugang zum

Feten durch Aspiration oder direkten Kontakt. Neonatales Atemnotsyndrom, kongenitale Pneumonien, Konjunktividen oder Otitiden resultieren. Weiterhin können systemische Infektionen und Sepsis, resultierend in bronchopulmonaler Dysplasie oder periventrikulärer Leukomalazie, die Folge der Ausbreitung im Feten sein.



**Abb. 1:** Stadien der intraamniotischen Infektion (Romero und Mazor, 1988, Romero et al., 2003)

**Stadium I:** Veränderung der normalen vaginalen und zervikalen Bakterienflora, bakterielle Vaginose

**Stadium II:** Aszendierende Infektion, Zugang der Bakterien zur Dezidua (Deziduitis)

**Stadium III:** Intraamniotische Infektion (Amnionitis)

**Stadium IV:** Aspiration der Erreger durch den Fetus (Pneumonien, Sepsis)

Dieses Stadium höchster Gefahr für den Feten wird auch als „fetal inflammatory response syndrome“ (FIRS) bezeichnet (Gomez et al., 1998). Dieser Begriff wurde bewusst als das fetale Pendant zum „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) gewählt, das eine Infektion im zirkulierenden Blut Erwachsener (Sepsis) mit Fieber, Ta-

chykardie, Hyperventilation und Leukozytose infolge der Wirkungen von Zytokinen wie IL-6 und anderen proinflammatorischen Mediatoren darstellt (Levy et al., 2003). Auch das FIRS wurde anhand eines erhöhten IL-6 ( $> 11$  pg/ml), allerdings im fetalen Blut, definiert (Gomez et al., 1998).

Risikofaktoren für die Entwicklung eines Amnioninfektionssyndroms sind eine lange Zeitspanne zwischen Blasensprung und Geburt ( $> 12$  Stunden), aber auch die Ableitung der fetalen Herztöne über eine Kopfschwartenelektrode, eine hohe Anzahl vaginaler Untersuchungen sub partu, Nulliparität und das Vorhandensein einer bakteriellen Vaginose mit pH-Werten über 4,7 (Müller und Kubli, 1975, Soper et al., 1989, Seaward et al., 1997, Briese, 1999).

Die Diagnose eines Amnioninfektionssyndroms ist schwierig zu stellen. Klinische Zeichen können bei der Mutter eine Temperatursteigerung ( $> 38$  °C), eine Leukozytose ( $> 15\ 000$ /nl) mit Linksverschiebung, eine Erhöhung des C-reaktiven Proteins (CrP) ( $> 0,8$  mg/dl), eine Tachykardie, ein druckschmerzhafter Uterus und Abgang von foetidem Fruchtwasser sein. Beim Feten kann eine Tachykardie ( $> 160$  spm) mit Oszillationsverlust auftreten (Gibbs et al., 1982, Duff et al., 1983, Wendel et al., 1994, Romero et al., 2006, Romero et al., 2007b). Wegweisend für die klinische Diagnose sind tägliche Kontrollen der Körpertemperatur, des CrP, des Blutbildes und des CTG. Das mütterliche Fieber bei einem Amnioninfektionssyndrom kommt in 85 bis 100 % der Fälle vor und stellt somit den am meisten konstanten Parameter und einzigen zuverlässigen Indikator für die Diagnose dar (Wendel et al., 1994, Smulian et al., 2003). Gibbs und Duff (1991) definierten als Grenze für ein Amnioninfektionssyndrom eine orale Temperatur  $\geq 37,8$  °C. Petrova et al. (2001) untersuchten mehr als 11 Millionen Geburten aus der Datenbank des National Center for Health Statistics der USA. Bei 1,6 % der Schwangeren fanden sie Fieber unter der Geburt. Es erwies sich als starker Prädiktor eines Todes infolge Infektion bei Früh- und Reifgeborenen. Gibbs et al. (1982) wiesen eine Leukozytose bei 63 % der Schwangeren mit einem Amnioninfektionssyndrom nach. Im Vergleichskollektiv nicht infizierter Schwangerer lag nur bei 21 % eine Leukozytose vor. Der positiv prädiktive Wert einer Leukozytose beträgt 43 % bei einer Sensitivität von nur 29 % (Newton, 2005). Das CrP ist ein nicht spezifischer Marker für eine Infektion. Es handelt sich um ein Protein, das von der Leber als Antwort auf einen inflammatorischen Prozess produziert wird. In verschiedenen Studien wird seine Sensitivität bei einer Er-

höhung auf  $> 2$  mg/dl mit bis zu 86 %, die Spezifität zwischen 29 - 96 % angegeben (Azizia et al., 2006). Ein normales CrP trat bei 18 % der Frauen mit einem Amnioninfektionssyndrom auf (Edwards, 2005). Die häufigste CTG-Veränderung, die bei einem Amnioninfektionssyndrom gesehen wird, ist die fetale Tachykardie. Gibbs und Duff (1991) fanden in 67 % aller überwachten Feten eine Tachykardie. Wendel et al. (1994) evaluierten ebenfalls den Effekt eines Amnioninfektionssyndroms auf die betroffenen Feten und wiesen in 73 % eine Tachykardie nach, davon eine schwere Tachykardie ( $> 180$  spm) in 17 %.

Therapeutische Entscheidungen werden zumeist aus einer Kombination von pathologisch veränderten allgemeinen laborchemischen Befunden der Schwangeren wie CrP und Leukozytenzahl und klinischen Parametern wie maternale Temperatur, fetale Herzfrequenz sowie vorzeitige Wehen und schmerzhafter Uterus abgeleitet. Trotz des Vorliegens dieser Laborbefunde und Symptome kann man nicht sicher auf das Vorhandensein einer Infektion des Feten und nachfolgend des Neugeborenen schließen (Romero et al., 2006). Der Nachteil aller klinischen Zeichen und Symptome, wenn sie überhaupt auftreten, ebenso der Laborbefunde beim Amnioninfektionssyndrom ist, dass sie weder ausreichend spezifisch noch sensitiv sind (Romero und Mazor, 1988, Romero et al., 2006). Deshalb ist vor allem eine frühe Diagnose häufig schwierig. So führt die Gabe von Kortison zur Lungenreifeförderung bei Frühgeburtlichkeit zu einer maternalen Leukozytose (Denison et al., 1997). Früh auftretende Symptome wie maternales Fieber, maternale und fetale Tachykardie können auch durch andere ante- und intrapartale Komplikationen bedingt sein. Unspezifische Infektionen, wie Atemwegs- oder Harnwegsinfektionen, können bei der Mutter Fieber oder eine Tachykardie auslösen und zu einer Erhöhung des CrP führen. Eine maternale Tachykardie kann aber auch durch eine Hypotension, Dehydratation, Medikamente (z. B.  $\beta$ -Sympathomimetika) oder Epiduralanästhesie verursacht werden (Herbst et al., 1995, Lieberman et al., 1997). Eine fetale Tachykardie kann durch Medikamente, Arrhythmien oder Frühgeburtlichkeit ausgelöst werden. Ein druckschmerzhafter Uterus oder foetides Fruchtwasser entwickeln sich im Verlaufe der Infektion häufig sehr spät oder überhaupt nicht (Briese, 1999, Romero et al., 2007b).

Die Therapie des manifesten Amnioninfektionssyndroms besteht neben der Gabe von Antibiotika in der Beendigung der Schwangerschaft, um eine Gefährdung von Mutter

und Fet zu vermeiden (Gilstrap et al., 1988, Newton, 2005). Beim vorzeitigen Blasensprung vor 34 vollendeten Schwangerschaftswochen ist das Risiko durch ein Amnioninfektionssyndrom gegen das Risiko der Frühgeburtlichkeit abzuwägen. Da hier zunächst schwangerschaftserhaltend mit Gabe von Antibiotika therapiert werden sollte, ist ein frühzeitiges Erkennen des Amnioninfektionssyndroms unerlässlich, da eine Schwangerschaftsverlängerung unter Antibiose dem Feten mehr Gefahren als Nutzen bringt (Dudenhausen, 2001, Newton, 2005). So konnte in Tierversuchen gezeigt werden, dass Kaninchenfeten mit einem experimentell induzierten Amnioninfektionssyndrom bei Schwangerschaftsverlängerung unter Antibiotikatherapie häufiger Läsionen im Bereich der weißen Hirnsubstanz aufwiesen (Yoon et al., 1997, Bashiri et al., 2006).

Neuere Studien an insgesamt mehr als 700 Frauen zeigen keinen einzigen Todesfall infolge eines Amnioninfektionssyndroms (Gilstrap et al., 1988, Wendel et al., 1994, Rouse et al., 2004, Romero et al., 2006). Demgegenüber steht eine nach wie vor erhöhte fetale Mortalität. Gilstrap et al. (1988) konstatierten 2 % Totgeburten bei 273 durch Amnioninfektionssyndrom komplizierte Schwangerschaften jenseits der 34. SSW. Die perinatale Mortalität und das Risiko, eine Sepsis oder Pneumonie zu entwickeln, sind unter Reifgeborenen von Schwangeren mit Amnioninfektionssyndrom deutlich geringer als unter Frühgeborenen. Obwohl die neonatale Mortalität infolge eines Amnioninfektionssyndroms erhöht ist, ist es schwierig, Todesfälle durch Infektion von solchen durch Frühgeburtlichkeit zu trennen. Eine der wenigen Studien, die dies versucht, zeigt 23 % neonatale Todesfälle (9/39 Neugeborene) unter der 35. SSW verglichen mit keinem Todesfall (0/239 Neugeborene) über der 35. SSW von Schwangeren mit Amnioninfektionssyndrom. Keines der Frühgeborenen starb infolge einer Sepsis (Gilstrap et al., 1988). Wendel et al. (1994) fanden in einem Vergleich von 80 Neugeborenen, die innerhalb von 2 Stunden, mit 18 Neugeborenen, die innerhalb von 6 bis 12 Stunden nach Blasensprung geboren wurden, keinen Anstieg der Morbidität im Hinblick auf Apgarwerte, Nabelarterien-pH oder Auftreten einer Sepsis. Den Hintergrund dieser Zeitspanne deckten Pinell et al. (1993) auf, die eine Vermehrung gram-positiver aerober Bakterien (Streptokokken), gram-negativer anaerober Bakterien (*Bacteroides sp.*) und *Escherichia coli* im Fruchtwasser von  $10^2$  auf mehr als  $10^6$  Bakterien/ml innerhalb von 12 Stunden nachwiesen. Eine erhöhte infektionsbedingte neonatale Morbidität zeigt sich bei den Neugeborenen vor allem durch eine postnatale bakterielle Infektion mit respiratorischer Adaptationsstörung und in 20 bis 40 % der Fälle in schwerer Verlaufsform durch eine

Sepsis mit Pneumonie und Meningitis, die innerhalb der ersten drei Lebenstage (early-onset) manifest wird, sowie in einer Zerebralparese als Langzeitfolge einer perinatalen Infektion (Yoon et al., 2000, Bashiri et al., 2006).

Die Mutter ist intrapartal durch eine disseminierte intravasale Gerinnungsstörung (DIC) sowie postpartal durch eine Puerperalinfection mit Endometritis, Endomyometritis, Adnexitis puerperalis oder Sepsis gefährdet (Briese, 1999, Dudenhausen, 2001, Rouse et al., 2004, Romero et al., 2006). Müller und Kubli (1975) sahen einen deutlichen Anstieg der Infektionsmorbidity nach 12 - 24 Stunden Latenz zwischen Blasensprung und Geburt als kritische Grenze für ein Eingreifen an. Etwa ein Drittel aller Frauen mit einem Amnioninfektionssyndrom entwickeln eine postpartale Infektion. Außerdem wird ein erhöhtes Risiko für eine sekundäre Sectio caesarea beschrieben (Duff et al., 1983, Satin et al., 1992). Satin et al. (1992) beschrieben eine höhere Rate an sekundären Sektionen (40 % vs. 9 %), wenn die Diagnose des Amnioninfektionssyndroms gestellt wurde, nachdem mit einer Einleitung durch Oxytocin begonnen wurde.

## **1.2 Histologische Chorioamnionitis**

Die histologische Chorioamnionitis ist definiert durch ein Vorkommen polymorphkerniger Leukozyten in der Plazenta und den Membranen. Diese entzündlichen Veränderungen können grundsätzlich in zwei Formen eingeteilt werden, die Entzündung vom Amniontyp und die Entzündung vom parenchymatösen Typ (Blanc, 1959, Benirschke, 1990, Vogel, 1996, Redline, 2006).

Die Entzündung vom Amniontyp, bei der polymorphkernige neutrophile Granulozyten das Bild beherrschen, betrifft das Amnion, die Chorionplatte und/oder die Nabelschnur. Sie wird als (histologische) Chorioamnionitis bezeichnet. Sie entsteht durch eine Keimaszension aus dem Vaginaltrakt mit anschließender leukozytärer Infiltration der extraplazentaren Membranen, später auch der Plazenta (Romero et al., 1992a, Vogel, 1996). Demgegenüber sind bei der Entzündung vom parenchymatösen Typ der Zwischenzottenraum und die Zotten durch intervillöse Thrombangiitis, Perivillitis und Villitis betroffen. Ist die Plazentitis vom parenchymatösen Typ infektiöser Genese, handelt es sich in den meisten Fällen um eine hämatogene Streuung bei systemischer Infektion des mütterlichen Organismus mit primärer Absiedlung mütterlicher Krankheitserreger im

Zwischenzottenraum. Die hämatogen bedingte Infektion manifestiert sich an den placentaren Zotten, nicht aber den fetalen Membranen (Benirschke, 1990, Vogel, 1996). Eine histologische Chorioamnionitis kann aber auch durch nicht infektiöse reaktive Prozesse wie fetale Hypoxie, Veränderungen des Fruchtwasser-pH oder mekoniumhaltiges Fruchtwasser hervorgerufen werden (Vogel, 1996). So lassen sich Mikroorganismen nur in 70 % der Plazenten mit Chorioamnionitis nachweisen (Svensson et al., 1986).

In Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Untersuchungskollektivs und von der Definition einer histologischen Chorioamnionitis wurde deren Häufigkeit bei Lebendgeborenen in unselektierten Untersuchungsreihen mit 5 bis 57 % angegeben (Vogel et al., 1984, Benirschke, 1990, Redline, 2006). Die entscheidende Rolle bei der Häufigkeitsverteilung spielt das Gestationsalter. Bei Frühgeburten vor 34 vollendeten SSW wird eine Chorioamnionitis wesentlich häufiger nachgewiesen als bei Termingeburten (Guzick und Winn, 1985, Gibbs und Duff, 1991, Vogel, 1996). Am Termin beträgt die Prävalenz der histologischen Chorioamnionitis 10 – 20 % (Edwards, 2005, Redline, 2006), bei Frühgeburten mehr als 50 % (Edwards, 2005). Guzick und Winn (1985) fanden in einer Untersuchung an 2 774 Plazenten eine histologische Chorioamnionitis in 19 % aller Geburten am Termin und in mehr als 33 % der Frühgeburten.

Die histologische Chorioamnionitis wird nach der Lokalisation bzw. der Ausdehnung der Veränderungen in der Fruchthöhlenwand unter der Vorstellung einer in Phasen ablaufenden Entzündung eingeteilt. Nach der Lokalisation unterscheidet man eine Entzündung in der Eihaut (Amnionitis), der Plazenta (choriale Plazentitis mit/ohne Gefäßbeteiligung) und der Nabelschnur (Funikulitis).

Nach dem Stadium der Ausdehnung lassen sich nach Vogel (1996) drei Entzündungsbilder - Minimal-, Teil- und Vollbild einer Chorioamnionitis - voneinander unterscheiden:

- *Minimalbild*: Zellinfiltrate in Eihaut ohne Chorionplatte (basal)
- *Teilbild*: Zellinfiltrate in 2 Regionen, in Eihaut und/oder Chorionplatte (subamnial) und/oder Nabelschnur
- *Vollbild*: Zellinfiltrate in 3 Regionen, in Eihaut und Chorionplatte und Nabelschnur

Zusätzlich kann die Dichte der polymorphkernigen neutrophilen Leukozyteninfiltrate in gering, mittel und stark graduiert werden (Vogel, 1996):

- *Infiltratdichte gering*: einzelne Granulozyten (< 5) in einzelnen getrennten Blickfeldern
- *Infiltratdichte mittel*: mehrere Granulozyten in mehreren benachbarten Blickfeldern
- *Infiltratdichte stark*: viele Granulozyten in vielen Blickfeldern

Makroskopisch zeigen Chorionplatte und Eihaut eine charakteristisch schmutzig-graue bis gelbliche Trübung infolge eines granulozytenreichen Exsudats. Mikroskopisch wichtige Kennzeichen der infektiös bedingten Amnionentzündung sind der Amniotropismus der Granulozyten und der phasenmäßige Ablauf des Prozesses (Vogel, 1996, Khong et al., 2000). Die Erreger, die bei offener Fruchtblase von der Fruchthöhle auf die Amnionoberfläche gelangen, lösen einen leukotaktischen Reiz aus. Die histologische Untersuchung der Plazenta und der Eihäute zeigt typischerweise eine akute inflammatorische Reaktion, in der polymorphkernige neutrophile Leukozyten dominieren. Die mütterlichen Granulozyten reagieren zuerst, in dem sie extraplazentar aus den Gefäßen der Dezidua in Richtung Amnionoberfläche wandern. Intraplazentar sind Granulozyten im subchorialen Raum nachweisbar, die dann auf die Chorionplatte übergreifen. Die Mitreaktion des Feten zeigt sich im Auswandern fetaler Granulozyten aus den Gefäßen der Chorionplatte. Gemeinsam infiltrieren mütterliche und fetale Granulozyten dann die Chorionplatte, zerstören das Amnionepithel und dringen in die Fruchthöhle ein. Wenn die Wand der Nabelschnurgefäße mit fetalen Granulozyten durchsetzt ist, spricht man von einer vollständigen entzündlichen Reaktion (Benirschke, 1990, Vogel, 1996, Redline, 2006). Vor der 20. SSW sind die polymorphkernigen Leukozyten maternalen Ursprungs, später erfolgt die inflammatorische Antwort sowohl maternal als auch fetal (Sampson et al., 1997). Leukozyten im Chorion (Chorioamnionitis) sind maternalen Ursprungs. Werden Leukozyten im Fruchtwasser (Amnionitis) oder der Nabelschnur (Funikulitis) gefunden, sind sie fetalen Ursprungs. Grundsätzlich werden maternale Entzündungszellreaktionen früher und stärker gesehen als fetale (Romero et al., 1992a).

Die Häufigkeit einer histologisch nachgewiesenen Chorioamnionitis liegt weit über der Häufigkeit eines klinisch diagnostizierten Amnioninfektionssyndroms (Gibbs und Duff,

1991, Ohyama et al., 2002), aber auch der Prävalenz infizierter Neugeborener (Hillier et al., 1991, Seo et al., 1992). So wurde eine Chorioamnionitis basierend auf einer Leukozyteninfiltration in 11 bis 16 % aller Plazenten am Termin gefunden, während eine klinisch apparente Infektion, das Amnioninfektionssyndrom, nur bei 1 % der entsprechenden Schwangerschaften diagnostiziert wurde (Ohyama et al., 2002). Verschiedene Studien zeigten, dass nur in 10 bis 20 % der Fälle einer Chorioamnionitis auch ein Amnioninfektionssyndrom vorliegt (Lott, 1990, Smulian et al., 1999a). Umgekehrt konnten Smulian et al. (1999a) bei 139 Schwangeren mit dem Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom nur in 86 Fällen (61,9 %) diese klinische Diagnose auch histologisch bestätigen. Sie vermuteten, dass nicht inflammatorische Ursachen, wie z. B. Medikamente oder Epiduralanästhesie, für mütterliches Fieber oder Tachykardie und somit die falsche Verdachtsdiagnose verantwortlich waren. Betrachtet man allerdings nur das morphologische Vollbild einer Chorioamnionitis, lässt sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zum klinischen Bild eines Amnioninfektionssyndroms nachweisen (Lott, 1990).

### **1.3 Neonatale Infektion**

Die gefährlichste Infektion der Neugeborenen ist die neonatale Sepsis. Dabei handelt es sich um eine Allgemeininfektion durch Aussaat von Mikroorganismen, meist Bakterien, von einem Herd aus in die Blutbahn. Sie ist vor allem bei Frühgeborenen mit hoher Sterblichkeit verbunden (Obladen, 2001, Klein, 2005).

2 - 4 von 1 000 Lebendgeborenen erkranken an neonataler Sepsis (Baltimore, 2003). Die Mortalität liegt bei 5 bis 50 % (Klein, 2005). Die große Spannweite der Angaben zur Mortalität erklärt sich aus der Betrachtung unterschiedlicher diagnostischer Kriterien und Reifealtergruppen. Die Inzidenz der Sepsis steigt, je unreifer ein Neugeborenes ist (Baltimore, 2003).

Unterschieden werden eine Frühform (early-onset Infektion) mit foudroyantem Verlauf, die durch intrauterine Infektion entsteht und innerhalb der ersten drei Lebenstage auftritt und eine Spätform (late-onset Infektion), die häufig Folge einer nosokomialen Infektion durch Intensivtherapie ist und nach dem 3. Lebenstag manifest wird.

Die häufigste Ursache der früheinsetzenden Verlaufsform ist die Unfähigkeit von 10 % der B-Streptokokken-Trägerinnen, IgG-Antikörper zu bilden und an den Feten weiterzugeben. Dadurch wird die Adhäsion der B-Streptokokken an den Schleimhäuten des Kindes erleichtert (Broughton und Baker, 1983, Illuzzi und Bracken, 2006). Das Erregerspektrum speist sich aus dem Genitaltrakt und umfasst  $\beta$ -hämolisierende Streptokokken der Gruppe B, *Escherichia coli*, Enterokokken, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, Klebsiellen und Anaerobier. Die intrauterine Infektion erfolgt in den meisten Fällen durch Aszension dieser Erreger nach vorzeitigem Blasensprung bei Amnioninfektionssyndrom der Mutter, seltener hämatogen im Rahmen einer mütterlichen Bakteriämie. Ein weiterer Risikofaktor ist die Frühgeburtlichkeit (Schrag und Stoll, 2006).

Neugeborene und speziell Frühgeborene haben eine gesteigerte Empfindlichkeit für septische bakterielle Infektionen. Ursachen sind die verzögerte Reifung der spezifischen humoralen und zellulären Immunantwort der neonatalen B- und T-Zellen, eine nichteffektive Aktivierung des Komplementsystems und ein Defizit des myelopoetischen Systems (Strunk et al., 2004, Klein, 2005). Das Immunsystem reift erst nach der Geburt aus. Die zellvermittelte Immunität funktioniert weitgehend, hingegen sind Neugeborene bei der humoralen Abwehr auf die von der Mutter diaplazentar übertragenen IgG-Antikörper („Nestschutz“) angewiesen. Besonders ein Mangel an spezifischen IgG-Antikörpern führt zu einer Beeinträchtigung der opsoninabhängigen Phagozytose. Sie werden in der zweiten Hälfte des 3. Trimenons diaplazentar auf den Fetus übertragen. Deshalb haben insbesondere Frühgeborene unterhalb der 30. SSW noch unzureichende Serum-IgG-Konzentrationen. Aber auch reife Neugeborene können einen Antikörpermangel aufweisen, wenn der Mutter spezifische IgG-Antikörper gegen Erreger konnataler und neonataler Infektionen fehlen (Simister, 2003). Für eine effektive Abwehr bakterieller Infektionen ist ein funktionierendes phagozytäres System erforderlich. Besonders die Neutrophilen spielen dabei eine herausragende Rolle, was sich an gesteigerter Häufigkeit und Schweregrad von Infektionen zeigt, wenn deren Zahl vermindert oder Funktion gestört ist. Zum Zeitpunkt der Geburt ist das Abwehrsystem der Neutrophilen zwar vorhanden, aber dessen Funktion noch unreif und suboptimal (Scheponka und Infante, 1998). Dies zeigt sich in verzögerter Adhärenz, Chemotaxis und Phagozytose der Neutrophilen Neugeborener. Adhäsion und Migration der Neutrophilen und damit die Mobilisierung zu den Orten der bakteriellen Infektion sind vermindert

(Strunk et al., 2004). Außerdem besitzen die Neutrophilen Neugeborener ein selektives Defizit in der Produktion des bakteriziden permeabilitätssteigernden Proteins (bactericidal/permeability-increasing protein, BPI). Es bindet an bakterielle Polysaccharide und ist damit ein zentraler Effektor der antibakteriellen Aktivität gegen gramnegative Bakterien (Nupponen et al., 2002). So kann eine lokale Entzündung, insbesondere die neonatale Pneumonie, zum Ausgangspunkt einer Sepsis werden. Zusätzlich zeigen einige Früh- und Neugeborene eine verminderte Aktivität der klassischen und alternativen Komplement-Kaskade, die zu einer Beeinträchtigung der opsoninabhängigen Phagozytose beitragen kann. Eingeschränkt sind aber auch die T-Zell-vermittelte Zytotoxizität und die Synthese von INF- $\gamma$ . Dies führt zu einer suboptimalen Aktivierung neonataler Makrophagen im Verlauf eines Entzündungsgeschehens und kann zur Disseminierung zirkulierender Erreger führen (Kotiranta-Ainamo et al., 2004).

Die klinischen Symptome der Frühform der Sepsis sind uncharakteristisch und vielgestaltig. Oft ist es das „schlechte Aussehen“ des Neugeborenen, das an eine Infektion denken lässt. Wesentliche Symptome können sein: Temperaturinstabilität/Thermolabilität (Hyper-, Hypothermie), Atemstörungen (Apnoe, Tachypnoe, Dyspnoe), gastrointestinale Symptome (Trinkunlust bzw. -schwäche, Magenrest bzw. verzögerte Magenentleerung, Gedeihstörung, Erbrechen, aufgeblähtes Abdomen), zirkulatorische Insuffizienz (blassgraues Hautkolorit, marmorierte Haut, kalte Extremitäten, erhöhte Rekapillarierungszeit), neurologische Störungen (Apathie/Hyperexzitabilität, Krampfanfälle), Ikterus, Hepatosplenomegalie, Petechien, Purpura, Blutungsneigung sowie eine metabolische Azidose. Bei Frühgeborenen tritt die Frühform als Atemnotsyndrom oder Pneumonie, bei reifen Neugeborenen als Sepsis, Kreislaufzentralisation und Verbrauchskoagulopathie auf (Töllner, 1982, Gerdes, 1991, Obladen, 2001, Ng und Lam, 2006).

Wegweisend für die Früherkennung sind das Wissen um geburtshilfliche Risikofaktoren wie vorzeitiger Blasensprung und Amnioninfektionssyndrom sowie das Erkennen der genannten klinischen Symptome. Etwa zweistündlich sollten die Vitalparameter des Neugeborenen überwacht werden, um eine Temperaturerhöhung ( $> 37,5$  °C) oder -erniedrigung ( $< 36,5$  °C), eine Erhöhung der Atemfrequenz ( $> 60$ /min), eine Pulserhöhung ( $> 160$ /min) oder eine Verlängerung der Rekapillarierungszeit ( $> 2$  s) zu diagnostizieren. Verschiedene laborchemische Entzündungsparameter müssen als Warnzeichen

einer neonatalen Infektion betrachtet werden (Ng und Lam, 2006). Die Labordiagnostik bei Verdacht auf das Vorliegen einer neonatalen Sepsis kann eine Leukozytose ( $> 30\,000/\text{nl}$ ) oder Leukopenie ( $< 5\,000/\text{nl}$ ), eine erhöhte I/T (Immature/Total neutrophils = Gesamtzahl aller unreifen Granulozyten/Gesamtzahl aller Granulozyten)-Ratio ( $> 0,2$ ), eine CrP-Erhöhung ( $> 1\text{ mg/dl}$ ), eine Procalcitonin-Erhöhung ( $> 2,4\ \mu\text{l}$ ) oder eine IL-6-Erhöhung ( $> 25\text{ pg/ml}$ ) aufzeigen (Krediet et al., 1992, Assuma et al., 2000, Ng und Lam, 2006). Die höchste Sensitivität aller Parameter erreicht dabei das Zytokin IL-6 im neonatalen Blut mit 87 bis 100 %, das zudem auch frühzeitig ansteigt (Messer et al., 1996, Berner et al., 1998, Mehr und Doyle, 2000, Ng und Lam, 2006). Relativ spät, erst 6 - 12 Stunden nach Keiminvasion, ist mit einem Konzentrationsanstieg des CrP zu rechnen. Die Sensitivität des CrP bei Aufnahme von fraglich an einer Infektion erkrankten Neugeborenen schwankt zwischen 33 – 44 % bei einer Spezifität von 90 bis 96 % (Källman et al., 1999). Die CrP-Bestimmung hat deshalb für die Frühdiagnostik einer neonatalen Infektion nur einen geringen Wert. Trotzdem ist das CrP ein idealer Verlaufsparemeter (Ng und Lam, 2006).

Beweisend für eine Sepsis ist der Erregernachweis in Blut oder Liquor. Gelingt der kulturelle Erregernachweis trotz eindeutiger klinischer Symptome nicht, so spricht man von einer klinischen Sepsis. Da sich trotz optimaler Abnahme- und Kulturtechniken nur bei höchstens 20 % der aufgrund klinischer Symptome diagnostizierten neonatalen Septitiden eine positive Blutkultur findet, werden in der Literatur die Begriffe „Sepsis“ und „klinische Sepsis“ abgegrenzt (Obladen, 2001, Ng und Lam, 2006).

Die frühen klinischen Symptome einer Infektion des Neugeborenen sind unspezifisch, die Labordiagnostik ist schwierig und unsicher. Gleichzeitig ist ein sehr früher und konsequenter Behandlungsbeginn beim ersten klinischen Verdacht entscheidend wichtig, da die bakterielle Infektion des Neugeborenen rasch bis zum septischen Schock fortschreiten kann (Töllner, 1982, Klein, 2005). Die Therapie der Neugeborenen besteht aus lückenloser postnataler Überwachung, umfassender Infektionsdiagnostik und antibiotischer Behandlung. Eine antibiotische Therapie wird unter dem Verdacht auf das Vorliegen einer Sepsis meist frühzeitig begonnen und gegebenenfalls innerhalb von 48 bis 72 Stunden wieder beendet, wenn sich der Verdacht nicht bestätigt (Schrag und Stoll, 2006).

## 1.4 Zytokine

### 1.4.1 Allgemein

Die verschiedenen im Immunsystem wirkenden Moleküle haben zwei grundlegende Funktionen: Effektor- oder regulatorische Funktion. Die Effektorfunktion zeigt sich in der unmittelbaren Abwehr gegen pathogene Bakterien. Regulatorische Moleküle sind Immunzellhormone bzw. Zytokine. Sie regulieren den Verlauf der Immunantworten und steuern die Zusammenarbeit des Immunsystems mit anderen physiologischen Systemen des Organismus (Janeway und Travers, 2002, Volk et al., 2008).

Zytokine sind lösliche Glykoproteine mit einem geringen Molekulargewicht unter 80 kDa, die vor allem aus Zellen des Immunsystems freigesetzt werden und die in sehr niedrigen Konzentrationen über spezifische Rezeptoren wirken. Dadurch ändert sich die zelluläre mRNA, Proteinbiosynthesen werden ausgelöst und die Zellreaktion verändert (Janeway und Travers, 2002, Ferencik et al., 2006). 1969 führten Dumonde et al. den Begriff „Lymphokine“ ein, um damit „zellfreie lösliche Faktoren (verantwortlich für zellvermittelte immunologische Reaktionen), die während der Interaktion von Lymphozyten mit spezifischen Antigenen entstehen“, zu kennzeichnen. Der Begriff „Zytokine“ als umfassende Bezeichnung für Faktoren, die von Lymphozyten, Monozyten oder nicht lymphoiden Zellen gebildet werden, wurde erstmals 1974 von Cohen et al. vorgeschlagen.

Zytokine werden von den Zellen des natürlichen und des erworbenen Immunsystems als Antwort auf mikrobielle Pathogene gebildet. Helfer-T-Lymphozyten sind die Hauptproduzenten der Zytokine. T<sub>H</sub>1-Zellen, eine Subpopulation der T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>-Lymphozyten) sezernieren typischerweise die immunregulatorischen und inflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF- $\alpha$ , die an der zellvermittelten Immunantwort beteiligt sind. Im Ablauf einer Immunantwort bewirken die Zytokine die Gewebeentzündung und ermöglichen die Aktivierung und Differenzierung von Antigen präsentierenden Zellen und Lymphozyten. Sie arbeiten mit Makrophagen zusammen, die sich durch IFN- $\gamma$  in aktivierte Makrophagen umwandeln, die auch intrazellulär lebende Bakterien zerstören können (Janeway und Travers, 2002, Murphy et al., 2008, Volk et al., 2008). Wichtigste Aufgabe der Zytokine im Immunsystem ist die Regulation der

Richtung, des Ausmaßes und der Dauer der Immunantworten und die Übertragung der Verständigungssignale zwischen Immunsystem und anderen Organen. Vor allem die von den T<sub>H</sub>2-Zellen produzierten Zytokine IL-6 und IL-10 und das von den T<sub>H</sub>3-Zellen produzierte Zytokin TGF-β1 sind Teil der humoralen, also durch lösliche Moleküle vermittelten Regulation. T<sub>H</sub>2-Zellen sind typische T-Zellen mit Helfer-Funktion, weil sie helfen, die B-Lymphozyten zur Antikörperbildung zu aktivieren. Dies geschieht über den direkten zwischenzellulären Kontakt und durch die Freisetzung von Zytokinen, die die Entwicklung und Differenzierung der B-Lymphozyten zu Plasmazellen regulieren (Ferencik et al., 2006, Murphy et al., 2008). T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen beeinflussen sich gegenseitig durch ihre Produkte. Die aus T<sub>H</sub>1-Zellen freigesetzten Zytokine stimulieren die Entwicklung der T<sub>H</sub>1-Zellen und hemmen die Entwicklung der T<sub>H</sub>2-Zellen, während umgekehrt vor allem IL-10 die Entwicklung der T<sub>H</sub>2-Zellen stimuliert und die Entwicklung der T<sub>H</sub>1-Zellen hemmt. Eine der wichtigsten immunregulatorischen Mechanismen ist die Aufrechterhaltung des normalen T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnisses (Fiorentino et al., 1989, Ferencik et al., 2006). Der typische Wirkmechanismus der Zytokine ist die parakrine, lokale Regulation (Ferencik et al., 2006, Volk et al., 2008).

Aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur wird die Mehrheit der Zytokine zu den sogenannten Typ-I- bzw. den Typ-II-Zytokinen gezählt. Typ-I-Zytokine, auch als Hämatopoetine bezeichnet, besitzen eine Bündelstruktur von vier α-Helices, die weiter in eine Kurzketten- und in eine Langkettenform unterteilt werden. Zu ihnen gehören z. B. IL-2, IL-6 und G-CSF. Typ-II-Zytokine hingegen sind durch sechs α-Helices, welche in unterschiedlichen Konfigurationen zueinander zwei separate Konformationen zulassen, gekennzeichnet. Zu ihnen werden IL-10 und IFN-γ gezählt. Langkettige β-Faltblatt-Strukturen weisen IL-1β, TNF-α und TGF-β1 auf. Gemeinsames Strukturmerkmal der Chemokine wie IL-8 ist eine kurze β-Kette mit einem C-terminalen α-helikalen Segment (Sprang und Bazan, 1993, Janeway und Travers, 2002).

Innerhalb der Immunhomöostase des Körpers stellen Zytokine einen wirksamen Mechanismus dar, wenn ihre Sekretion und Aktivierung örtlich und ihre Wirkung in der unmittelbaren Umgebung zeitlich begrenzt ist. Problematisch wird die Zytokinproduktion, wenn sie langfristig erfolgt, ständig aufrechterhalten wird oder systemisch im gesamten Organismus wirkt. Dann können die Zytokine an der Auslösung von klinischen Zeichen verschiedener Entzündungen und Infektionen wie dem Amnioninfektionssyndrom, aber

auch Autoimmunerkrankungen, allergischen Reaktionen, Tumorerkrankungen oder dem metabolischen Syndrom teilnehmen (Murphy et al., 2008).

Weiterhin konnte eine Wechselwirkung zwischen CRH (corticotropin-releasing hormone) und inflammatorischen Zytokinen gezeigt werden. Vor allem IL-1 $\beta$  scheint ein potenter Aktivator der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse zu sein und zu einer erhöhten Kortisolproduktion zu führen. CRH kann auch direkt die Zytokinproduktion regulieren und parakrin die Prostaglandinbildung forcieren (Plagemann et al., 1998).

Die Wirkungen der einzelnen Zytokine können sich gegenseitig überlagern und verstärken, aber auch entgegengesetzt sein und sich unterdrücken. Insofern hängt das Ergebnis der Wirkung eines Zytokins nicht nur von seiner Konzentration und dem Zelltyp, auf den es wirkt, ab, sondern auch von der Anwesenheit anderer Zytokine. Die einzelnen Zytokine wirken in einem sogenannten Zytokinnetzwerk zusammen, in dem die aktuelle Aktivität jedes einzelnen von ihnen eine Gruppe anderer Zytokine beeinflusst (Balkwill und Burke, 1989, Ferencik et al., 2006).

Derzeit sind etwa 200 verschiedene Zytokine bekannt. Nach ihrer Funktion oder ihrer dreidimensionalen Struktur oder der Zellart, von der sie produziert werden oder auf die sie wirken, werden sie in unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Nach der Hauptrichtung ihrer Wirkung lassen sich vier Hauptgruppen unterscheiden (Sprang und Bazan, 1993, Janeway und Travers, 2002, Ferencik et al., 2006, Volk et al., 2008):

1. Zytokine, die Mechanismen der natürlichen Immunabwehr regulieren: IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , Chemokine (IL-8)
2. Zytokine, die das Wachstum, die Differenzierung und die Aktivierung von Lymphozyten regulieren: IL-2, IL-12, TGF- $\beta$ 1
3. Zytokine, die die Hämatopoese stimulieren: G-CSF, GM-CSF
4. Immunregulatorische Zytokine (immunsuppressorische Aktivität): IL-10, TGF- $\beta$ 1

Basierend auf dieser Einteilung werden die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zytokine entsprechend ihrer regulatorischen Wirkung beim Amnioninfektionssyndrom in zwei Gruppen, inflammatorische (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, G-CSF, TNF- $\alpha$ ) und anti-inflammatorische (IL-10, TGF- $\beta$ 1) Zytokine eingeteilt. Sowohl inflammatorische als auch anti-inflammatorische Zytokine sind an den Mechanismen, die zum Amnioninfektionssyndrom führen, beteiligt.

Im Folgenden sollen zunächst die in der vorliegenden Arbeit untersuchten, beim Amnioninfektionssyndrom zusammenwirkenden Zytokine bzw. Zytokingruppen porträtiert und im Anschluss deren Rolle bei den mit Amnioninfektionssyndrom und neonataler Sepsis verbundenen Entzündungsvorgängen beschrieben werden.

#### **1.4.2 Inflammatorische Zytokine**

Die ersten Untersuchungen an Zytokinen in Zusammenhang mit einer intrauterinen Infektion führte die Arbeitsgruppe um Romero bereits Ende der 80er-Jahre des 20. Jahrhunderts durch. In den Mittelpunkt des Interesses rückten inflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, G-CSF und TNF $\alpha$ .

IL-1 wurde zunächst als „endogenes Pyogen“ beschrieben, das durch Exposition gegenüber Endotoxin (LPS) freigesetzt wird (Dinarello, 2002). Es war das erste Zytokin, dem eine entscheidende Rolle beim Beginn von vorzeitigen Wehen durch Infektion zugeschrieben wurde (Romero et al., 1989). Es wird von aktivierten Monozyten/Makrophagen der menschlichen Dezidua als Antwort auf bakterielle Stoffwechselprodukte (LPS) produziert. So beschrieb Dinarello (2002) einen rapiden Anstieg der IL-1-Produktion nach Stimulation mit LPS. Romero et al. (1989) wiesen eine IL-1-Bioaktivität im Fruchtwasser Schwangerer mit vorzeitigen Wehen und intraamniarer Infektion, nicht aber im Fruchtwasser von Schwangeren mit vorzeitigen Wehen ohne intraamniare Infektion nach. IL-1 stimuliert seinerseits die Prostaglandinproduktion von Amnion und Dezidua sowie Myometrium, an dem es Kontraktionen auslösen kann. Gabe von IL-1 an schwangere Mäuse führte zu vorzeitigen Wehen und Frühgeburt, was durch Gabe seines natürlichen Antagonisten IL-1Ra verhindert werden konnte (Romero und Tartakovsky, 1992).

IL-6 wurde ursprünglich als B-Zell-stimulierender Faktor bezeichnet und gehört zur „IL-6/IL-12-Superfamilie“ (Richards, 1998). Es ist ein endogenes Pyrogen, welches durch unterschiedliche proinflammatorische Zytokine induziert wird. Das Fieber korreliert dabei mit der Schwere des Infektes und damit der systemischen Konzentration von IL-6. Es induziert weiterhin die Produktion hepatischer Akute-Phase-Proteine, so auch des CrP. Dies ist im Zusammenhang mit intraamnialen Infektionen von besonderer Bedeutung, da in klinischen Untersuchungen ein Anstieg des CrP im maternalen Serum vor der Entwicklung eines Amnioninfektionssyndroms und dem Einsetzen vorzeitiger Wehen bei Schwangeren mit vorzeitigem Blasensprung gezeigt wurde (Azizia et al., 2006). Intrauterin wird IL-6 vor allem von plazentaren Endothelzellen produziert. IL-6 regt humanes Amnion und Deziduazellen zur Bildung von Prostaglandinen an (Steinborn et al., 1998). Romero et al. (1990) wiesen bei Schwangeren mit vorzeitigem Wehen und intraamniarer Infektion eine höhere IL-6-Bioaktivität im Fruchtwasser nach als bei Schwangeren ohne intraamniare Infektion.

IL-8 wurde zunächst als chemotaktischer Faktor identifiziert, der auf neutrophile Granulozyten wirkt und sich im Überstand von LPS-stimulierten humanen mononukleären Zellen anreichert. Es gehört zur größten Gruppe der Zytokine, den sogenannten Chemokinen oder chemotaktischen Zytokinen (Lindley, 1998). Rezeptoren für IL-8 wurden in Chorion, Plazenta, Nabelschnur und Myometrium beschrieben, wobei eine erhöhte Expression bei Wehenbeginn gezeigt wurde (El Maradny et al., 1996). Besonders hohe Konzentrationen des Zytokins IL-8 im Fruchtwasser waren mit dem Vorliegen einer histologischen Chorioamnionitis, dem Nachweis von Bakterien im Fruchtwasser und dem klinischen Bild eines Amnioninfektionssyndroms assoziiert (Cherouny et al., 1993). Auch Romero et al. (1991a) fanden erhöhte IL-8-Konzentrationen im Fruchtwasser von Schwangeren mit vorzeitigem Wehen und intraamniarer Keimbesiedlung. Im Rahmen des Geburtsbeginns wirkt vor allem IL-8 chemotaktisch auf Granulozyten und bewirkt deren Wanderung in das zervikale Bindegewebe. Nach ihrer Aktivierung stimulieren sie die Freisetzung einer leukozytären Kollagenase, welche durch enzymatischen Kollagenabbau am zervikalen Reifungsprozess beteiligt ist (Winkler, 2003).

G-CSF gehört zur Gruppe der Kolonie stimulierenden Faktoren (colony stimulating factors, CSF). Dies sind Glykoproteine, die die Proliferation, Reifung und Aktivität der hämatopoetischen Blutzellen regulieren. G-CSF wird von aktivierten Makrophagen, Endo-

thelzellen und Fibroblasten gebildet (Foote et al., 1998). G-CSF stimuliert als Wachstums- und Differenzierungsfaktor relativ spezifisch die Produktion neutrophiler Granulozyten als Reaktion auf bakterielle Infektionen, verbessert aber auch ihre Funktionen und verlängert zusätzlich ihr Überleben durch Blockade des programmierten Zelltodes (Murphy et al., 2008). Raynor et al. (1995) wiesen eine um den Faktor 10 erhöhte Konzentration an G-CSF im Fruchtwasser von Schwangeren mit histologischer Chorioamnionitis gegenüber einer Kontrollgruppe ohne Chorioamnionitis nach. Bei Feten mit FIRS wurde eine signifikant höhere G-CSF-Plasmakonzentration als in Feten ohne FIRS gefunden (Median 714,4 pg/ml vs. Median 55,7 pg/ml), die möglicherweise ursächlich für das Auftreten einer Neutrophilie bei 2/3 dieser Feten ist (Berry et al., 1998).

Ähnliche Bedeutung im Verständnis der Entzündungsvorgänge beim Amnioninfektionssyndrom wie IL-1 erlangte das Zytokin TNF- $\alpha$ . Ursprünglich wurde es als eine Substanz identifiziert, welche im Serum von mit Endotoxin (LPS) injizierten Mäusen nachgewiesen werden und eine hämorrhagische Nekrose von Tumoren induzieren konnte. Deshalb wurde es für die bei Krebspatienten beobachtete Kachexie verantwortlich gemacht und als „Kachektin“ bezeichnet (Beyaert und Fiers, 1998). Aktivierte Makrophagen in der menschlichen Dezidua produzieren TNF- $\alpha$  nach Kontakt mit Bakterienprodukten. Es stimuliert die Prostaglandinproduktion von Amnion, Dezidua und Myometrium (Romero et al., 1991b). TNF- $\alpha$  findet sich in Fruchtwasser von Schwangeren mit intraamniotischer Infektion und vorzeitigem Wehen. Bei Schwangeren mit vorzeitigem Blasensprung und Amnioninfektionssyndrom sind die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen höher, wenn zusätzlich Wehen auftreten (Romero et al., 1992b). Systemische oder intrauterine Gabe von TNF- $\alpha$  an schwangere Mäuse führt zu vorzeitigem Wehen und Frühgeburten (Fidel et al., 1997).

### **1.4.3 Anti-inflammatorische Zytokine**

Die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$ 1 spielen eine wichtige Rolle in der Downregulation der Immunantwort bei den mit einem Amnioninfektionssyndrom einhergehenden Entzündungsvorgängen. IL-10 besitzt sowohl immunsuppressive als auch immunmodulatorische Eigenschaften. Es wird von der Dezidua, in geringerem Maße auch von Amnion und Chorion gebildet (Trautman et al., 1997). Greig et al. (1995) fanden signifikant erhöhte Konzentrationen von IL-10 im Fruchtwasser von

Schwangeren mit einem Amnioninfektionssyndrom, wobei die höchsten Konzentrationen bei Schwangeren unter 30 vollendeten SSW auftraten. In einer Studie an schwangeren Rhesusaffen erhielten diese intraamniotische Infusionen, entweder mit IL-1 $\beta$  und IL-10 oder IL-1 $\beta$  und Dexamethason oder IL-1 $\beta$  allein. Die Behandlung mit IL-10 und Dexamethason reduzierte signifikant die durch IL-1 $\beta$  induzierten Uteruskontraktionen (Sadowsky et al., 2003). Durch die intraamniotische Gabe von IL-10 an schwangere Ratten, bei denen zuvor durch LPS eine Infektion ausgelöst wurde, konnte eine nachfolgende Frühgeburt verhindert werden (Terrone et al., 2001).

TGF- $\beta$ 1 wurde ursprünglich als ein von Tumorzellen produzierter Wachstumsfaktor beschrieben, der das Überleben von Zellen in Kultur fördert oder als Wachstumsfaktor auf Fibroblasten wirkt, die an der Wundheilung beteiligt sind. Die wesentlichste biologische Eigenschaft von TGF- $\beta$ 1 ist seine negative immunregulatorische Wirkung. (Gitelman und Derynck, 1994). Es wurde aus reifer humaner Plazenta und Eihäuten isoliert (Kau- ma et al., 1990). Fortunato et al. (1998) zeigten, dass die IL-8-mRNA-Expression und -Peptidproduktion in fetalen Membranen durch gleichzeitige LPS-Stimulation und IL-10-Gabe downreguliert werden kann, während TGF- $\beta$ 1 diesen Effekt nicht auslöst. TGF- $\beta$ 1 ist jedoch in der Lage, die IL-1- und TNF- $\alpha$ -induzierte Prostaglandinproduktion humanen Amnions zu reduzieren. Weiterhin wurden IL-1-induzierte Frühgeburten beim Kaninchen durch Therapie mit TGF- $\beta$ 1 gehemmt (Bry und Hallman, 1993).

#### **1.4.4 Rolle der Zytokine beim Amnioninfektionssyndrom**

Seit mehr als 60 Jahren ist bekannt, dass die Infektion von schwangeren Tieren mit Bakterien oder bakteriellen Endotoxinen (z. B. LPS gramnegativer Bakterien oder LTA und Peptidoglykan grampositiver Bakterien) zu Aborten oder Frühgeburten führt (Zahl und Bjerknes, 1943). Erst Jahrzehnte später wurden die biochemischen Details der Reaktion auf ein Entzündungsgeschehen entdeckt. In zahlreichen Untersuchungen wurde gezeigt, dass Infektionen der Amnionhöhle durch Freisetzung inflammatorischer Zytokine vorzeitige Wehen auslösen können (Baumann und Romero, 1995). Bei Vorliegen einer Infektion werden durch den direkten bakteriellen Stimulus von Endotoxinen sowohl die Freisetzung von Prostaglandinen als auch inflammatorischen Zytokinen induziert. Als Mediatoren fungieren dabei spezifische Rezeptoren, sogenannte Toll-like Rezeptoren, die sich auf mononukleären Phagozyten, Deziduaellen und Trophoblastzel-

len der Plazenta befinden. Diese Rezeptoren vermögen pathogen-assoziierte Moleküle zu erkennen (Janssens und Beyaert, 2003). Unter dem Einfluss von Liganden wie LPS oder LTA erhöhen sie die lokale Freisetzung von Prostaglandinen und Zytokinen. Einbezogen sind dabei verschiedene Zellen der amniochorialen/dezidualen Grenzschicht neben polymorphnukleären Zellen und aktivierten Makrophagen, die mit einer Prostaglandinproduktion sowie IL-1 $\beta$ -, IL-6-, IL-8- und TNF- $\alpha$ -Sekretion reagieren (Romero et al., 1988, Romero et al., 1989, Romero et al., 1992b). Diese inflammatorischen Zytokine, die auch in normalen Terminalschwangerschaften im Fruchtwasser vorkommen (Opsjon et al., 1993) wirken wiederum selbst als Entzündungsmediatoren. Vor allem IL-1 und TNF- $\alpha$  stimulieren die Prostaglandinproduktion durch die Plazenta (Dezidua und Amnion) und das Myometrium. Dabei löst Prostaglandin E<sub>2</sub> eine Zervixdilatation und Prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  Uteruskontraktionen aus. Bei bakterieller Besiedlung der Amnionhöhle bewirkt und beschleunigt eine durch bakterielle Endotoxine verursachte Zytokinfreisetzung den Prozess des zytokinvermittelten (vorzeitigen) Geburtsbeginns (Romero et al., 2007a). Zytokine induzieren zudem die Freisetzung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die Veränderungen in der extrazellulären Matrix hervorrufen, was einen Blasensprung auslösen kann (Vadillo-Ortega und Estrada-Gutierrez, 2005). Dadurch wird letztlich die häufige Assoziation zwischen Frühgeburtlichkeit und Chorioamnionitis erklärbar. Romero et al. (1998) sprechen in diesem Zusammenhang von einem „Fluchtmechanismus des Feten aus einer feindlichen Umwelt“. Das Einsetzen vorzeitiger Wehen könnte somit auf das Überleben des Feten gerichtet sein. Darauf weisen auch Bessler et al. (2004) hin, die eine Mitverantwortung des Feten für die entzündliche Reaktion und die Auslösung seiner eigenen Frühgeburt postulieren.

#### **1.4.5 Rolle der Zytokine bei neonataler Infektion**

Präpartal und sub partu sind der Gastrointestinaltrakt und die Lunge des Feten über Schluck- und Atembewegungen dem Fruchtwasser und damit den Zytokinen ausgesetzt. Aber auch über Plazenta und Nabelschnur können die Entzündungsmediatoren den Fet erreichen. Ihre dosisabhängigen Wirkungen im Feten von einem fehlenden Effekt bis hin zum Schock wurden als „fetal inflammatory response syndrome“ charakterisiert (Gomez et al., 1998). Ähnlich dem SIRS bei Erwachsenen kommt es hierbei initial zu einer massiven Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen, vor allem IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6, gefolgt von einer als „Immunparalyse“ bezeichneten Anergie des Im-

munsystems und Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und TGF- $\beta$ 1, was auch „compensatory anti-inflammatory response“ (CARS) genannt wird (Oberholzer et al., 2001). Zur frühen Aufdeckung einer Neugeboreneninfektion in den ersten Lebensstunden erwies sich IL-6 im venösen Plasma Neugeborener mit Infektionsverdacht als sensitiver Marker (Buck et al., 1994, Messer et al., 1996). Es ist zugleich nützlich für die weitere Prognose des Krankheitsverlaufs (Ng und Lam, 2006).

IL-1 $\beta$  aus dem Fruchtwasser kann in der fetalen Lunge an intrapulmonale Rezeptoren binden und die fetale Lungenreife durch Surfactantbildung beschleunigen. Durch Einstrom von Entzündungszellen kann sich jedoch auch eine bronchopulmonale Dysplasie entwickeln (Kramer, 2008). Neben der akuten Problematik für das Neugeborene rücken die möglichen Spätfolgen in den Vordergrund. Inzwischen wird vor allem die Zerebralparese als Langzeitfolge einer perinatalen Infektion infolge eines Amnioninfektionssyndroms angesehen (Garnier et al., 2004, Bashiri et al., 2006). Zytokine können die unreife fetale Blut-Hirn-Schranke überwinden. Sie werden aber auch als inflammatorische Antwort im Gehirn des Feten selbst gebildet. Erhöhte Konzentrationen neurotoxisch wirksamer inflammatorischer Zytokine im Serum und Gehirn des Feten bzw. des Neugeborenen führen infolge einer Entzündungsreaktion zu einer Verletzung und Zerstörung von Gewebe des Zentralnervensystems, was zu einer periventrikulären Leukomalazie und in letzter Konsequenz zu einer Zerebralparese führen kann (Yoon et al., 2003). Leviton (1993) und Yoon et al. (1996) konnten eine Korrelation zwischen TNF- $\alpha$ - bzw. IL-6-Nabelschnurblutkonzentrationen und neurologischen Defiziten infolge einer periventrikulären Leukomalazie bei den Neugeborenen aufzeigen. In der Studie von Yoon et al. (1996) stellte sich IL-6 als unabhängiger Risikofaktor für eine periventrikuläre Leukomalazie dar. Erhöhte Konzentrationen an Zytokinen wurden sowohl im Fruchtwasser (Yoon et al., 1997) als auch im Blut (Nelson et al., 1998) der Neugeborenen, die eine Zerebralparese entwickelten, gefunden.

## **1.5 Fragestellung und Zielsetzungen der Arbeit**

Das Anliegen dieser Studie besteht darin, nach Möglichkeiten für eine sichere Diagnose des Amnioninfektionssyndroms bei Schwangeren und einer frühzeitigen Diagnose der dadurch bedingten frühen Verlaufsform einer Sepsis (early-onset Infektion) bei Neuge-

borenen schon im Nabelschnurblut mit Hilfe neuer laborchemischer Methoden zu suchen.

Die bisherigen Möglichkeiten für eine verlässliche und schnelle Diagnostik des Amnioninfektionssyndroms werden als unzureichend betrachtet. Die klinischen Symptome des Amnioninfektionssyndroms und die entsprechenden laborchemischen Entzündungsparameter im Plasma der Mutter sind, sofern überhaupt vorhanden, unspezifisch. Ihr Vorhandensein lässt noch nicht auf eine Infektion des Neugeborenen schließen. Auf der anderen Seite zeigt nur eine geringe Zahl der Neugeborenen mit early-onset Infektion die typischen klinischen Erscheinungsbilder, sodass diese Infektionen dem Geburtshelfer leicht entgehen können. Auch die Labordiagnostik ist unbefriedigend. Die frühe Diagnose und Behandlung der Neugeborenen mit Sepsis ist jedoch für die Verbesserung ihrer Prognose und Verminderung der Morbidität unerlässlich. Bisher müssen noch relativ viele Neugeborene antibiotisch therapiert werden, um die wenigen mit einer definitiven early-onset Infektion zu erfassen.

In dieser Situation erscheint die Untersuchung von Zytokinen im Nabelschnurblut als geeignetes Ziel. Die besondere Bedeutung des Nabelschnurbluts gegenüber dem Serum von Neugeborenen liegt in seiner guten Verfügbarkeit, der ausreichend zu gewinnenden Menge und der Möglichkeit der schnellen Analyse. Im Gegensatz zum Fruchtwasser, das nur durch einen invasiven Eingriff, eine Punktion, zu gewinnen ist, lässt es sich relativ einfach aus den Nabelschnurgefäßen gewinnen. Es ist geradezu als diagnostisches Medium im Zusammenhang mit der Früherkennung einer neonatalen Infektion prädestiniert. Mehrere Arbeitsgruppen konnten eine positive Korrelation zwischen den Konzentrationen verschiedener inflammatorischer Zytokine in Nabelschnurblut und einer neonatalen Infektion nachweisen (u.a. Lehrnbecher et al., 1996, Messer et al., 1996, Weeks et al., 1997, Berner et al., 1998, Smulian et al., 1999b, Berner et al., 2000, Kashlan et al., 2000, Büscher et al., 2000, Hatzidaki et al., 2005). Wir entschieden uns daher für den Nachweis der Zytokine, die hauptsächlich mit Entzündungsreaktionen im menschlichen Körper in Verbindung gebracht werden, Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Tumornekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) als Zytokine, die in erster Linie die Immunantwort repräsentieren, gefolgt von Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und dem die Granulozytenbildung anstoßenden Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor (G-CSF) sowie

der Zytokine, die einer Entzündung entgegenwirken, Interleukin-10 (IL-10) und Transforming-growth-factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1).

Im Folgenden werden 4 Hypothesen bzw. Fragen aufgestellt, die durch die vorliegende Arbeit beantwortet werden sollen.

1. Der frühestmögliche Zeitpunkt der fetalen Reaktion auf eine intraamniotische Infektion ist die Genexpression auf mRNA-Ebene. Mit Hilfe einer neuen Methode, der real-time TaqMan RT-PCR soll die mRNA-Expression von Zytokinen in mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut von Neugeborenen nach deren Geburt untersucht werden.
2. Feten und Neugeborene sind in der Lage, selbstständig inflammatorisch relevante Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  als Reaktion auf einen intraamniotischen Infektionsreiz zu produzieren. Eine gesteigerte G-CSF-Produktion entspricht der relativen Unreife ihres Immunsystems. Das fetale und neonatale Immunsystem ist bereits in der Lage, durch Produktion anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$ 1 gegenregulativ zur Infektion zu wirken. Dazu sollen die relativen mRNA-Mengen der genannten Zytokine im Nabelschnurblut Neugeborener von Schwangeren mit klinischen Zeichen eines Amnioninfektionssyndroms, also einem vermutlich intraamniotisch infizierten Kollektiv (Risikogruppe) und Neugeborener von gesunden Schwangeren (Kontrollgruppe), bestimmt und miteinander verglichen werden.
3. Die intrauterine Infektion ist immer mit der Gefährdung des Kindes verbunden. Fet und Neugeborenes sind durch die Freisetzung von Zytokinen als spezifische Reaktion auf ein Amnioninfektionssyndrom in das Infektionsgeschehen einbezogen und der Gefahr, eine early-onset Infektion zu entwickeln, ausgesetzt. Aber nicht alle Neugeborenen von Schwangeren mit Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom entwickeln eine early-onset Infektion. Möglicherweise gibt es signifikante Unterschiede in der mRNA-Expression bestimmter Zytokine bei Neugeborenen, die eine early-onset Infektion und Neugeborenen, die keine Infektion entwickeln. Deshalb werden die relativen mRNA-Mengen inflammatorischer und anti-inflammatorischer Zytokine von Neugeborenen, die eine early-onset Infektion entwickeln, mit denen nicht infizierter Neugeborener innerhalb der Risikogruppe verglichen.

4. Eine histologische Chorioamnionitis wird häufiger nachgewiesen, als die klinische Diagnose eines Amnioninfektionssyndroms gestellt wird oder Neugeborene eine early-onset Infektion entwickeln. Möglicherweise gibt es auch hier signifikante Unterschiede in der mRNA-Expression bestimmter Zytokine im Nabelschnurblut von Schwangeren mit Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom, in deren Plazenten histologisch eine Chorioamnionitis nachgewiesen wird, gegenüber solchen mit Normalbefunden. Deshalb werden die relativen mRNA-Mengen inflammatorischer und anti-inflammatorischer Zytokine von Schwangeren, deren Plazenten eine Chorioamnionitis aufweisen, mit denen, die Normalbefunde zeigen, innerhalb der Risikogruppe verglichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patientenkollektiv

In einer prospektiven Untersuchung wurden bei 30 Schwangeren mit klinischem Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom (Risikogruppe) sowie 30 Schwangeren ohne Symptome eines Amnioninfektionssyndroms (Kontrollgruppe) die intrazellulären relativen Mengen der auf mRNA-Ebene exprimierten inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, G-CSF und TNF- $\alpha$  und der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$ 1 in mononukleären Zellen aus dem Nabelschnurvenenblut mittels quantitativer real-time TaqMan RT-PCR bestimmt.

In die Studie eingeschlossen wurden Schwangere, die im Zeitraum zwischen Oktober 1999 und Januar 2001 in der Klinik für Geburtsmedizin der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum (Leitung: Prof. Dr. J. W. Dudenhausen), wegen eines vorzeitigen Blasensprungs stationär aufgenommen wurden. Die Zustimmung der Ethikkommission war vorher gegeben. Die Schwangeren wurden über die Studie schriftlich und mündlich aufgeklärt. Ein Einschluss in die Studie erfolgte nur mit vorheriger Zustimmung. Der klinische Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom war durch folgende Einschlusskriterien (Bek et al., 1990, Gibbs und Duff, 1991) sub partu gegeben:

- maternale Temperatur > 38 °C und
- fetale Herzfrequenz > 150 spm (> 120 min) oder
- maternales CrP > 2,0 mg/dl

Nicht eingeschlossen wurden Schwangere mit Hepatitis-B- und Hepatitis-C-Infektion.

Geburtsmedizinisch relevante Rahmenparameter, die zusätzlich erhoben wurden, waren das Alter der Schwangeren, die Parität, das Gestationsalter, die Zervixreife, Nikotinabusus, die Art der eventuellen Einleitung, die Gabe von Betamethason zur Lungenreifeförderung, der Entbindungsmodus und weitere mögliche Infektionszeichen, wie die Farbe des Fruchtwassers.

Eine antibiotische Therapie mit einem Cephalosporin (Spizef®), 1,5 g i.v. alle 8 Stunden, erhielten alle Schwangeren mit einem drohenden Amnioninfektionssyndrom, d. h. bei denen das Auftreten der vorstehend beschriebenen klinischen Infektionszeichen bzw. ein Anstieg der Entzündungsparameter oder ein länger als 12 Stunden zurückliegender vorzeitiger Blasensprung diagnostiziert wurde.

Alle Schwangeren wurden in der Klinik für Geburtsmedizin der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum entbunden. Die Blutentnahme erfolgte unmittelbar nach Geburt und Abnabelung des Kindes aus der Nabelschnurvene.

Werte der Neugeborenen, die erhoben wurden, waren Apgar, Nabelarterien- und -venen-pH, Laktat, Base excess, Körpergewicht, Geschlecht und Ursachen einer eventuellen Verlegung in die Klinik für Neonatologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum (Leitung: Prof. Dr. M. Obladen). Auskunft über die klinische Situation, die Notwendigkeit einer antibiotischen Behandlung und Einschätzung der Schwere der neonatalen Infektion der verlegten Neugeborenen wurde in direktem Gespräch vom behandelnden Neonatologen eingeholt. Die neonatologische Krankenakte wurde eingesehen und ausgewertet.

Als early-onset Infektion des Neugeborenen wird eine Infektion innerhalb der ersten 48 Stunden nach Geburt definiert (Töllner, 1982, Gerdes, 1991). Für die Bestätigung des Infektionsverdachts war einer der folgenden Parameter:

- positive Blutkultur oder
- neonatales CrP > 1 mg/dl oder
- neonatale Leukozyten > 30 000/µl oder <5 000/µl oder
- I/T-Ratio > 0,2

in Kombination mit mindestens drei der folgenden klinischen Symptome:

Apnoe, Bradykardie, Hypotension, Kreislaufschwäche, Lethargie, Temperaturinstabilität, Hepatomegalie oder Trinkschwäche

notwendig.

Die Plazenten wurden nach der Geburt in der Abteilung für Paidopathologie und Plazentologie des Instituts für Pathologie der Charité-Universitätsmedizin, Campus Virchow-Klinikum (Leitung: Prof. Dr. M. Vogel) histologisch untersucht. Kriterien der histologischen Untersuchung waren eine vorliegende bakterielle oder entzündliche Infiltration des Gewebes, Anomalien oder perfusionsbedingte Insuffizienzzeichen. Die histologische Beurteilung einer entzündlichen Infiltration und damit Chorioamnionitis wurde nach den Kriterien von Vogel (1996) eingestuft in Minimal-, Teil- oder Vollbild einer Chorioamnionitis.

## **2.2 Untersuchung der Blutproben**

Um die intrazellulären relativen Zytokin-Mengen auf mRNA-Ebene mittels PCR bestimmen zu können, mussten zunächst im gewonnenen Vollblut die Erythrozyten lysiert und danach das Hämoglobin daraus entfernt werden. Dieser erste Schritt fand unmittelbar nach Probengewinnung im Labor des Kreißsaales statt. Anschließend wurden die Proben bei -80 °C im Labor der Klinik für Geburtsmedizin, Campus Virchow-Klinikum, eingefroren. Danach erfolgte der Transport der Proben in das Institut für Medizinische Immunologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte (Leitung: Prof. Dr. H.-D. Volk). Dort wurde die gesamte RNA aus den Proben extrahiert. Die RNA wurde mittels Reverser Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben. Danach erfolgten die Amplifikation der cDNA, der Nachweis und die Quantifizierung des PCR-Produkts mit der real-time TaqMan (RNA-) RT-PCR.

### **2.2.1 Lyse und Entfernung der Erythrozyten aus Vollblut**

Unter Verwendung der Erythrozyten-Lysis-Puffer (EL und RLT) der Firma QIAGEN GmbH, Hilden, wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt (QIAamp<sup>®</sup> RNA Blood Mini Handbook, 1999):

1 Volumenteil Blut (500 µl) und 5 Volumenteile (2,5 ml) EL-Puffer wurden in ein Falcon-Röhrchen gegeben. Dieses wurde 10 - 15 min auf Eis inkubiert und zweimal kurz geschüttelt. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (400 g, 10 min, 4 °C) und der

Überstand verworfen. Danach wurden zum entstandenen Pellet 2 Volumenteile (1 ml) EL-Puffer gegeben und die Probe einmal kurz geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation unter denselben Bedingungen wurde wiederum der Überstand verworfen. Nun konnten 600 µl RLT-Puffer (Vorbereitung: RLT + 10 µl β-Mercapto-Ethanol/ml) zur Probe gegeben werden. Die Proben wurden bei -80 °C eingefroren.

### **2.2.2 Isolation totaler RNA aus Vollblut**

Unter Verwendung des QIAamp RNA Blood Mini Kits und des RNase-Free DNase Sets der Firma QIAGEN GmbH, Hilden, wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt (QIAamp® RNA Blood Mini Handbook, 1999):

Zunächst wurden die eingefrorenen Proben bei Raumtemperatur aufgetaut. Das Lysat wurde in eine QIAshredder spin column mit einer Gelmembran, die sich auf einem 2 ml Tube befand, pipettiert. Dann wurde das Lysat zum Zwecke der Homogenisierung 2 min bei 8 000 g zentrifugiert. 1 Volumenteil (600 µl) 70%igen Ethanols wurde hinzugegeben und durch Pipettieren mit dem Lysat vermischt. Anschließend wurde die Probe erneut in eine QIAamp spin column, die sich auf einem 2 ml Tube befand, pipettiert und für 15 s bei 8 000 g zentrifugiert. Nun schloss sich der DNase-Verdau mittels des RNase-Free DNase Sets an. Dazu wurde der DNase incubation mix direkt auf die Gelmembran der QIAamp spin column aufgetragen und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 350 µl Puffer RW1 in die QIAamp spin column pipettiert und die Probe erneut zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen. Die QIAamp spin column wurde in ein neues 2 ml Tube gesetzt, zweimal 500 µl Puffer RPE dazupipettiert und jeweils 15 s bei 8 000 g und 2 min bei 8 000 g zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde ebenfalls verworfen. Abschließend wurden die QIAamp spin column in ein neues 1,5 ml Tube gesetzt, zweimal 30 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Gelmembran pipettiert und die Probe für 1 min bei 8 000 g zentrifugiert. Das Eluat (die entstandene RNA) wurde bei -70 °C eingefroren.

Um Qualität und Quantität der präparierten RNA festzustellen, wurde 1 µl der RNA auf ein 0,8%iges Agarose-Gel in 1 x TBE-Puffer aufgetragen. Die Auswertung erfolgte durch Berechnung der Relation zwischen der RNA-Intensität und einer genau definierten Menge (1 µg) des aufgetragenen Größenstandards (1 kb DNA-Leiter). Die RNA-

Ausbeute wurde anschließend in  $\mu\text{g}$  berechnet. Für die cDNA-Synthese wurde 1  $\mu\text{g}$  RNA benötigt.

### **2.2.3 Synthese der cDNA (komplementäre DNA)**

#### **Prinzip**

Um RNA mit Hilfe der PCR zu vervielfältigen, hybridisiert man einen Primer an die RNA-Matrize und erstellt mittels der RT und einer anschließenden PCR eine cDNA-Kopie. Da die bei der PCR verwendete Polymerase DNA-abhängig ist, muss vor der Amplifikation die präparierte RNA in cDNA umgeschrieben werden. Die Umschreibung wird durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (RT) vermittelt. Zum Start der Synthese benötigt die RT einen Primer, der zum Reaktionsmix im Überschuss hinzugefügt wird. Oligo-dT-Primer binden an den Poly-(A)-Schwanz am 3'-Ende von zellulären mRNA-Molekülen. Um den Abbau durch RNasen bei der cDNA-Synthese zu minimieren, wird ein RNase-Inhibitor (RNasin), der aus humaner Plazenta gewonnen wird, zum Reaktionsmix pipettiert (Volk und Döcke, 2000).

#### **Ansatz (je Probe):**

1,0  $\mu\text{g}$  RNA  
4,0  $\mu\text{l}$  5 x RT-Puffer  
2,0  $\mu\text{l}$  dNTPs  
1,0  $\mu\text{l}$  Oligo (dT)<sub>12-18</sub>-Primer (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )  
0,5  $\mu\text{l}$  DTT  
0,5  $\mu\text{l}$  human placental Rnase-Inhibitor (10 000 U/ml)  
1,0  $\mu\text{l}$  RT (200 U/ml)  
Aqua zur Injektion ad 20  $\mu\text{l}$

#### **Ablauf für den 20 $\mu\text{l}$ -Ansatz**

1  $\mu\text{g}$  RNA wurde in 10  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser bei 75 °C für 10 min inkubiert. Dabei wird die sekundäre und tertiäre Struktur der RNA zerstört, was die Primeranlagerung erleichtert. Der vorbereitete Mix (10  $\mu\text{l}$ ) wurde dazugegeben und alles 10 min bei Raumtemperatur

inkubiert. Dabei lagern die Primer für die RT an das Template an. Danach wurde der Gesamtmix 60 min bei 42 °C inkubiert. In dieser Zeit läuft die Synthese des komplementären DNA-Stranges ab. Abschließend wurde der Gesamtmix 5 min bei 95 °C abgekocht, um die vollständige Inaktivierung der Enzyme zu erreichen. Der Mix mit der fertigen cDNA wurde auf Eis gestellt und danach bei -20 °C aufbewahrt.

## **2.2.4 Polymeraseketten-Reaktion (PCR)**

Die Methode der PCR entwickelte der Biochemiker Kary Mullis während seiner Forschungstätigkeit bei der Biotechnologie-Firma Cetus Corporation. Im Jahre 1983 hatte er die Idee, das Prinzip der identischen Reduplikation einsträngiger DNA, wie sie sich vor jeder Teilung kernhaltiger Zellen abspielt, in vitro nachzuahmen, wofür er 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt. Damit war eine schnelle und sehr sensitive Methode in der DNA-Analytik geboren (Mullis et al., 1986).

### **2.2.4.1 Prinzip der PCR**

#### **Allgemeines**

Die PCR ist eine in vitro-Technik zur Amplifizierung (Vervielfältigung) von DNA-Abschnitten, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden. Es handelt sich um ein elementares Hilfsmittel für Forschung und medizinische Diagnostik mit einem breiten Spektrum spezieller Anwendungen, u. a.:

- Charakterisieren, Klonieren, Exprimieren von Genen
- Nachweis von Erregern und Mutationen, die für Erbkrankheiten verantwortlich sind
- Erstellen eines genetischen Fingerabdrucks

Die für diese Arbeit genutzte spezielle PCR-Methode heißt real-time TaqMan (RNA-) RT-PCR, da

1. RNA untersucht wird, die vor der PCR mittels Reverser Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben wurde,

2. der PCR-Verlauf „real-time“, in Echtzeit, aufgezeichnet und
3. eine spezielle DNA-Polymerase (Taq Polymerase) verwendet wird.

### **Prinzip der konventionellen PCR**

Durch die PCR können DNA-Nukleotidsequenzen in vitro enzymatisch exponentiell amplifiziert werden. Als Starthilfe werden zwei Oligonukleotidprimer benötigt. Für den Nachweis von Zytokinen werden sie vom kodierenden Bereich einer Zytokinsequenz abgeleitet. Die Primer sind kurze einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden einer definierten DNA-Sequenz der DNA-Matrize (Template) sind. Eine DNA-Polymerase verlängert unter definierten Reaktionsbedingungen und in Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) die Primer entlang der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrize und synthetisiert so neue DNA-Stränge, deren Sequenz komplementär zur Matrize ist. Die PCR ist in drei Schritte gegliedert, die jeweils bei bestimmten verschiedenen Temperaturen ablaufen (zyklischer Temperaturverlauf):

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Matrize (Temperatur: 95 °C, Dauer: initial 2 min, danach je Zyklus 30 s)
2. „Annealing“ der Primer an die DNA (Temperatur: 60/68 °C abhängig vom Primer, Dauer: je Zyklus 30 s)
3. Polymerisation (Extension) der Primer durch die Polymerase (Temperatur: 72 °C, Dauer: je Zyklus 40 s, abschließend 7 min)

Diese Schritte werden in 25 bis 30 aufeinanderfolgenden Zyklen alternierend wiederholt. Das entstandene PCR-Produkt (Amplikon) besteht aus doppelsträngigen DNA-Kopien des ursprünglichen Gens (Newton und Graham, 1994).

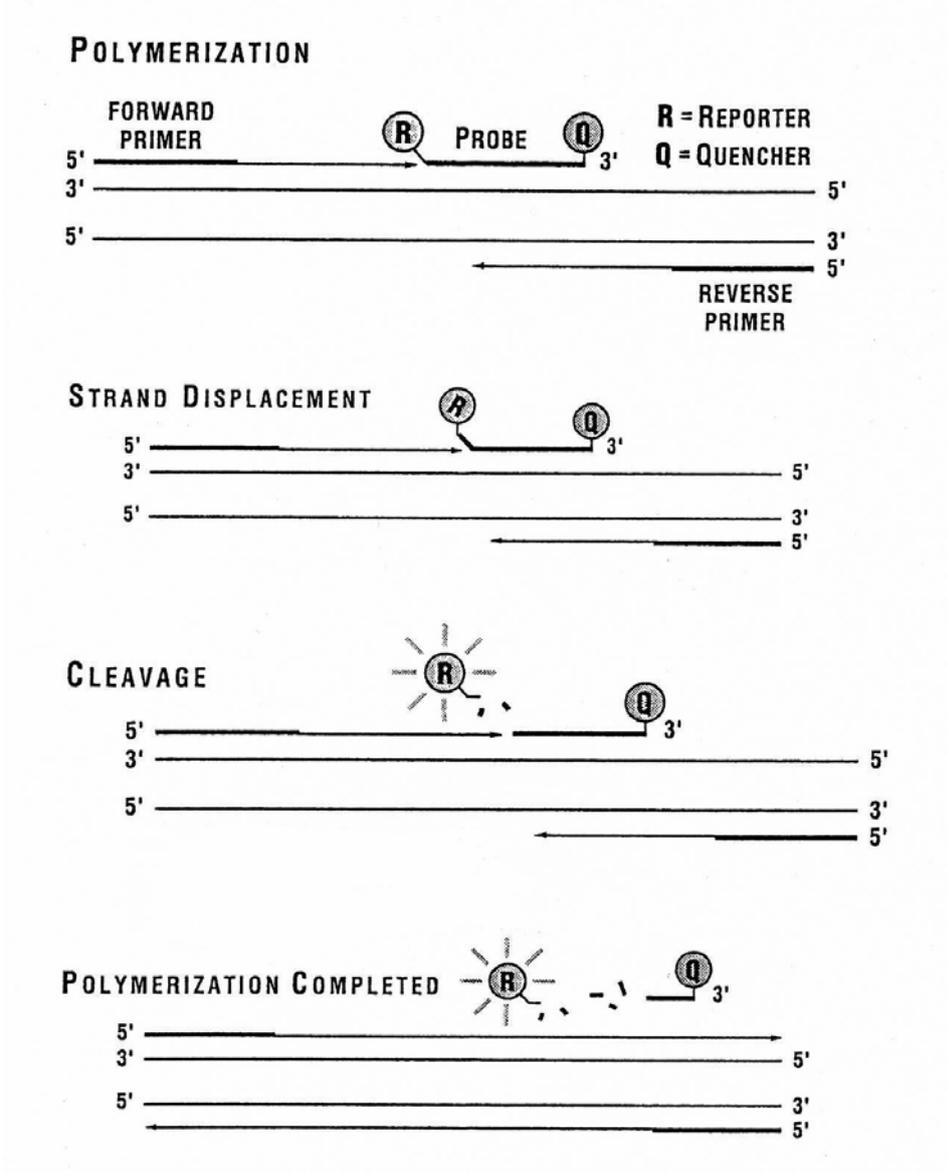
### **Prinzip der real-time TaqMan RT-PCR**

Trotz der wesentlichen Erleichterungen in der täglichen Laborarbeit, die diese verhältnismäßig leicht zu automatisierende Methode mit sich brachte, bedeutete der sensitive,

reproduzierbare und spezifische Nachweis der PCR-Produkte noch immer einen hohen Zeit- und Arbeitsaufwand, aber auch die Gefahr von Kontaminationen.

Um das Automatisierungsniveau der PCR zu erhöhen, wurde ein sogenanntes homogenes Assay entwickelt, bei dem die Amplifikation und der Nachweis des PCR-Produkts simultan in einem Reaktionsgefäß möglich sind. Dies gelang erstmals 1991 mit dem von Holland et al. beschriebenen 5'-Nuklease-PCR-Assay unter Ausnutzung der 5'-Exonuklease-Aktivität der Taq Polymerase zur Detektion der sequenzspezifischen Amplifikation. Allerdings erforderte diese Technik noch ein aufwendiges Post-PCR-Processing. Erst mit den von Lee et al. 1993 bei Applied Biosystems entwickelten fluorogenen Sonden wurde es möglich, den Abbau der Sonde ohne aufwendige Post-PCR-Schritte zu detektieren. Dieses sogenannte TaqMan PCR-Assay basiert auf dem ursprünglichen 5'-Nuklease-Assay und macht sich zunächst ebenfalls die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq DNA-Polymerase zunutze. Hierfür wird eine spezielle fluorogene Sonde eingesetzt, die aus einem Oligonukleotid besteht, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (Fluoreszin-Derivat) markiert ist, während das 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) trägt und außerdem mit einem Phosphatrest blockiert ist. Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) zur Fluoreszenz angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt. Während der PCR hybridisiert die Sonde mit den Primern zunächst an den Matrizen-Strang. In der Extensionsphase trifft die Taq Polymerase nun auf diese Sonde und beginnt sie zu verdrängen. Es entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq DNA-Polymerase aktiviert und die Sonde geschnitten wird (Abbildung 2). Die freie, nicht hybridisierte Sonde wird hingegen nicht hydrolysiert. Kommt es jedoch zur Sondenhydrolyse, so werden die räumliche Nähe und damit auch der FET zwischen Reporter und Quencher unterbrochen. Entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkt steigt die Fluoreszenz des Reporters also mit jedem PCR-Zyklus an. Das dabei gebildete Signal ist strikt sequenzspezifisch, da nicht 100%ig bindende Sondenmoleküle verdrängt werden, noch bevor die Exonuklease-Aktivität der Taq Polymerase aktiviert wird. Die Verdrängung der Fluoreszenzen der verschiedenen Farbstoffe kann schließlich mit Hilfe des ABI Prism<sup>®</sup> 7700 Sequence Detectors im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus erfasst werden. Der Anstieg der Fluoreszenz ist proportional zum Anstieg der Konzentration

des Amplifikationsprodukts. Durch die Proportionalität der Fluoreszenz und der entstehenden Amplifikate ist somit auch eine Quantifizierung der Ausgangs-DNA möglich.



**Abb. 2:** Prinzip der real-time TaqMan RT-PCR: 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq DNA-Polymerase während der Extensionsphase der PCR (Lyamichev et al., 1993)

## Effizienz der PCR

Die Effizienz ist abhängig von der Matrize und der Optimierung der Methode. Zielsequenzen vermehren sich nicht beliebig lange exponentiell. Nach 25 bis 30 Zyklen ist bei molarem Überschuss der Ziel-DNA die abnehmende Enzymmenge der begrenzende Faktor für die Reaktion. Außerdem nimmt die Aktivität des Enzyms ab, da es durch die Hitze denaturiert wird. Mit zunehmender Konzentration der gewünschten Stränge vermindert auch deren Hybridisierung untereinander die Effektivität der Vervielfältigung, da diese Reaktion mit der Anlagerung der Primer konkurriert.

## Kopienzahl nach Abschluss der Reaktion

Die Formel zur Berechnung der Kopienzahl lautet:  $(2^n - 2n) \cdot x$ . Dabei bedeutet:

$n$  = die Anzahl der Vermehrungszyklen,

$2n$  = die Produkte des 1. und 2. Vermehrungszyklus, deren Länge nicht definiert ist, da die DNA-Polymerase so lange DNA synthetisiert, bis sie vom Beginn eines neuen Vermehrungszyklus unterbrochen wird und

$x$  = die Anzahl der Kopien der ursprünglichen DNA-Matrize.

Ab Zyklus 3 wird nur noch Zielsequenz gebildet, die durch die Position der Primer in der Originalmatrize vorgegeben ist. Ab Zyklus 4 der PCR findet eine exponentielle Vermehrung der Zielsequenz statt. Bei 100%iger Ausbeute müsste sich die gesuchte DNA nach 20 Zyklen  $2^{20}$ -fach vermehren.

### 2.2.4.2 Praktischer Ablauf der PCR

#### Die entscheidenden Parameter der PCR

Entscheidend für den Ablauf der PCR sind folgende Parameter:

- Matrize (RNA-Präparation, cDNA-Synthese für eine RT-PCR)
- Zusammenstellung der Puffer (Lösungsmittel des Puffers und pH,  $Mg^{2+}$ , dNTPs)

- Taq DNA-Polymerase (Spezifität, Genauigkeit, Ertrag, Größe des zu amplifizierenden Produkts)
- Oligonukleotid-Primer (Konstruktion: Länge, Restriktionsschnittstellen, Konzentration innerhalb der PCR)
- Parameter für den Temperaturzyklus (Temperatur und Dauer von Denaturierung, Anlagerung, Verlängerung)
- Vermeiden von Verunreinigungen (strenge Trennung der Arbeiten vor und nach der PCR und geeignete positive und negative Kontrollen bei jeder PCR als spezifische Vorsichtsmaßnahmen, um jegliche Kontamination zu vermeiden)

Zwei Technologien machten die PCR zur Schlüsseltechnik in der Wissenschaft:

1. Die Entwicklung von Geräten für die Steuerung der Temperaturzyklen (Thermocycler/PCR-Maschinen) ermöglicht die Automatisierung des PCR-Prozesses.
2. Durch den Einsatz hitzestabiler DNA-Polymerasen (z. B. Taq DNA-Polymerase) muss die Enzymlösung nicht mehr nach jedem Denaturierungsschritt erneut zugesetzt werden.

## **Thermocycler**

Thermocycler sorgen für den zyklischen Temperaturwechsel bei der PCR (periodisches Temperaturprofil mit zwei bzw. drei Reaktionsstufen).

## **Reagenzien (Grundkomponenten der PCR)**

### **a) Enzyme (Taq DNA-Polymerase)**

Es handelt sich dabei um ein Enzym, das gentechnisch aus dem Bakterium **Thermus aquaticus** hergestellt wird (Thermus aquaticus wurde aus einer heißen Quelle des Yellowstone-Nationalparks isoliert). Die optimale Arbeitstemperatur beträgt 70 – 80 °C. Bei dieser Temperatur synthetisiert die Polymerase DNA mit einer Geschwindigkeit von 35 bis 100 Nukleotiden pro Sekunde. Deshalb wird sie auch als hochprozessive Polymerase bezeichnet. Prozessivität bedeutet die durchschnittliche Anzahl

der Nukleotide, die ein Enzym in die DNA einbaut, bevor es von der Matrize abfällt. Die Polymerisation schreitet vom 5'-Phosphat des dNTP in Richtung der endständigen 3'-Hydroxylgruppe des wachsenden DNA-Stranges voran (Syntheserichtung).

### **b) Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)**

Die DNA-Polymerase bildet aus einzelnen dNTPs lange Polynukleotidketten (Synthese eines neuen komplementären Stranges). Starthilfe ist dabei der Primer, der von der Polymerase verlängert wird. Man verwendet eine Mischung aller vier Moleküle: dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Konzentration: 100 µM). Die dNTPs binden an die freie 3'-Hydroxylgruppe des Primers und bilden den komplementären DNA-Strang.

### **c) Puffer**

Für die Taq DNA Polymerase muss der Puffer zehnfach konzentriert sein:

100 mM Tris-HCl, pH 8,3

500 mM KCl

0,1 % Gelatine

### **d) Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>)**

Die Mg<sup>2+</sup>-Ionen bilden zusammen mit den dNTPs einen löslichen Komplex, der für den dNTP-Einbau ausschlaggebend ist. Außerdem stimulieren sie die Polymeraseaktivität, erhöhen die Hybridisierungstemperatur (T<sub>m</sub>) des DNA-Doppelstranges und verbessern die Bindung zwischen Primer und Matrize. Die optimale Konzentration beträgt 1,0 - 1,5 mM.

### **e) Oligonukleotid-Primer**

Die Primer sind komplementär zur DNA-Vorlage und haben eine Länge von 20 bis 30 Nukleotiden.

## **f) DNA-Matrize (Template)**

Als PCR-Substrat eignen sich einzel- und doppelsträngige DNA oder RNA. Wenn die Konzentration der gesamten Sequenz innerhalb der Matrizen-DNA nicht bekannt ist, ist es sinnvoll, die PCR anhand einer Kontroll-DNA zu optimieren.

## **g) Hemmstoffe der PCR**

Heparin: deshalb musste bei der Blutabnahme die Koagulation mit EDTA verhindert werden.

Porphyrinverbindungen: deshalb mussten die Erythrozyten lysiert und die Leukozyten abzentrifugiert werden.

## **Hilfsmittel**

### **a) Reaktionsgefäße**

200 µl-Gefäße mit dünner Wand (bessere Wärmeaufnahme und -abgabe ermöglicht kürzere PCR-Zyklen).

### **b) Pipettierhilfen**

Gestopfte Einmalpipettenspitzen (dienen der Vermeidung von Verunreinigungen des Pipettenkolbens).

## **PCR-Ansatz (je Probe):**

1,0 µl cDNA

2,5 µl 10 x Puffer

1,0 µl dNTP Mix (2,5 mM je dNTP)

1,5 µl MgCl<sub>2</sub>

1,0 µl Primer S + A (10 µM je Primer)

0,1 µl Taq DNA Polymerase (AmpliTaq<sup>®</sup>-Polymerase)

17,9 µl Aqua zur Injektion

Zuerst wurde ein "Mastermix", der alle Komponenten mit Ausnahme der unterschiedlichen cDNAs enthielt, zusammenpipettiert. Die Taq-Polymerase (AmpliTaq<sup>®</sup>-Polymerase, Applied Biosystems, Foster City, USA) wurde als letzte Komponente dazugegeben. Bei jeder PCR wurde eine Negativkontrolle (alle Komponenten ohne cDNA) mitgeführt (TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol, 1999).

### **2.2.4.3 Nachweis und Untersuchung des Amplikons**

#### **Mögliche Aussagen der Untersuchung**

Die (RNA-) RT-PCR ist eine hochsensible Methode, mit der man ganz allgemein die Genexpression auf der Stufe der RNA untersuchen, aber auch speziell die Menge von mRNA bestimmen kann. Die Endprodukte der PCR (Amplikons) sind DNA-Fragmente, deren Länge von der Position der Primer vorgegeben wird. Aus einer Untersuchung der PCR-Produkte lassen sich verschiedene Informationen ableiten:

- Nachweis, dass die gesuchte DNA-Sequenz in der Probe vorhanden ist.
- Eine quantitative Abschätzung der Ausbeute einer PCR, die Rückschlüsse darauf erlaubt, in welcher relativen oder absoluten Menge die Ziel-DNA bzw. -RNA ursprünglich vorlag.
- Eine Sequenzanalyse, die entweder auf einer differenzierten Hybridisierung mit Sonden oder einer direkten Sequenzierung des Amplikons basiert.

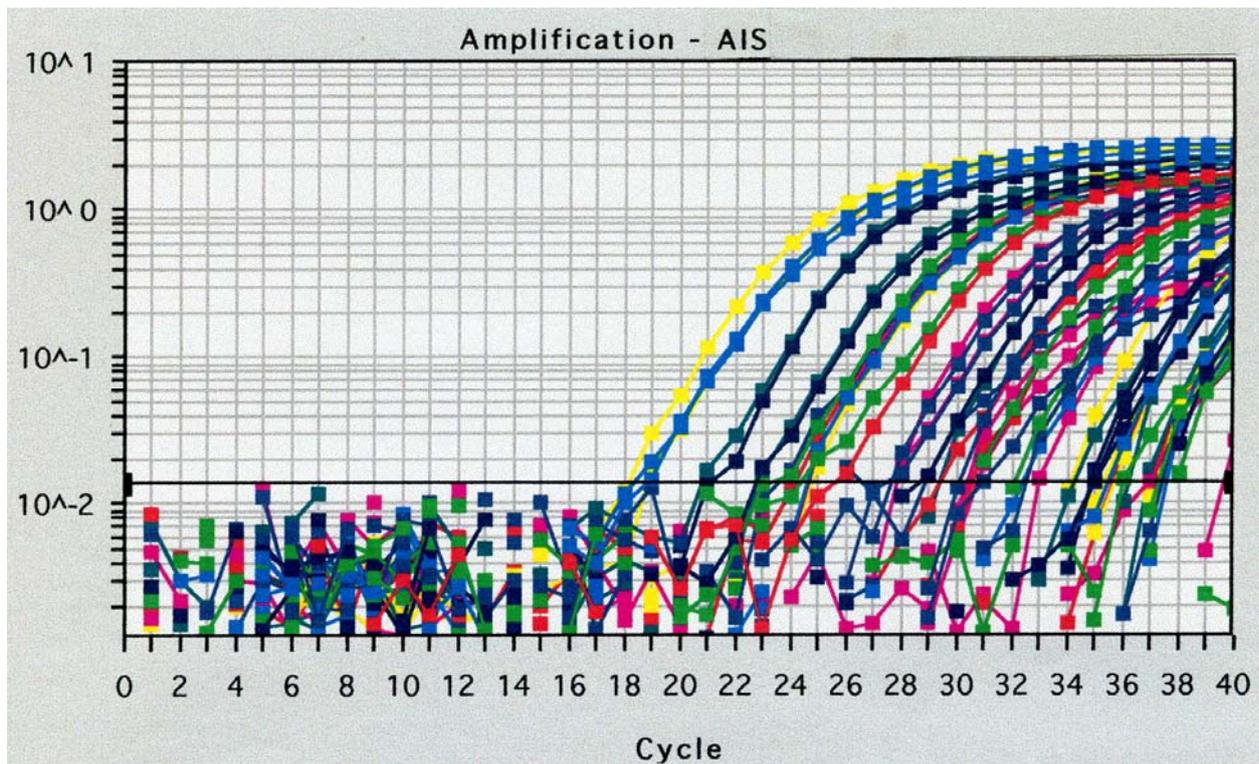
#### **Relative Quantifizierung (real-time TaqMan RT-PCR) als Nachweisverfahren für amplifizierte DNA**

Für die vorliegende Arbeit wurde das ABI Prism<sup>®</sup> 7700 Sequence Detection System der Firma Applied Biosystems, Foster City, USA (sogenannte real-time TaqMan RT-PCR) verwendet.

Die real-time PCR-Cycler zeichnen den Verlauf einer PCR „online“ auf und erlauben so die Detektion von amplifizierten PCR-Produkten während des Reaktionsablaufs, eine

Einschätzung der Qualität der PCR sowie die genaue Eingrenzung der exponentiellen Phase. In dieser Phase besteht ein direkter quantitativer Zusammenhang zwischen der Ausgangsmenge der Zielsequenz und der amplifizierten Produktmenge. Während der Amplifikation wird die emittierte Fluoreszenz während jedes PCR-Zyklus gemessen. Dadurch ist eine graphische Darstellung der Amplifikation möglich, die dem Anwender eine Beobachtung der Reaktion in Echtzeit erlaubt. Im Gegensatz zur konventionellen PCR (Endpunkt-PCR), bei der die DNA-Produkte in der Plateauphase nachgewiesen werden, erfolgt bei der real-time PCR die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR. Die real-time PCR ist zudem ein homogenes Assay, bei dem Amplifikation und Nachweis des PCR-Produkts simultan in einem Reaktionsgefäß möglich sind (Lee et al., 1993, Heid et al., 1996, Gibson et al., 1996, Bustin et al., 2005).

Die Quantifizierung beruht auf der Kinetik der PCR-Reaktion. Sie basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes (threshold). Nach Beendigung der PCR-Reaktion berechnet die Software des real-time PCR-Cyclers die Amplifikationsdaten jeder Reaktion gegen die Hintergrundfluoreszenz eines Leerwertes (ein Ansatz mit allen PCR-Komponenten außer cDNA). Ein typischer Kurvenverlauf wird in Abbildung 3 dargestellt.



**Abb. 3:** Beispielhafter Amplification Plot einer Probe aus der Risikogruppe (ABI Prism<sup>®</sup> 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Foster City, USA)

Anschließend wird automatisch mit der Funktion „comparative quantification“ der  $C_T$ -Wert jeder Probe bestimmt. Der Threshold cycle = „Schwellenwertzyklus“ ( $C_T$ ) ist der PCR-Zyklus, bei dem das generierte Reportersignal erstmals die Hintergrundfluoreszenz übersteigt und die exponentielle Phase beginnt. Der  $C_T$  verhält sich umgekehrt proportional zum Logarithmus der Ausgangs-DNA-Menge.

### Vergleichende $C_T$ -Methode

Die Zielsequenz (Zytokin-mRNA der ursprünglichen Probe) wird relativ in ihrer Expression zu einer zweiten, nicht verwandten Sequenz (Housekeeping-Gen: HPRT = Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) bestimmt. Dabei wird die unbekannte Menge der Zielsequenz quantitativ bezogen auf das Signal der zweiten Sequenz bestimmt (sogenannte endogene Amplifikationskontrolle bzw. Referenz). Die Co-Amplifizierung des Housekeeping-Genes erfolgt, um bei der Quantifizierung von mRNA auf Unterschiede

in der Gesamtmenge an RNA zu normalisieren. Vorteil der Normalisierung ist die Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse.

Mathematisch lässt sich dies in der Formel:

$$\Delta C_T = C_T (\text{Zytokin-mRNA}) - C_T (\text{HPRT})$$

ausdrücken. Die PCR-Grundgleichung  $Y = X (1+E)^n$  wird mathematisch umgewandelt zu  $X_N = 2^{-\Delta C_T}$ . Man erhält die relative Konzentration (X) der Zytokin-mRNA, normalisiert (N) mit dem Housekeeping-Gen HPRT (Schmittgen und Zakrajsek, 2000, Livak und Schmittgen, 2001, User Bulletin No. 2, 2001).

Die relativen Mengen der verschiedenen Zytokin-mRNA wurden in dieser Studie jeweils für die Risikogruppe und die Kontrollgruppe berechnet und daraus abgeleitet, um das Wievielfache sich die relative mRNA-Expression eines Zytokins in der einen von der anderen Gruppe unterscheidet.

### **2.3 Datenauswertung und statistische Analyse**

Die statistische Auswertung der Messergebnisse erfolgte rechnergestützt mit Hilfe der Computerprogramme Excel und SPSS 14.0 für Windows. Da bei den meisten Parametern nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte, sind jeweils die Mediane und Interquartilen-Abstände angegeben. Nach Beschreibung der allgemeinen Häufigkeitsverteilungen wurden Unterschiede in stetigen Parametern zwischen zwei unabhängigen Gruppen mittels Mann-Whitney-U-Test auf statistische Signifikanz geprüft. Unterschiede zwischen kategorialen Parametern wurden mit dem Chi-Quadrat-Test auf Signifikanz geprüft. Eine signifikante Beziehung zweier Merkmale wurde angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter fünf ( $p < 0,05$ ) bzw. ein Prozent ( $p < 0,01$ ) sowie ein Promille ( $p < 0,001$ ) lag.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Rahmendaten des Gesamtkollektivs

##### 3.1.1 Schwangere

Die Studie umfasste 30 Fälle mit klinischem Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom (Risikogruppe) und 30 Fälle ohne solch einen Verdacht (Kontrollgruppe), die das Patientenkollektiv von 60 Schwangeren bilden (Tabelle 1). 38 Schwangere (63,4 %) waren Erstparae, 17 Schwangere (28,3 %) Zweitparae und 5 Schwangere (8,3%) Multiparae. Die Zeitspanne zwischen Blasensprung und Geburt betrug im Median 13 h (Minimum: 4 h, Maximum: 164 h). In 35 Fällen (58,3 %) wurde das Kind spontan geboren, in 8 Fällen (13,3 %) erfolgte die Entbindung durch Vakuumextraktion, in einem Fall (1,7 %) durch Forceps und in 16 Fällen (26,7 %) durch sekundäre Sectio caesarea.

	<b>Median</b>	<b>Spannweite</b>
Alter (Jahre)	29,5	18 – 41
Gestationsalter (SSW)	39 + 5	33 + 5 – 42 + 0
Parität (n)	1	1 – 5
Zeitspanne zwischen Blasensprung und Geburt (h)	13	4 – 164
Fetale Herzfrequenz sub partu (spm)	150	120 - 180
Maternales CrP (mg/dl)*	1,5	0,2 – 7,5
Maternale Temperatur (°C)*	37,0	36,2 – 38,9

\*letzter Messwert vor Entbindung

**Tab. 1:** Klinische Charakteristika der Schwangeren im Gesamtkollektiv

### 3.1.1.1 Parameter des Amnioninfektionssyndroms bei den Schwangeren der Risikogruppe

Entsprechend der Definition für den Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom musste für den Einschluss in die Risikogruppe eine maternale Temperatur  $>38\text{ }^{\circ}\text{C}$  und mindestens ein weiterer Infektionsparameter (fetale Herzfrequenz  $> 150\text{ spm}$  oder maternales CrP  $> 2,0\text{ mg/dl}$ ) vorliegen. Zwei Infektionsparameter lagen bei 25 von 30 Schwangeren (83,3 %) vor, davon die Kombination maternale Temperaturerhöhung und fetale Tachykardie bei 11 Schwangeren und die Kombination maternale Temperatur- und maternale CrP-Erhöhung bei 14 Schwangeren. Eine Kombination aus allen drei Infektionsparametern lag bei 5 von 30 Schwangeren (16,7 %) vor.

### 3.1.2 Neugeborene

Da es sich in allen Fällen um Einlingsschwangerschaften handelte, umfasste die Untersuchung 60 Neugeborene (Tabelle 2). Von den 60 Neugeborenen waren 29 weiblichen (48,3 %) und 31 männlichen (51,7 %) Geschlechts. Die Frühgeborenenrate ( $< 37 + 0\text{ SSW}$ ) betrug 15 % (9 Kinder).

	Median	Spannweite
NapH	7,28	7,03 – 7,40
BE (mmol/l)	-3,50	-12,90 – 2,00
Apgar 5 min	10	4 - 10
Apgar 10 min	10	6 - 10
Geburtsgewicht (g)	3 300	2 250 – 4 300

**Tab. 2:** Klinische Charakteristika der Neugeborenen im Gesamtkollektiv

Insgesamt wurden 14 Neugeborene zur Neonatologie verlegt. Eine klinische Infektion im Sinne einer early-onset Infektion der Neugeborenen lag in 5 Fällen (8,3 %) vor, davon waren 2 Kinder Frühgeborene ( $< 37 + 0\text{ SSW}$ ), (Tabelle 3).

<b>Verlegungsindikationen</b>	<b>Häufigkeiten</b>	<b>%</b>
V.a. neonatale Infektion	5	8,3
Unreife/Atemstörung	7	11,6
SGA	1	1,7
Herzgeräusch	1	1,7
Nicht verlegt	46	76,7
Gesamt	60	100

**Tab. 3:** Verlegungsindikationen der Neugeborenen

### **3.1.2.1 Parameter des Amnioninfektionssyndroms bei den Neugeborenen der Risikogruppe**

Eine early-onset Infektion wurde bei 5 von 60 Neugeborenen (8,3 %) diagnostiziert. Dabei handelte es sich ausschließlich um Neugeborene von Schwangeren der Risikogruppe.

Im Hinblick auf die Infektionsparameter des Amnioninfektionssyndroms bei den 25 Neugeborenen ohne nachfolgende neonatale Infektion hatte präpartal bei 9 Kindern die Kombination aus maternaler Temperaturerhöhung und fetaler Tachykardie, bei 12 Kindern die Kombination aus maternaler Temperatur- und maternaler CrP-Erhöhung sowie bei 4 Kindern die Kombination aus allen drei Infektionsparametern vorgelegen.

Bei den 5 Neugeborenen mit nachfolgender early-onset Infektion hatte präpartal bei jeweils 2 Kindern die Kombination aus maternaler Temperaturerhöhung und fetaler Tachykardie bzw. maternaler Temperatur- und maternaler CrP-Erhöhung sowie bei einem Kind die Kombination aus allen drei Infektionsparametern vorgelegen.

### 3.1.2.2 Daten der Neugeborenen mit early-onset Infektion

Von den verschiedenen Parametern der early-onset Infektion trat eine erhöhte I/T-Ratio im Blutaussstrich bei allen infizierten Neugeborenen auf. Bei drei infizierten Neugeborenen zeigte sich ein CrP > 1,0 mg/dl. Bei zwei Neugeborenen wurde eine Leukozytose diagnostiziert, bei einem Neugeborenen eine Leukopenie. Ein Neugeborenes wies eine positive Blutkultur auf (Tabelle 4).

	<b>Neugeborene mit early-onset Infektion (n=5)*</b>
positive Blutkultur	1
CrP > 1,0 mg/dl	3
Leukozyten > 30 000/ $\mu$ l	2
Leukozyten < 5 000/ $\mu$ l	1
I/T-Ratio > 0,2	5

\* Mehrfachnennungen möglich

**Tab. 4:** Klinische Charakteristika der Neugeborenen mit early-onset Infektion

### 3.1.3 Plazentahistologie

In 58 Fällen konnte ein Ergebnis der histologischen Untersuchung der Plazenten auf Anzeichen einer Infektion erhoben werden, in 2 Fällen lagen keine Daten vor. Ein Normalbefund hinsichtlich einer Infektion wurde in 39 Fällen (65 %), eine Chorioamnionitis in 19 Fällen (31,7 %) histologisch nachgewiesen. Im Einzelnen zeigten davon 6 Plazenten das Minimalbild, 4 das Teilbild und 9 das Vollbild einer Chorioamnionitis nach den Kriterien von Vogel (1996), (Tabelle 5).

<b>Plazentahistologie</b>	<b>Häufigkeiten</b>	<b>%</b>
Normalbefund	39	65
Chorioamnionitis gesamt	19	31,7
Minimalbild	6	10
Teilbild	4	6,7
Vollbild	9	15
Fehlende Daten	2	3,3
Gesamt	60	100

**Tab. 5:** Plazentahistologie im Gesamtkollektiv

### **3.1.3.1 Neonatale Infektion und Plazentahistologie**

Von 53 Neugeborenen ohne Infektion ergab die Plazentauntersuchung in 39 Fällen einen Normalbefund (73,6 %) und in 14 Fällen eine Chorioamnionitis (26,4 %), davon in 5 Fällen ein Minimalbild, in 3 Fällen ein Teilbild und in 6 Fällen ein Vollbild.

Von den 5 Neugeborenen mit early-onset Infektion, sämtlich in der Risikogruppe, zeigte die Plazentauntersuchung in keinem Fall einen Normalbefund, in jeweils einem Fall ein Minimalbild bzw. Teilbild und in 3 Fällen ein Vollbild der Chorioamnionitis.

## **3.2 Vergleich der Studiengruppen**

### **3.2.1 Schwangere**

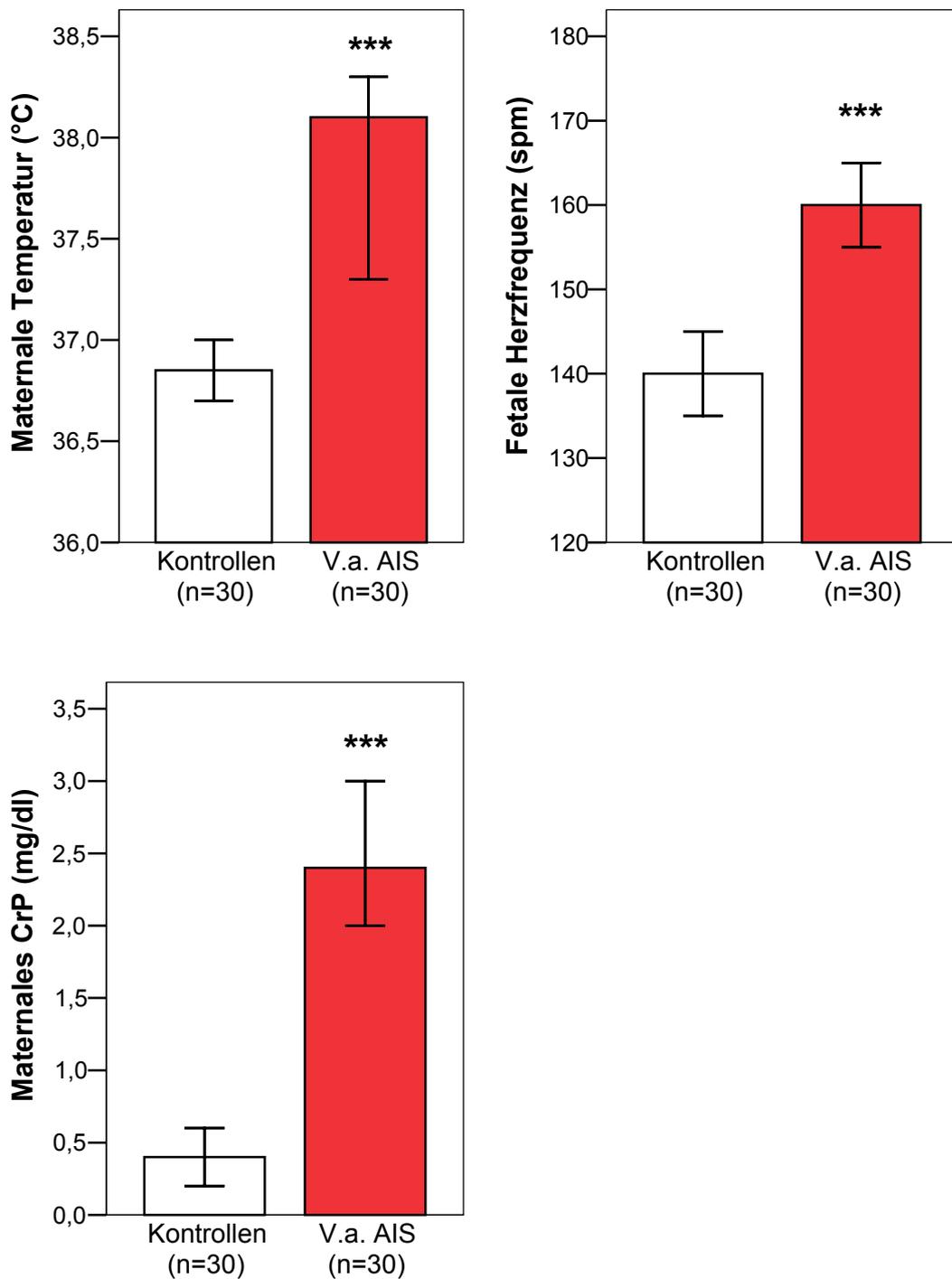
Entsprechend unserer Definition des klinischen Amnioninfektionssyndroms und der daraus abgeleiteten Einschlusskriterien bildeten zwei Gruppen mit jeweils 30 Schwangeren (Studiengruppen) das Gesamtkollektiv. Die klinischen Charakteristika der Schwangeren mit Verdacht auf Amnioninfektionssyndrom (Risikogruppe) und ohne diesen Verdacht (Kontrollgruppe) zeigt Tabelle 6. Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich Alter, Parität und Gestationsal-

ter. Die Dauer des vorzeitigen Blasensprungs war in der Risikogruppe statistisch signifikant länger.

	<b>Kontrollen (n=30)</b>	<b>V.a. AIS (n=30)</b>	<b>p</b>
Alter (Jahre)	27 (18 – 41)	30 (20 – 37)	0,4
Parität (n)	1 (1 – 5)	1 (1 - 5)	0,49
Gestationsalter (SSW)	39 + 4 (35 + 6 – 42 + 0)	39 + 6 (33 + 5- 41 + 5)	0,92
Zeitspanne zwischen Blasensprung und Geburt (h)	6 (4 – 19)	25 (6 – 164)	< 0,01

**Tab. 6:** Vergleich der klinischen Charakteristika der Schwangeren in den Studiengruppen (Mann-Whitney-U-Test), Median (Spannweite)

In Bezug auf die zum Einschluss in die Risikogruppe führenden Infektionsparameter maternale Temperatur, fetale Herzfrequenz und maternales CrP bestanden statistisch signifikante Unterschiede. Maternale Temperatur, fetale Herzfrequenz und maternales CrP waren jeweils in der Risikogruppe statistisch signifikant höher (Abbildung 4).



**Abb. 4:** Infektionsparameter maternale Temperatur, fetale Herzfrequenz und maternales CrP in Kontroll- und Risikogruppe (jeweils letzter Messwert vor Entbindung), \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Kontrollen (Mann-Whitney-U-Test), Median (95 % CI)

Tabelle 7 zeigt die Verteilung der Geburtsmodi in den Studiengruppen. In der Kontrollgruppe traten signifikant mehr Spontangeburt auf als in der Risikogruppe. Hinsichtlich der Häufigkeit einer sekundären Sectio caesarea bestand eine Tendenz zu einer höheren Rate in der Risikogruppe.

Geburtsmodus	Kontrollen (n=30)	V.a. AIS (n=30)	p
Spontan	22 (73,3)	13 (43,3)	0,02
Vakuumextraktion	3 (10)	5 (16,7)	0,45
Forzeps	0	1 (3,3)	0,31
Sekundäre Sektio	5 (16,7)	11 (36,7)	0,08
Gesamt	30 (100)	30 (100)	

**Tab. 7:** Vergleich der Geburtsmodi in den Studiengruppen (Chi-Quadrat-Test), Häufigkeiten (Prozent)

### 3.2.2 Neugeborene

Die Neugeborenen in den Studiengruppen zeigten hinsichtlich Nabelarterien-pH, Base excess und Geburtsgewicht keine signifikanten Unterschiede. Die Apgarwerte nach 5 und 10 Minuten waren in der Risikogruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (Tabelle 8).

	Kontrollen (n=30)	V.a. AIS (n=30)	p
NapH	7,29 (7,13 – 7,39)	7,28 (7,03 – 7,40)	0,48
BE (mmol/l)	-3,45 (-10,00 – 2,00)	-4,00 (-12,90 – 1,10)	0,51
Apgar 5 min	10 (7 – 10)	9 (4 – 10)	< 0,001
Apgar 10 min	10 (8 – 10)	10 (6 – 10)	0,001
Geburtsgewicht (g)	3 295 (2 680 – 4 300)	3 345 (2 250 – 4 270)	0,95

**Tab. 8:** Vergleich der klinischen Charakteristika der Neugeborenen in den Studiengruppen (Mann-Whitney-U-Test), Median (Spannweite)

Die dichotomisierte Auswertung der Apgarwerte nach 5 und 10 Minuten zeigte, dass diese signifikanten Unterschiede auf eine Häufung von Apgarwerten  $\leq 7$  in der Risikogruppe zurückzuführen war (Tabelle 9).

	Kontrollen (n=30)	V.a. AIS (n=30)	p
Apgar 5 min $\leq 7$	1	6	0,04
Apgar 10 min $\leq 7$	0	3	0,08

**Tab. 9:** Apgarwerte nach 5 und 10 Minuten (Chi-Quadrat-Test), Häufigkeiten

### 3.2.3 Plazentahistologie

Eine histologische Chorioamnionitis der Plazenta wurde bei 14 von 30 Schwangeren der Risikogruppe (46,7 %) und 5 von 30 Schwangeren der Kontrollgruppe (16,7 %) nachgewiesen. Dieser Unterschied war statistisch signifikant. Bei detaillierter Betrachtung der Grade einer histologischen Chorioamnionitis zeigten sich hinsichtlich der Häufigkeit von Minimal-, Teil- und Vollbild keine signifikanten Unterschiede zwischen den Studiengruppen (Tabelle 10).

Plazentahistologie	Kontrollen (n=30)	V.a. AIS (n=30)	p
Normalbefund	24 (80)	15 (50)	
Chorioamnionitis gesamt	5 (16,7)	14 (46,7)	0,02
Minimalbild	2 (6,7)	4 (13,4)	0,47
Teilbild	1 (3,3)	3 (10)	0,41
Vollbild	2 (6,7)	7 (23,3)	0,1
Fehlende Daten	1 (3,3)	1 (3,3)	
Gesamt	30 (100)	30 (100)	

**Tab. 10:** Plazentahistologie in den Studiengruppen (Chi-Quadrat-Test), Häufigkeiten (Prozent)

Innerhalb der Risikogruppe korrelieren das Auftreten einer early-onset Infektion und der Nachweis einer Chorioamnionitis signifikant miteinander. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman beträgt 0,43 (Tabelle 11).

<b>Plazentahistologie</b>	<b>Keine early-onset Infektion (n=25)</b>	<b>Early-onset Infektion (n=5)</b>	<b>p</b>
Normalbefund	15 (60)	0	
Chorioamnionitis gesamt	9 (36)	5 (100)	0,02
Minimalbild	3 (12)	1 (20)	0,87
Teilbild	2 (8)	1 (20)	0,68
Vollbild	4 (16)	3 (60)	0,09
Fehlende Daten	1 (4)	0	
Gesamt	25 (100)	5 (100)	

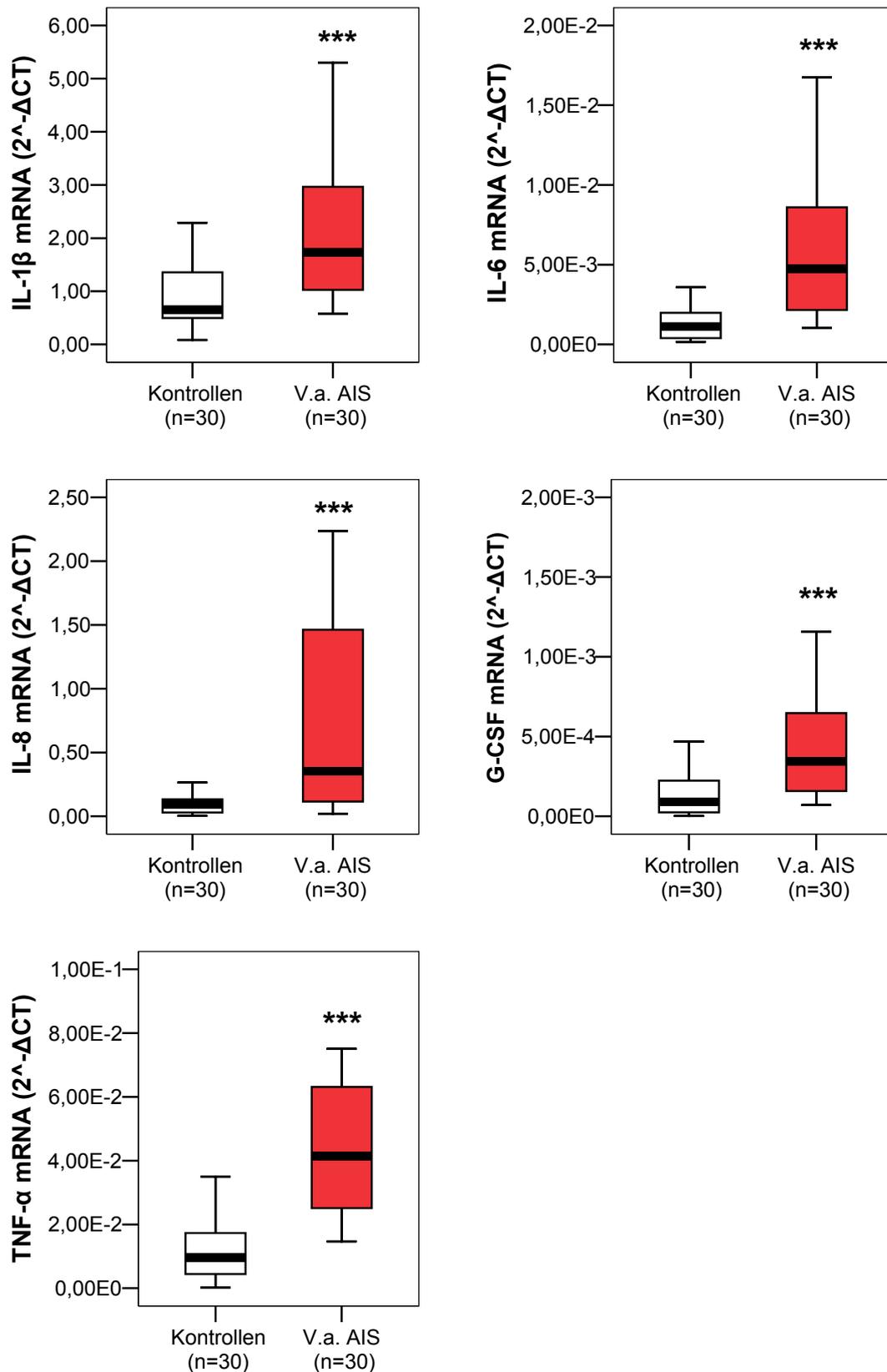
**Tab. 11:** Korrelation von early-onset Infektion und Plazentahistologie in der Risikogruppe (Chi-Quadrat-Test), Häufigkeiten (Prozent)

### **3.3 mRNA-Bestimmung der inflammatorischen und anti-inflammatorischen Zytokine**

#### **3.3.1 Vergleich der Studiengruppen**

##### **3.3.1.1 Inflammatorische Zytokine**

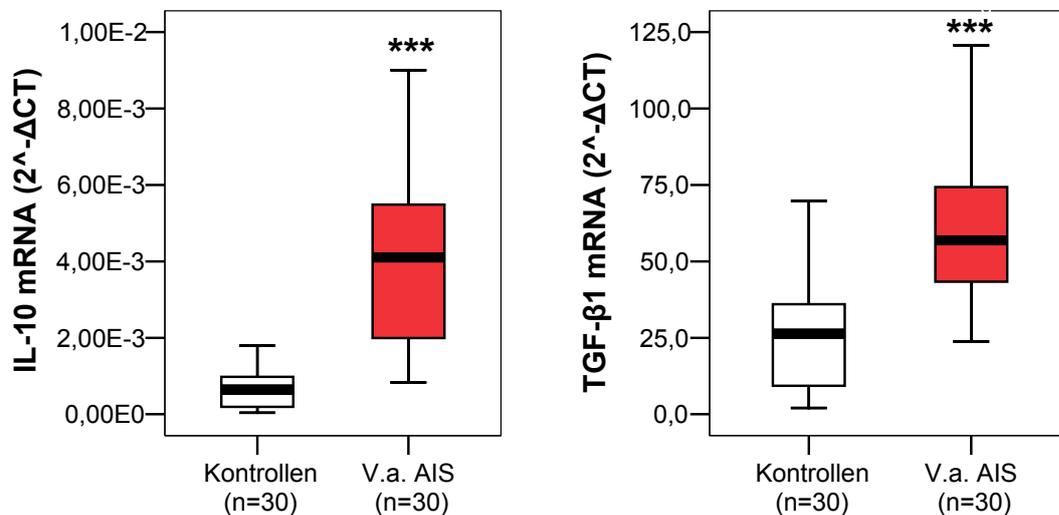
Die relativen Mengen an mRNA (normalisiert auf HPRT) der inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, G-CSF und TNF- $\alpha$  waren signifikant im Nabelschnurvenenblut Neugeborener von Schwangeren mit Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (jeweils  $p < 0,001$ ), (Abbildung 5). In der Risikogruppe war die relative mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  um das 2,7-Fache, von IL-6 um das 4,3-Fache, von IL-8 um das 3,8-Fache, von G-CSF um das 3,4-Fache und TNF- $\alpha$  um das 4,3-Fache gegenüber der Kontrollgruppe erhöht.



**Abb. 5:** Relative mRNA-Mengen der inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, G-CSF und TNF- $\alpha$  (normalisiert auf HPRT, dargestellt als  $2^{-\Delta CT}$ ) in Nabelschnurvenenblut von Schwangeren ohne Infektionszeichen (Kontrollen) und V.a. AIS, \*\*\* p < 0,001 vs. Kontrollen (Mann-Whitney-U-Test), Median (10./90. Perzentil)

### 3.3.1.2 Anti-inflammatorische Zytokine

Die relativen Mengen an mRNA (normalisiert auf HPRT) der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$ 1 waren im Nabelschnurvenenblut Neugeborener von Schwangeren mit Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (jeweils  $p < 0,001$ ), (Abbildung 6). In der Risikogruppe war die relative mRNA-Expression von IL-10 um das 6,8-Fache und von TGF- $\beta$ 1 um das 2,2-Fache gegenüber der Kontrollgruppe erhöht.

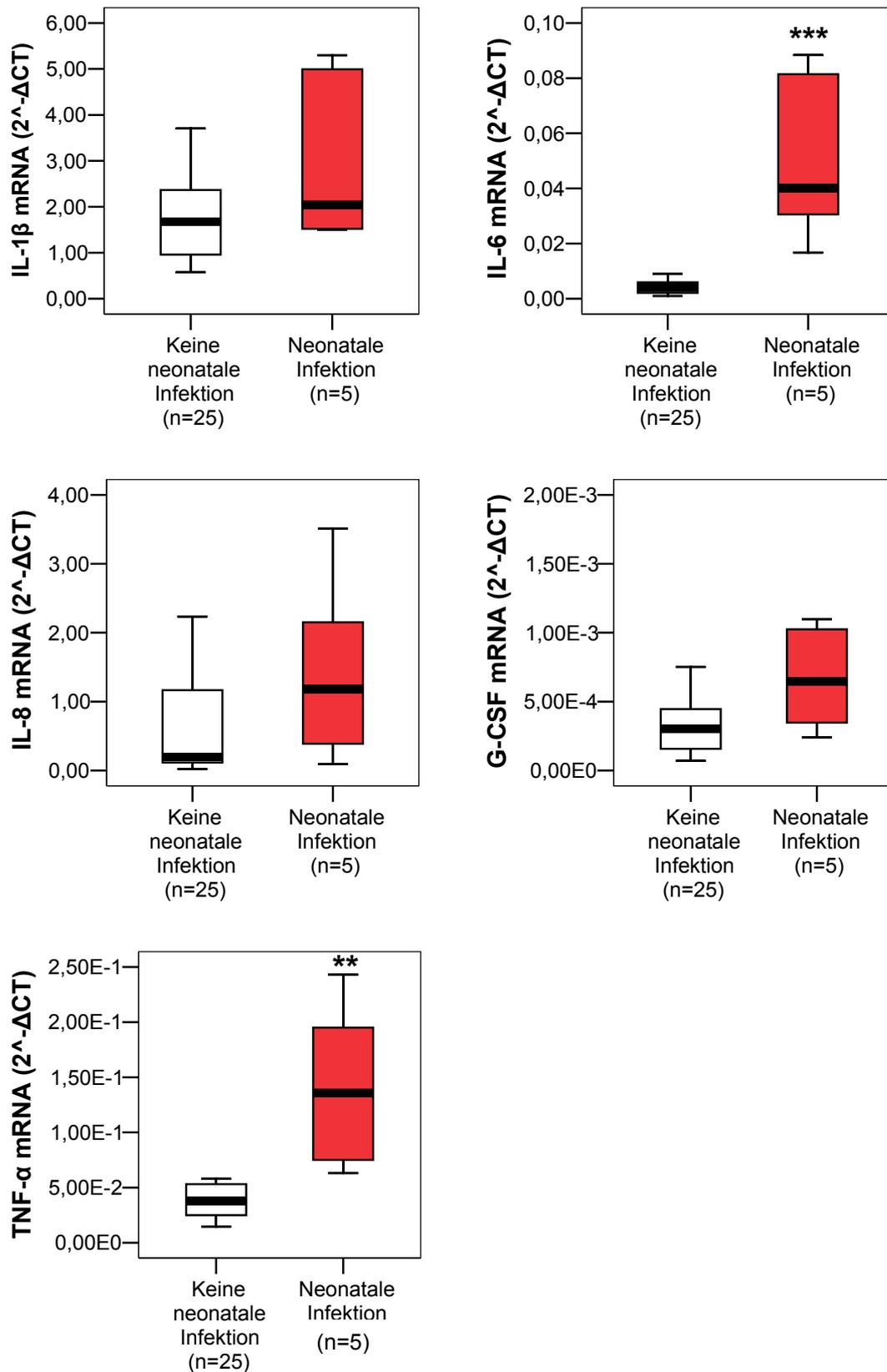


**Abb. 6:** Relative mRNA-Mengen der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$ 1 (normalisiert auf HPRT, dargestellt als  $2^{-\Delta CT}$ ) in Nabelschnurvenenblut von Schwangeren ohne Infektionszeichen (Kontrollen) und V.a. AIS, \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Kontrollen (Mann-Whitney-U-Test), Median (10./90. Perzentil)

### **3.3.2 Vergleich infizierter und nicht infizierter Neugeborener in der Risikogruppe**

#### **3.3.2.1 Inflammatorische Zytokine**

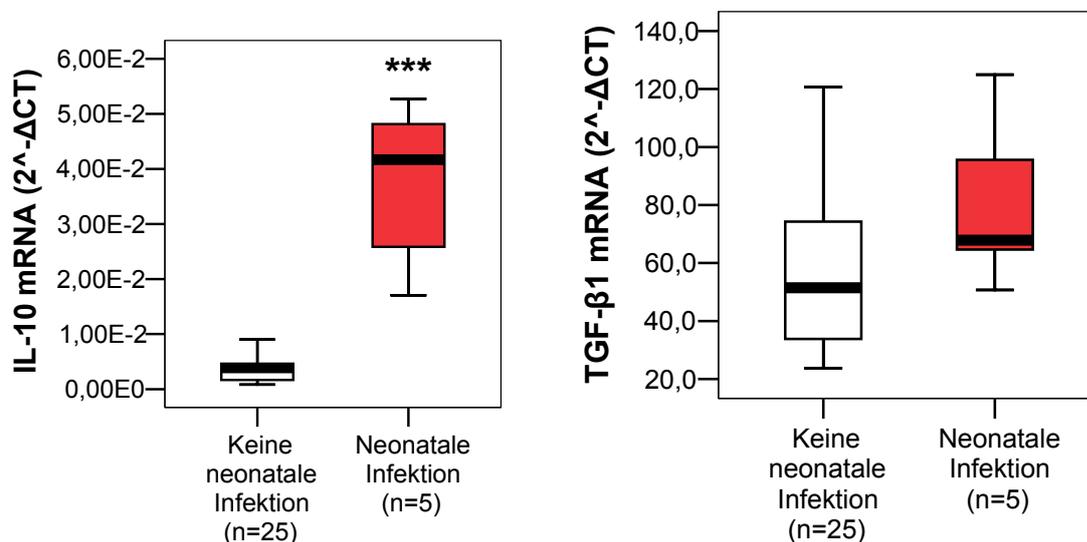
Im Nabelschnurblut der infizierten Neugeborenen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der relativen Mengen an mRNA (normalisiert auf HPRT) der inflammatorischen Zytokine IL-6 ( $p < 0,001$ ) und TNF- $\alpha$  ( $p < 0,01$ ) im Vergleich zu den nicht infizierten Neugeborenen. Die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-8, G-CSF waren im Vergleich von Neugeborenen mit und ohne Infektion tendenziell, aber nicht statistisch signifikant erhöht (Abbildung 7). Im Nabelschnurvenenblut Neugeborener mit neonataler Infektion war die relative mRNA-Expression von IL-6 um das 9,5-Fache und von TNF- $\alpha$  um das 3,6-Fache gegenüber den nicht infizierten Neugeborenen erhöht.



**Abb. 7:** Relative mRNA-Mengen der inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, G-CSF und TNF- $\alpha$  (normalisiert auf HPRT, dargestellt als  $2^{-\Delta Ct}$ ) in der Risikogruppe: Neugeborene ohne vs. Neugeborene mit neonataler Infektion, \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  vs. keine neonatale Infektion (Mann-Whitney-U-Test), Median (10./90. Perzentil)

### 3.3.2.2 Anti-inflammatorische Zytokine

Bei den infizierten Neugeborenen zeigte sich im Nabelschnurblut eine signifikante Erhöhung der relativen Menge an mRNA (normalisiert auf HPRT) des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zu den nicht infizierten Neugeborenen. Die relative Menge an mRNA des Zytokins TGF- $\beta$ 1 zeigte eine tendenzielle, aber nicht signifikante Erhöhung beim Vergleich von Neugeborenen mit und ohne Infektion (Abbildung 8). Im Nabelschnurvenenblut Neugeborener mit neonataler Infektion war die relative mRNA-Expression von IL-10 um das 11-Fache gegenüber der Kontrollgruppe erhöht.

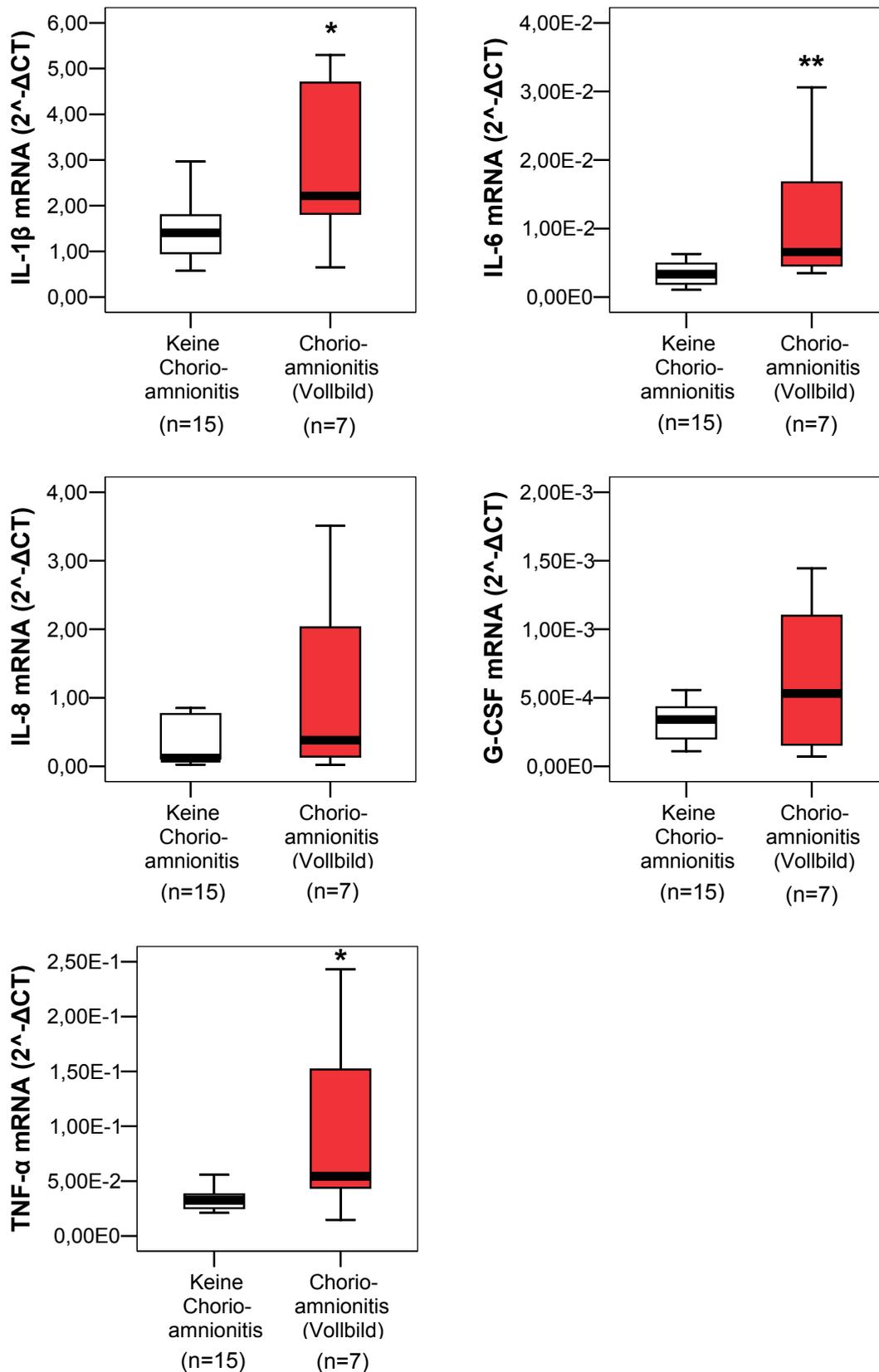


**Abb. 8:** Relative mRNA-Mengen der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$ 1 (normalisiert auf HPRT, dargestellt als  $2^{-\Delta C_t}$ ) in der Risikogruppe: Neugeborene ohne vs. Neugeborene mit neonataler Infektion, \*\*\*  $p < 0,001$  vs. keine neonatale Infektion (Mann-Whitney-U-Test), Median (10./90. Perzentil)

### **3.3.3 Vergleich histologische Chorioamnionitis und Normalbefunde in der Risikogruppe**

#### **3.3.3.1 Inflammatorische Zytokine**

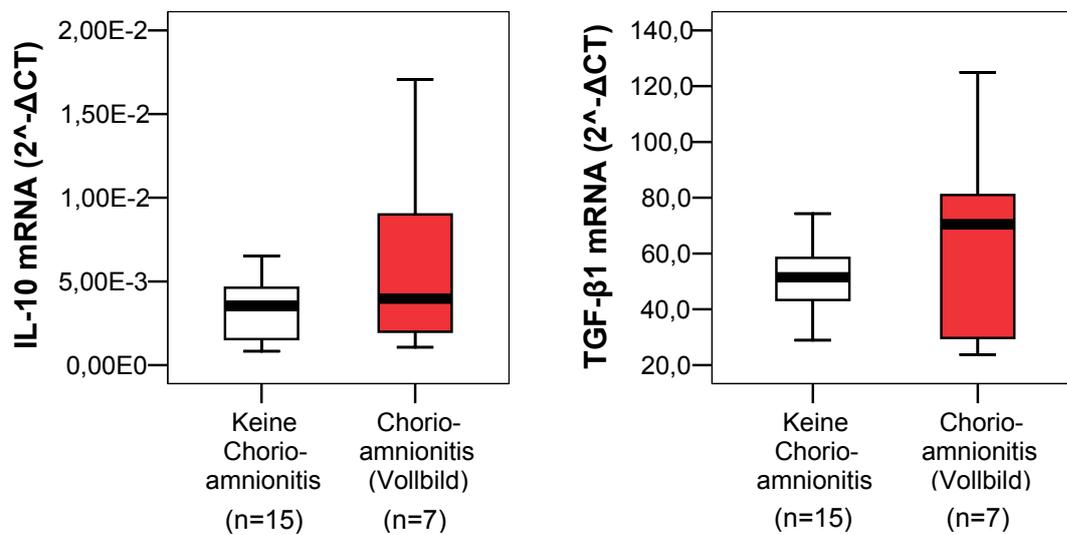
Die relativen Mengen an mRNA (normalisiert auf HPRT) der inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  ( $p < 0,05$ ), IL-6 ( $p < 0,01$ ) und TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) waren signifikant erhöht bei Schwangeren mit Verdacht auf Amnioninfektionssyndrom, in deren Plazenten das Vollbild einer Chorioamnionitis histologisch nachgewiesen wurde, gegenüber solchen mit Normalbefunden. Die Zytokine IL-8 und G-CSF waren tendenziell, aber nicht statistisch signifikant erhöht (Abbildung 9). Im Nabelschnurvenenblut Schwangerer, bei denen ein Vollbild einer Chorioamnionitis histologisch diagnostiziert wurde, war die relative mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  um das 1,6-Fache, von IL-6 um das 2-Fache und TNF- $\alpha$  um das 1,7-Fache gegenüber der Kontrollgruppe erhöht.



**Abb. 9:** Relative mRNA-Mengen der inflammatorischen Zytokine IL-1β, IL-6, IL-8, G-CSF und TNF-α (normalisiert auf HPRT, dargestellt als  $2^{-\Delta Ct}$ ) in der Risikogruppe: Keine Chorioamnionitis vs. Vollbild einer Chorioamnionitis, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , vs. keine Chorioamnionitis (Mann-Whitney-U-Test), Median (10./90. Perzentil)

### 3.3.3.2 Anti-inflammatorische Zytokine

Die relativen Mengen an mRNA (normalisiert auf HPRT) der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$ 1 waren tendenziell, aber nicht signifikant unterschiedlich bei Schwangeren mit Verdacht auf Amnioninfektionssyndrom, in deren Plazenten das Vollbild einer Chorioamnionitis bzw. ein Normalbefund nachgewiesen wurde (Abbildung 10).



**Abb. 10:** Relative mRNA-Mengen der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$ 1 (normalisiert auf HPRT, dargestellt als 2<sup>-ΔCt</sup>) in der Risikogruppe: Keine Chorioamnionitis vs. Vollbild einer Chorioamnionitis, Median (10./90. Perzentil)

## 4 Diskussion

Das Amnioninfektionssyndrom ist eine der Hauptursachen mütterlicher und neonataler Morbidität und Mortalität mit einer Inzidenz von 0,1 bis 4 % aller Geburten (Gibbs und Duff, 1991). Seine Besonderheit besteht darin, dass zwei Patienten, Mutter und Fet bzw. Neugeborenes, betroffen sein können. Bislang sind die Diagnose des Amnioninfektionssyndroms und einer dadurch bedingten neonatalen early-onset Infektion problematisch. Voraussetzung für eine frühzeitige und adäquate Therapie betroffener Neugeborener ist jedoch ein suffizienter Marker zur Feststellung dieser Infektion.

Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen intrauteriner Infektion der Schwangeren sowie Infektion des Feten und Neugeborenen führten zum Konzept des „fetal inflammatory response syndrome“ (Gomez et al., 1998). Seitdem wurden zahlreiche Studien über die Rolle der Zytokine als Mediatoren dieser Infektion und ihren möglichen Vorhersagewert vorgelegt. Zytokine spielen eine zentrale Rolle im Mechanismus des infektionsbedingten Beginns von Früh- und Termingeburten, aber auch einer Erkrankung des Feten und Neugeborenen (Romero et al., 2006, Romero et al., 2007a). Der Nachweis der Konzentrationen einzelner Zytokine auf Proteinebene im Nabelschnurblut wurde bislang mittels Immunoassays (ELISA) (u. a. Messer et al., 1996, Lehrnbecher et al., 1996, Salafia et al., 1997, Weeks et al., 1997, Smulian et al., 1999b, Büscher et al., 2000, Rogers et al., 2002, Hatzidaki et al., 2005, Tasci et al., 2006) erbracht. In wenigen Arbeiten wurde die Zytokin-mRNA-Expression im Nabelschnurblut mittels konventioneller RT-PCR (u. a. Li et al., 1995, Tsutsumi et al., 1996, Berner et al., 2000, Berner et al., 2002) nachgewiesen.

Der qualitative Unterschied der vorliegenden Arbeit zu vergleichbaren prospektiven Studien liegt in der Untersuchung eines breiten Spektrums möglicher als Frühmarker infrage kommender inflammatorischer und zusätzlich anti-inflammatorischer Zytokine. Dadurch wird die fetale und neonatale Immunkompetenz erfasst. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, prospektiv die relativen Mengen der auf mRNA-Ebene exprimierten inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, G-CSF und TNF- $\alpha$  und anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$ 1 in mononukleären Zellen aus Nabelschnurvenenblut eines Kollektivs von 30 Schwangeren ohne klinischen Verdacht auf ein

Amnioninfektionssyndrom (Kontrollgruppe) und 30 Schwangeren mit klinischem Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom (Risikogruppe) zu untersuchen. Zum ersten Mal wird in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis der Zytokin-mRNA-Expression in mononukleären Zellen des Nabelschnurbluts die real-time TaqMan RT-PCR angewendet.

Kontroll- und Risikogruppe unterschieden sich statistisch signifikant hinsichtlich der für den Verdacht auf das Vorliegen eines Amnioninfektionssyndroms relevanten Einschlussparameter maternale Temperatur und CrP sowie fetale Herzfrequenz. Ein weiterer Unterschied bestand in der Zeitspanne zwischen Blasensprung und Geburt. Diese war in der Gruppe mit klinischem Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom signifikant erhöht. In der Studie von Soper et al. (1989) erwies sich eine Blasensprungdauer bis zum Einsetzen von Geburtswehen von mehr als 12 Stunden als stärkster Vorhersageparameter für die nachfolgende Entwicklung eines Amnioninfektionssyndroms. Seaward et al. (1997) bestätigten dies für einen Zeitraum von mehr als 24 Stunden. Bei den Geburtsmodi zeigte sich in der Kontrollgruppe eine signifikant höhere Rate an Spontangeburt, während in der Risikogruppe eine Tendenz zu einer höheren Rate an sekundären Sektionen bestand. Duff et al. (1983) berichten über ein erhöhtes Risiko für eine Schnittentbindung bei Patientinnen mit Amnioninfektionssyndrom. Sie fanden eine Inzidenz von 34 % sekundärer Sektionen wegen Geburtsstillstands bei Patientinnen mit zunächst spontanen Wehen, die eine intraamniotische Infektion entwickelten.

Speziell betrachtet wurden die mRNA-Expressionsunterschiede der Zytokine zwischen Kontroll- und Risikogruppe hinsichtlich eines Verdachts auf ein Amnioninfektionssyndrom. Innerhalb der Risikogruppe wurden die mRNA-Expressionsunterschiede der Zytokine im Hinblick auf eine neonatale early-onset Infektion zwischen Neugeborenen ohne und mit early-onset Infektion untersucht. Des Weiteren wurden innerhalb der Risikogruppe die mRNA-Expressionsunterschiede der Zytokine im Hinblick auf ein histologisch nachgewiesenes Vollbild einer Chorioamnionitis zwischen Plazenten ohne und mit dem Vollbild einer Chorioamnionitis untersucht.

#### **4.1 Anwendung der real-time TaqMan RT-PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression der Zytokine**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zytokin-Genexpression in vivo in mononukleären Zellen von Nabelschnurvenenblut nach der Geburt mittels real-time TaqMan RT-PCR untersucht. Zytokindiagnostik und damit Quantifizierung der Zytokinexpression kann in vivo und in vitro durchgeführt werden. Man kann sowohl die Genexpression, die Zytokinproteinbildung als auch die Zytokinwirkung erfassen.

Der in vivo-Nachweis von Zytokinen hat die direkte Detektion der Zytokinpräsenz in Blut, Körperflüssigkeiten oder Geweben zum Ziel. Er ist wegen der Redundanz von Entzündungsreaktionen und Pleiotropie der Zytokinwirkung nicht für eine Differentialdiagnostik geeignet, sondern eher für die Bestimmung der Aktivität eines Prozesses, z. B. eines unerwünschten Immunprozesses wie Transplantatabstoßung, Trauma (Asadullah et al., 1997) oder im Fall der vorliegenden Arbeit einer infektiösaassoziierten Pathogenese.

Da Zytokine ihre biologische Wirkung bereits bei Konzentrationen im pikomolaren Bereich realisieren, werden hohe Ansprüche an die analytische Sensitivität der Nachweissysteme gestellt. Die diagnostische Relevanz von Zytokinbestimmungen wird durch die für die meisten Zytokine kurze biologische Halbwertszeit, die sich im Minutenbereich bewegt, im Blut bzw. Plasma, infolge Bindung an zellmembrangebundene Rezeptoren, Plasmaproteine oder lösliche Rezeptoren und proteolytischen Abbau, eingeschränkt. Eine Limitierung der Aussagekraft resultiert auch aus der Tatsache, dass Zytokine meist nur für wenige Stunden und im Allgemeinen lokal und nicht systemisch produziert werden (Volk et al., 2008). Insofern kommt der Präanalytik eine wichtige Rolle zu. Da Zytokine im Vollblut nicht sehr stabil sind, wurde in der vorliegenden Arbeit das Nabelschnurblut unmittelbar nach Abnahme verarbeitet, d. h. die Erythrozyten lysiert, danach das Hämoglobin daraus entfernt und die Proben für die weitere Analytik bei -80 °C eingefroren.

Der direkte Zytokinnachweis auf Proteinebene ist hinsichtlich Qualität und Vergleichbarkeit durch die Einführung internationaler Standards und semiautomatischer Testsysteme verbessert worden, hat sich jedoch bisher nur für bestimmte Indikationen in der

Routinediagnostik etabliert. Immunoassaymethoden wie ELISA oder Cytometry-Beads-Assays (CBA) erlauben in der klinischen Praxis die Quantifizierung der Zytokinexpression aus Plasma oder Serum. Sie wird inzwischen vor allem zur Erfassung unerwünschter oder überschießender Entzündungsreaktionen bei systemischen Entzündungsprozessen genutzt. In der Intensivmedizin haben sich die Marker IL-6, IL-8, IL-10 und TNF- $\alpha$  als Prognoseparameter bewährt und in der Routine etabliert. Infolge Pleiotropie und Redundanz des Zytokinnetzwerks stellen Zytokine keine krankheitsspezifischen Marker dar. Da eine Verschiebung im Zytokingleichgewicht mit dem Ausmaß der krankheitsspezifischen Schädigung korrelieren kann, dienen sie vielmehr zur Beurteilung der Aktivität einer bestimmten Erkrankung. So liegen relevante Zytokinkonzentrationen vor allem bei systemischen Erkrankungen, wie z. B. beim SIRS, die zu einer Aktivierung des spezifischen oder unspezifischen Immunsystems führen, im Blut vor. Zytokinbestimmungen im Plasma/Serum werden zur Beurteilung der Krankheitsprognose, für die Einschätzung des Therapieerfolgs, aber auch zur Frühdiagnostik eingesetzt. Eine neonatale Sepsis kann bereits in den ersten Stunden nach der Geburt durch Bestimmung der IL-6 und IL-8-Konzentration in Plasma/Serum der Neugeborenen mit hoher diagnostischer Sensitivität und Spezifität vorausgesagt werden, was mit einer CrP-Bestimmung erst 12 - 24 Stunden später möglich ist (Ng und Lam, 2006, Volk et al., 2008). Die Zytokinbestimmung auf Proteinebene im Nabelschnurplasma bei Schwangeren mit einem Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom ist inzwischen von vielen Arbeitsgruppen durchgeführt worden, hat aber noch keinen Eingang in die klinische Routine gefunden (Messer et al., 1996, Lehrnbecher et al., 1996, Weeks et al., 1997, Smulian et al., 1999b, Büscher et al., 2000).

Während durch die Bestimmung der Proteinkonzentration der Zytokine mittels ELISA der direkte Nachweis des bereits gebildeten Zytokins auf Proteinebene erfolgt, wird mit der Bestimmung der Zytokin-Genexpression der frühestmögliche Zeitpunkt der Zytokinbildung auf mRNA-Ebene erfasst.

Von ruhenden Immunzellen wird keine oder nur wenig Zytokin-mRNA exprimiert. Werden sie jedoch aktiviert, kommt es innerhalb weniger Stunden zur Transkription der Zytokingene und zum verminderten Abbau der mRNA. Dies führt zu einem starken Anstieg der spezifischen mRNA in der Zelle. Da rein qualitative Aussagen von geringer Relevanz sind, ist in jedem Fall eine Quantifizierung notwendig. Der Zytokin-mRNA-

Nachweis mittels real-time TaqMan RT-PCR und damit die reproduzierbare Quantifizierung der Genexpression erreicht dabei eine hohe Nachweisempfindlichkeit. Auf der Ebene der RNA können wenige Kopien je Probe detektiert werden. Sie ist vor allem für den in vivo-Nachweis einer Zytokin-Expression aus frisch gewonnenen Zell- bzw. Gewebeproben geeignet (Souaze et al., 1996, Kruse et al., 1997). Hierzu muss die mRNA zunächst aus dem Gewebe oder den Blutzellen isoliert und in eine cDNA umgeschrieben werden. Im Anschluss erfolgt die Amplifizierung der gewünschten Nukleinsäuresequenzen des jeweiligen Zytokins unter Einsatz spezifischer Primer. Über Fluoreszenzmarker werden die PCR-Produkte quantifiziert (Dallman et al., 1991, Asadullah et al., 1997, Volk et al., 2008).

Die für den Zytokin-mRNA-Nachweis in dieser Arbeit genutzte quantitative real-time TaqMan RT-PCR hat verschiedene Vorteile gegenüber der konventionellen RT-PCR (Heid et al., 1996, Gibson et al., 1996). Der Hauptfaktor für die Exaktheit dieser Methode ist die Bestimmung der  $C_T$ -Werte innerhalb der exponentiellen Phase der Amplifikation im Vergleich zur Endpunktbestimmung bei der konventionellen RT-PCR. Dadurch ist eine Quantifizierung in einem größeren Bereich als bei der konventionellen RT-PCR möglich. Die real-time TaqMan RT-PCR bietet eine 100- bis 1000-fach höhere Sensitivität als die konventionelle RT-PCR. Die Nachweisgrenze eines Amplifikats liegt zwischen 2 bis 20 pg gegenüber 2 bis 4 ng im Agarose-Gel. Der Einsatz fluorogener Sonden erhöht ebenfalls die Sensitivität und Spezifität. Außerdem erhöht die Eliminierung von Schritten nach der Amplifikation, wie die Agarose-Gel-Auswertung, die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit des Assays und vermindert das Kontaminationsrisiko. Dadurch wird auch ein hoher Probendurchsatz möglich, der zur Zeitersparnis beiträgt. Die real-time TaqMan RT-PCR-Methode stellt, sobald die PCR-Bedingungen optimiert sind und der Assay validiert ist, einen schnellen, mit geringen DNA-Mengen auskommenden, einfachen Nachweistest dar. Das PCR-Ergebnis wird nach dem Reaktionsende bestimmt, was eine Gesamtdauer von 2 bis 3 Stunden bis zum Resultat bedeutet (Bustin et al., 2005). Die direkte oder „online“ Aufzeichnung des PCR-Verlaufs ermöglicht zudem eine sofortige Bewertung der Reaktion, was bei den bisher angewandten PCR-Methoden nicht gegeben ist. Sie zeigt aber auch, wie empfindlich der Test auf Störungen verschiedener Faktoren reagiert. Besonders zu erwähnen ist hier die Qualität der DNA und deren Reinheit. Verunreinigungen aus der Präparation senken die PCR-Effizienz. Ebenso sind Pippettierungenauigkeiten direkt in den  $C_T$ -Doppelwerten sicht-

bar. Trotzdem oder gerade wegen des Sichtbarwerdens der die PCR beeinflussenden Faktoren ist die Quantifizierung über die real-time RT-PCR mit ihren Kontrollmöglichkeiten sehr viel sicherer und reproduzierbarer in der Ergebnisfindung als die konventionelle RT-PCR. Nachteile sind nach wie vor die hohen Anschaffungskosten für die real-time TaqMan PCR-Cycler und für die Reagenzien, vor allem die Sonden. Unterschiedliche Programme für die Auswertung erschweren die Vergleichbarkeit der Ergebnisse, z. B. der Fluoreszenzdaten und  $C_T$ -Werte. Außerdem darf eine bestimmte Produktgröße (100 - 300 bp bei der TaqMan PCR) nicht überschritten werden (Klein, 2002, Bustin und Nolan, 2004).

Die Zytokin-Genexpressions-Analyse wird noch relativ selten im klinischen Alltag, z. B. in der Transplantationsmedizin, angewendet. In der Forschung hingegen ist sie inzwischen etabliert. Beim Amnioninfektionssyndrom wurde die konventionelle RT-PCR von Li et al. (1995), Singh et al. (1996), Berner et al. (1998) und Berner et al. (2000) genutzt, um die Zytokin-mRNA-Expression im Nabelschnurblut nachzuweisen.

#### **4.2 Rolle der inflammatorischen und anti-inflammatorischen Zytokine bei Verdacht auf Amnioninfektionssyndrom**

Eine im Körper ablaufende Entzündungsreaktion wie das Amnioninfektionssyndrom bedarf einer sorgfältigen Kontrolle, um eine Gewebsschädigung oder eine systemische Manifestation wie das SIRS oder eine mögliche neonatale Sepsis zu vermeiden (Asadullah et al., 1997). Dabei sind Zytokinbildung und -wirkung vielfältigen Kontrollmechanismen auf verschiedenen Ebenen von der Transkription des Zytokingens bis zur Wirkung auf den Zytokinrezeptor unterworfen. Bei der Regulation von Entzündungsprozessen spielt das Zusammenwirken von inflammatorischen Zytokinen und gegenregulatorisch wirksamen anti-inflammatorischen Zytokinen eine wichtige Rolle (Volk et al., 2008). Inflammatorische und anti-inflammatorische Zytokine werden als zentrale pathophysiologische Mediatoren angesehen, die bei intrauterinen Infektionen gebildet und im Nabelschnurblut oder Fruchtwasser nachgewiesen werden können. Durch bakterielle Stimuli oder andere inflammatorische Mediatoren (z. B. Endotoxine) werden immunkompetente Zellen (Makrophagen, Monozyten, B- und T-Lymphozyten) aktiviert, die wiederum Zytokine sezernieren.

Der Nachweis von Zytokinen gelingt in allen Kompartimenten des materno-fetalen Reaktionsraums. So fanden Romero et al. (1993) signifikant höhere IL-6-Konzentrationen im Fruchtwasser bei Schwangeren mit einer positiven Fruchtwasserkultur (aerobe und anaerobe Bakterien, Mykoplasmen) im Vergleich zu Schwangeren mit einer negativen Fruchtwasserkultur (Median 35 900 pg/ml vs. 1 700 pg/ml). In einer Studie von Stallmach et al. (1995) wird beschrieben, dass Frauen mit einem Amnioninfektionssyndrom signifikant höhere IL-6-Konzentrationen im Serum und im Fruchtwasser aufweisen als Frauen ohne eine solche Infektion. Seit den 90er-Jahren konzentriert sich die Untersuchung von Zytokinen zur Erfassung eines materno-fetalen Infektionsgeschehens vor allem auf das Nabelschnurblut. Seine leichte Gewinnbarkeit prädestinierte es zu Studien über intrazytoplasmatische Konzentrationen immunregulatorischer Zytokine auf Proteinebene bei vermutlich infizierten und nicht infizierten Kollektiven mittels ELISA und RT-PCR.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression auf mRNA-Ebene sowohl inflammatorischer als auch anti-inflammatorischer Zytokine mittels der real-time TaqMan RT-PCR gemessen. Die mRNA-Expression der inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, G-CSF und TNF- $\alpha$  und auch der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$ 1 war im Nabelschnurblut von Schwangeren mit einem Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom signifikant gegenüber gesunden Schwangeren erhöht. Der parallele Nachweis der Expression inflammatorischer und anti-inflammatorischer Zytokine spricht für eine Überaktivierung des Monozyten-Makrophagen-Systems. Erhöhte Zytokin-mRNA-Expressionen erlauben keine differentialdiagnostischen Schlussfolgerungen, sondern sind lediglich Marker für einen ablaufenden Entzündungsprozess unterschiedlichster Genese (Volk et al., 2008).

Wenige Arbeiten wiesen bisher Zytokin-mRNA im Nabelschnurblut mittels konventioneller RT-PCR nach. Tsutsumi et al. (1996) infizierten mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut in vitro mit dem respiratory syncytial virus (RSV). Mit Hilfe der RT-PCR untersuchten sie u. a. die mRNA-Expression der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  in diesen Zellen. Innerhalb von 2 Stunden nach Infektion mit RSV konnte eine signifikante mRNA-Expression der untersuchten Zytokine gezeigt werden.

Li et al. (1995) untersuchten maternales und Nabelschnurblut von Schwangeren mit Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom ( $n = 12$ ) und von gesunden Schwangeren ( $n = 12$ ). Mittels ELISA wiesen sie signifikant höhere Konzentrationen von G-CSF sowohl im Nabelschnurblut ( $2\,729 \pm 974$  pg/ml vs.  $51 \pm 17$  pg/ml) als auch im maternalen Blut Schwangerer mit Verdacht auf Amnioninfektionssyndrom nach. Mittels konventioneller RT-PCR wurde die relative mRNA-Expression von G-CSF im maternalen und Nabelschnurblut bestimmt. Im Nabelschnurblut konnten nur geringe Mengen an G-CSF-mRNA nachgewiesen werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen Schwangeren mit Verdacht auf Amnioninfektionssyndrom und gesunden Schwangeren bestand nicht. Hingegen wurde im maternalen Blut Schwangerer mit Verdacht auf Amnioninfektionssyndrom eine höhere mRNA-Expression von G-CSF, als bei gesunden Schwangeren detektiert. Singh et al. (1996) untersuchten IL-6 im Nabelschnurblut reifer Neugeborener. Die mittels ELISA gemessenen IL-6-Konzentrationen waren im Nabelschnurblut der Schwangeren, die klinische Zeichen eines Amnioninfektionssyndroms (8/32) zeigten, signifikant gegenüber Schwangeren ohne Infektionszeichen erhöht. Zusätzlich wurde mit konventioneller RT-PCR versucht, IL-6-mRNA im Nabelschnurblut nachzuweisen, was in vivo nicht gelang. Nach in vitro Stimulation von aus dem Nabelschnurblut gesunder Schwangerer isolierten mononukleären Zellen mit LPS war jedoch eine deutliche IL-6-mRNA-Expression nachweisbar. Die Autoren vermuteten, dass die im Nabelschnurblut nachgewiesenen IL-6-Konzentrationen placentaren oder maternalen Ursprungs waren.

Berner et al. (2000) legten die erste Studie vor, die eine erhöhte Zytokingen-Transkription bei Neugeborenen mit Sepsis auf mRNA-Ebene zeigte. In der Gruppe von Neugeborenen, bei denen der Verdacht auf eine early-onset Sepsis bestätigt wurde, ließ sich mit konventioneller RT-PCR auf mRNA-Ebene eine signifikant höhere Expression der Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  gegenüber gesunden Neugeborenen oder solchen mit unbestätigtem Sepsisverdacht nachweisen. Die mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, eine G-CSF-mRNA-Expression war nicht nachweisbar. Aufgrund dieser Ergebnisse postulierten die Autoren, dass die Zytokinproduktion endogen durch den Feten bzw. das Neugeborene erfolgt und die im Nabelschnurblut nachweisbaren Zytokine weder die maternale noch placentare Zytokin-Produktion reflektieren. Zuvor hatte diese Arbeitsgruppe an Neugeborenen mit bestätigtem Verdacht auf eine early-onset Sepsis erhöhte Plasmakon-

zentrationen der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, G-CSF und TNF- $\alpha$  auf Proteinebene nachgewiesen. Auf mRNA-Ebene gelang nur der Nachweis einer erhöhten Expression von TNF- $\alpha$ , nicht aber von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und G-CSF (Berner et al., 1998). Als mögliche Erklärung dieser Diskrepanz und der zu den Ergebnissen von Singh et al. (1996) werden technische Probleme bei der Verarbeitung der mRNA aus Nabelschnurblut, vor allem die nicht sofortige Aufarbeitung des Nabelschnurbluts nach der Geburt, vermutet.

Die Frage nach dem Ursprung der Zytokine im Nabelschnurblut wurde auch von Aaltoonen et al. (2005) aufgegriffen. Sie zeigten in einem ex vivo-Modell mit Plazenten Reifgeborener, dass die inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  die Plazentaschranke nicht überwinden können. Sie folgerten daraus, dass Zytokine und damit die Immunantwort in Fruchtwasser und fetalem Blut fetalen Ursprungs sein müssen.

Die Ergebnisse lassen eine direkte Beteiligung fetaler Immunzellen am Entzündungsprozess mit Auslösung der Reaktionskaskade der fetalen und neonatalen Immunantwort auf eine intraamniotische Infektion vermuten. Feten sind in der Lage, eine Immunantwort auf inflammatorische Reize zu geben (Romero et al., 2007b). Yoon et al. (2003) wiesen explizit darauf hin, dass sowohl Frühgeborene als auch Reifgeborene zu einer systemischen Zytokin-Ausschüttung, die sich im Nabelschnurblut nachweisen lässt, in der Lage sind.

Berner et al. (2001) wiesen die Aktivierung des fetalen bzw. neonatalen Immunsystems in vitro durch Stimulation von mononukleären Nabelschnurblutzellen gesunder Neugeborener mit *Streptococcus agalactiae* (GBS)-Bakterienstämmen isoliert von Neugeborenen mit early-onset Sepsis und unauffällig kolonisierten Neugeborenen nach. Die durch konventionelle RT-PCR bestimmte Zytokin-mRNA-Expression von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  als Reaktion auf den Infektionsreiz war in den mononukleären Zellen, die mit GBS-Bakterienstämmen von septischen Neugeborenen infiziert wurden, signifikant höher als in den mononukleären Zellen, die mit GBS-Bakterienstämmen unauffällig kolonisierter Neugeborener infiziert wurden. Schließlich zeigte diese Arbeitsgruppe (Berner et al., 2002) auch, dass die Zytokin-mRNA-Expression von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  von mononukleären Nabelschnurblutzellen vergleichbar mit der von mononukleären Zellen in adultem Blut ist. Hierzu wurden mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut und adultem Blut in vitro mit GBS und LPS stimuliert.

Auch Taniguchi et al. (1993) wiesen die funktionelle Reife des fetalen/neonatalen Immunsystems nach. Sie stimulierten mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut von Früh- und Reifgeborenen mit LPS und sahen mittels ELISA eine mit adulten mononukleären Zellen vergleichbare IL-8-Produktion. Demgegenüber wiesen Cairo et al. (1992) und Ishii et al. (1995) mittels ELISA und RT-PCR eine geringere G-CSF-Produktion und G-CSF-Gen-Expression in stimulierten mononukleären Nabelschnurblutzellen gegenüber stimulierten Zellen aus adultem Blut nach. Dies könnte die Pathogenese neonataler Neutropenien während eines Zustands erhöhten Bedarfs, wie der early-onset Sepsis, erklären.

Auf der Proteinebene untersuchten Shalak et al. (2002) mittels ELISA die Zytokin-Konzentrationen von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  im Nabelschnurblut Schwangerer am Entbindungstermin mit Verdacht auf Amnioninfektionssyndrom (n = 61) und einer Kontrollgruppe (n = 50) ohne Infektionsverdacht. Signifikant erhöhte Plasmakonzentrationen boten hier nur IL-6 und IL-8 in der Risikogruppe. Chaiworapongsa et al. (2002) fanden ebenfalls mittels ELISA im Nabelschnurvenenblut von Neugeborenen am Termin, bei deren Müttern der Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom bestand (26/137), signifikant höhere IL-6-Konzentrationen als in einer Kontrollgruppe, deren Mütter keine klinischen Infektionszeichen zeigten (Median 27,46 pg/ml vs. 2,13 pg/ml). Tasci et al. (2006) untersuchten die IL-6-Konzentrationen im Nabelschnurblut von Schwangeren mit vorzeitigem Blasensprung am Termin (Risikogruppe, n = 40) und unauffälligen Schwangeren (Kontrollgruppe, n = 30). Die IL-6-Konzentrationen waren in der Risikogruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Die Vorhersage einer histologischen Chorioamnionitis war bei einem cut-off Punkt der IL-6-Konzentration > 29 pg/ml mit einer Sensitivität von 74,1 % und Spezifität von 76,6 % möglich, die Vorhersage einer early-onset Sepsis bei einem cut-off von IL-6 > 39 pg/ml mit einer Sensitivität von 100 % und einer Spezifität von 81 %.

Das fetale und neonatale Immunsystem scheint aber auch bereits in der Lage zu sein, anti-inflammatorische Zytokine zu bilden, die gegenregulativ zu einer Infektion wirken (Kotiranta-Ainamo et al., 1997). In einem ex vivo-Modell zeigten Dembinski et al. (2003) die Produktion von inflammatorischen und anti-inflammatorischen Zytokinen durch LPS-Stimulation im Nabelschnurblut in Abhängigkeit vom Gestationsalter. Die Bestimmung der Zytokine erfolgte mittels ELISA im Nabelschnurblut von extrem Frühgeborenen

≤ 32 SSW, Frühgeborenen zwischen 33 und 36 SSW und Reifgeborenen ≥ 37 SSW. Die Konzentrationen von IL-1 $\beta$ , IL-6, G-CSF und TNF- $\alpha$  im Nabelschnurblut waren positiv mit dem Gestationsalter korreliert. Nach Adjustierung auf die Leukozytenzahl blieb ein signifikanter Effekt auf die Konzentrationen von IL-6 und G-CSF bestehen, den die Autoren mit der Unreife des fetalen Immunsystems der extrem Frühgeborenen erklären. Für IL-8 und IL-10 zeigte sich kein signifikanter Konzentrationsunterschied in Abhängigkeit vom Gestationsalter. Demgegenüber zeigten Blanco-Quiros et al. (2000) einen Effekt des Gestationsalters auf die IL-10-Plasma-Konzentration, wobei gesunde Reifgeborene und Frühgeborene mit Sepsis (Median 32 SSW) verglichen wurden. Letztere hatten signifikant höhere IL-10-Konzentrationen im Nabelschnurblut als die Reifgeborenen.

#### **4.3 Rolle der inflammatorischen und anti-inflammatorischen Zytokine bei Neugeborenen mit early-onset Infektion**

Auf eine intrauterine Infektion können Feten mit einem „fetal inflammatory response syndrome“ reagieren (Gomez et al., 1998) und nachfolgend als Neugeborene an einer early-onset Infektion erkranken. Langfristige Folgen können unter anderem eine bronchopulmonale Dysplasie, eine periventrikuläre Leukomalazie oder eine Zerebralparese sein (Yoon et al., 2003, Kramer, 2008).

Unter den direkt postpartal erhobenen klinischen Parametern in der vorliegenden Arbeit fielen signifikant erniedrigte Apgarwerte nach fünf und zehn Minuten der Risikogruppe gegenüber der Kontrollgruppe, bei nicht signifikant unterschiedlichen pH-Werten in der Nabelschnurarterie, auf. Diese Beobachtung stimmt gut mit der anderer Autoren überein, die erniedrigte Apgarwerte signifikant mit einer späteren Infektionsmanifestation assoziieren konnten (Lott, 1990, Day et al., 1992).

Aus unserem Gesamtkollektiv von 60 Neugeborenen wurden insgesamt 14 verlegt, davon 5 Neugeborene, sämtlich aus der Risikogruppe, mit dem Verdacht auf eine early-onset Infektion. Zwei dieser 5 Neugeborenen waren Frühgeborene (< 37 + 0 SSW). Die Neugeborenen wurden unverzüglich unter dem Verdacht auf eine Sepsis antibiotisch therapiert. Bei allen erfolgte der Nachweis entweder eines erhöhten CrP, einer Leukozytose oder -penie oder einer erhöhten I/T-Ratio in Zusammenhang mit klinischen Symptomen einer neonatalen Infektion. Nur ein Neugeborenes zeigte eine positive Blutkultur.

Hier ist in Übereinstimmung mit der Literatur (Büscher et al., 2000, Krueger et al., 2001) zu vermuten, dass eine prophylaktische prä- oder subpartale Antibiotikatherapie der Schwangeren mit einem Verdacht auf Amnioninfektionssyndrom Einfluss auf die neonatale Blutkultur hat. Die vorliegende Arbeit bestätigt, dass relativ viele Neugeborene wegen des Verdachts auf eine Sepsis behandelt werden, obwohl diese nur bei wenigen sicher durch positive Blut-, Urin- oder Liquor-Kultur nachgewiesen wird (Büscher et al., 2001). Dies ist notwendig, um die wenigen Neugeborenen mit einer definitiven Sepsis sicher zu erfassen. Im Hinblick auf die Entwicklung von Resistenzen besteht jedoch die unbedingte Notwendigkeit, unnötige Gaben von Antibiotika an Neugeborene zu vermeiden (Huovinen und Cars, 1998). Andererseits fanden Kashlan et al. (2000) keine Unterschiede in den IL-6-Konzentrationen im Nabelschnurblut von Neugeborenen mit durch positive Blutkultur bestätigter Sepsis und klinischer Sepsis. Eine Bestimmung des IL-6 im neonatalen Blut wurde bei den aus unserem Kollektiv mit Verdacht auf early-onset Infektion verlegten Neugeborenen nicht durchgeführt.

Bei den Neugeborenen sollte die mRNA-Expression der inflammatorischen und anti-inflammatorischen Zytokine eine eventuell bereits bei Geburt bestehende, aber klinisch noch stumme neonatale early-onset Infektion anzeigen. Innerhalb der ersten 48 Stunden ist es bei einem Neugeborenen oft schwierig, zwischen der infektiösen und nicht infektiösen Ursache einer Inflammation zu unterscheiden. Das CrP ist ein guter Marker zum Ausschluss, nicht aber zur Bestätigung einer Sepsis; denn es steigt auch bei anderen pathologischen Zuständen wie fetaler Asphyxie, fetalem Atemnotsyndrom, Schock, zerebraler Blutung oder Mekoniumaspiration an (Briese, 1999, Volk et al., 2008). Insofern bietet sich die Bestimmung der Zytokine als Marker zur Differenzierung einer infektiösen von einer nicht infektiösen Ursache einer Inflammation als Alternative an.

#### **4.3.1 Rolle der inflammatorischen Zytokine**

Die mRNA-Expression der inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  war in der vorliegenden Arbeit im Nabelschnurblut der 5 Neugeborenen mit Verdacht auf eine early-onset Infektion gegenüber den 25 nicht infizierten Neugeborenen signifikant erhöht. Die mRNA-Expression der inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-8 und G-CSF war tendenziell, aber nicht signifikant erhöht.

Eine signifikant erhöhte mRNA-Expression der Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  im Nabelschnurblut Neugeborener mit early-onset Sepsis wie in der vorliegenden Arbeit und zusätzlich auch von IL-8 wiesen Berner et al. (2000) in einer prospektiven Studie nach. Sie untersuchten Nabelschnurblut von insgesamt 99 Neugeborenen (Früh- und Reifgeborene). Diese wurden in 3 Gruppen unterteilt. In Gruppe A (n = 9) wurden alle Neugeborenen mit klinischen Sepsiszeichen und durch Blutkultur oder eine Kombination aus drei Kriterien (CrP > 1 mg/dl innerhalb 48 h nach Auftreten von Sepsiszeichen, I/T-Ratio > 0,2, Pneumonie, mütterliches Fieber oder antibiotische Therapie innerhalb 48 h vor Geburt) bestätigte early-onset Sepsis zusammengefasst. Gruppe B (n = 22) bildeten Neugeborene mit klinischem Verdacht auf Sepsis, der sich nicht bestätigen ließ. Gruppe C (n = 68) umfasste gesunde Neugeborene. Mittels konventioneller RT-PCR wurde die mRNA-Expression der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, G-CSF und TNF- $\alpha$  in mononukleären Zellen des Nabelschnurbluts untersucht. Eine signifikant erhöhte mRNA-Expression in Gruppe A gegenüber den anderen Gruppen zeigten IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$ . Die höchste Sensitivität (86 %) und Spezifität (96 %) in der Vorhersage einer early-onset Sepsis erreichte dabei die IL-8-mRNA-Expression, die als Marker für die Erfassung der neonatalen Sepsis postuliert wird. Zusätzlich wurden auf Proteinebene die Plasmakonzentrationen von IL-8 im Nabelschnurblut untersucht. Diese waren in Gruppe A signifikant gegenüber den Gruppen B und C erhöht. In einer vorhergehenden Studie hatten Berner et al. (1998) auf Proteinebene signifikant erhöhte Plasmakonzentrationen der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, G-CSF und TNF- $\alpha$  im Nabelschnurblut von Neugeborenen mit bestätigter Sepsis (n = 35) gegenüber Neugeborenen mit klinischem Verdacht auf Sepsis, die sich nicht bestätigen ließ (n = 66), und einer gesunden Kontrollgruppe (n = 35) gezeigt. Die nachgewiesenen Plasmakonzentrationen erlaubten die Vorhersage einer early-onset Sepsis mit hoher Sensitivität und Spezifität. Die höchste Sensitivität (91 %) und Spezifität (93 %) in der Voraussage erreichte dabei ein cut-off Punkt der IL-8-Konzentration von 300 pg/ml.

Auf Proteinebene wurde eine signifikant erhöhte Konzentration des inflammatorischen Zytokins IL-6 von Büscher et al. (2000) mittels ELISA im Nabelschnurblut von Neugeborenen, die eine early-onset Infektion entwickelten (13/240), gegenüber nicht infizierten Neugeborenen nachgewiesen und als immunologische Reaktion des Feten auf ein Amnioninfektionssyndrom beschrieben. Zwei dieser 13 Neugeborenen waren Frühgeburten (< 37 + 0 SSW). Als cut-off Punkt wurde eine IL-6-Konzentration von 15 pg/ml festge-

legt. Die early-onset Infektion der Neugeborenen konnte dabei mit einer Sensitivität von 53,8 % und einer Spezifität von 61,7 % vorausgesagt werden. Eine signifikante Erhöhung der Konzentration von TNF- $\alpha$  im Nabelschnurblut und ebenso der Konzentrationen der inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-8 und G-CSF wurde nicht gefunden.

Messer et al. (1996) konnten ebenfalls eine signifikante Erhöhung der IL-6-Konzentration im Nabelschnurblut von Früh- und Reifgeborenen (24 - 42 SSW), die eine early-onset Infektion entwickelten (71/288), unabhängig davon, ob diese positive oder negative Blutkulturen hatten, gegenüber einer nicht infizierten Kontrollgruppe zeigen. Bei einem cut-off Punkt  $\geq 100$  pg/ml lag die Sensitivität bei 83,3 %, die Spezifität bei 90,3 %. Ebenfalls für das Zytokin IL-6 zeigten Lehrnbecher et al. (1995) in einem Kollektiv Früh- und Reifgeborener (26 - 42 SSW) eine signifikante Konzentrationserhöhung bei Vorliegen einer early-onset Infektion (13/46) im Vergleich zu einer Normalgruppe mit einem cut-off Punkt von 150 pg/ml (Sensitivität 69 %, Spezifität 91 %). Eine signifikante Konzentrationserhöhung konnte zusätzlich auch für IL-8 mit einem cut-off Punkt von 150 pg/ml (Sensitivität 69 %, Spezifität 91 %) nachgewiesen werden. Die Autoren wiesen darauf hin, dass die gemessenen Zytokinkonzentrationen im Nabelschnurblut und mütterlichen Blut nicht korrelieren, was dafür spricht, dass die fetale/neonatale Immunantwort unabhängig von der Mutter abläuft.

Auch Weeks et al. (1997) bestätigten die signifikante Erhöhung der Konzentration von IL-6 im Nabelschnurblut, allerdings Frühgeborener  $< 37$  SSW, die eine early-onset Infektion entwickelten (16/133), gegenüber einer nicht infizierten Gruppe Frühgeborener. Dies wurde ebenfalls in einem Kollektiv Frühgeborener  $\leq 32$  SSW mit nachfolgender early-onset Infektion (21/43) durch Kashlan et al. (2000) bestätigt. Hier war für TNF- $\alpha$  kein signifikanter Unterschied zwischen Risiko- und Kontrollgruppe feststellbar. Smulian et al. (1999b) untersuchten die IL-6-Konzentration im Nabelschnurblut Frühgeborener zwischen der 22. - 36. SSW mit dem Ziel, einen verlässlicheren Marker für eine early-onset Sepsis zu finden als die klinischen Zeichen des Amnioninfektionssyndroms. Als erhöhte IL-6-Konzentration wurde ein Wert  $\geq 25$  pg/ml festgelegt. In dem Kollektiv von 28 Schwangeren kamen 14 Neugeborene mit Verdacht auf eine early-onset Sepsis zur Welt (50 %). Bei 10 Patientinnen mit klinischen Zeichen eines Amnioninfektionssyndroms zeigten 6 Neugeborene eine early-onset Sepsis (60 %). Von den restlichen 18 Patientinnen ohne Zeichen eines Amnioninfektionssyndroms zeigten 8 Neugeborene

eine early-onset Sepsis (44,4 %). Erhöhte IL-6-Konzentrationen im Nabelschnurblut konnten eine early-onset Sepsis bei den Frühgeborenen besser voraussagen als das Vorhandensein klinischer Zeichen des Amnioninfektionssyndroms. Die Sensitivität für die Voraussage einer early-onset Sepsis von klinischen Zeichen eines Amnioninfektionssyndroms vs. IL-6-Konzentration  $\geq 25$  pg/ml betrug 42,9 % vs. 92,9 %, die Spezifität 71,4 % vs. 92,9 %. Ebenso fanden Krueger et al. (2001) in einem Kollektiv Frühgeborener zwischen 23 und 36 vollendeten SSW ( $n = 100$ ) signifikant höhere Konzentrationen in den IL-6- und zusätzlich auch den IL-8-Konzentrationen des Nabelschnurbluts derjenigen, die eine early-onset Sepsis entwickelten, gegenüber nicht infizierten Neugeborenen. Für IL-6 betrug bei einem cut-off Punkt von 80 pg/ml die Sensitivität für die Voraussage einer early-onset Sepsis 96 % und die Spezifität 95 %. Auch Hatzidaki et al. (2005) untersuchten speziell ein Kollektiv Frühgeborener  $< 33$  SSW ( $n = 109$ ). Sie fanden in der Untergruppe, in der zusätzlich ein früher vorzeitiger Blasensprung vorlag (58/109), bei den Frühgeborenen, die eine early-onset Sepsis entwickelten, signifikant höhere IL-6-Konzentrationen, als bei denen, die keine Sepsis entwickelten. Für einen cut-off Punkt der IL-6-Konzentration von 108,5 pg/ml ergaben sich eine Sensitivität von 95 % und eine Spezifität von 100 % in der Voraussage einer neonatalen Sepsis.

#### **4.3.2 Rolle der anti-inflammatorischen Zytokine**

Fünf von den 30 Neugeborenen der Risikogruppe zeigten eine starke anti-inflammatorische bzw. gegenregulative IL-10-mRNA-Expression bzw. IL-10-Antwort unabhängig von den vergleichbaren Konzentrationen der inflammatorischen Zytokine. Alle 5 Neugeborenen entwickelten eine early-onset Infektion. Folglich könnte die individuelle IL-10-Hyperreaktion im Nabelschnurblut einiger Schwangerer mit Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom mit einer Immundepression bei den Neugeborenen und einem erhöhten Risiko dieser, eine klinisch relevante early-onset Infektion zu entwickeln, assoziiert sein. Demgegenüber zeigten die 5 Neugeborenen, die eine early-onset Infektion entwickelten, eine tendenzielle, aber nicht signifikante Erhöhung der TGF- $\beta$ 1-mRNA-Expression gegenüber den nicht infizierten Neugeborenen.

Kotiranta-Ainamo et al. (1997) zeigten mittels ELISA auf Proteinebene anhand der signifikant niedrigeren IL-10-Produktion von LPS-stimulierten mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut gegenüber solchen aus dem peripheren Blut Erwachsener, dass Neu-

geborene weniger IL-10 als Erwachsene produzieren. Blanco-Quiros et al. (2004) wiesen mittels ELISA im Nabelschnurblut Frühgeborener (25 - 37 SSW), die ein respiratory distress syndrome (RDS) entwickelten, signifikant höhere IL-10-Konzentrationen als im Nabelschnurblut unauffälliger Frühgeborener nach.

Was könnte der Grund für die unterschiedliche IL-10-Antwort sein? Es gibt verschiedene Studien, die einen Polymorphismus des IL-10-Gens zeigen, der mit einer erniedrigten oder erhöhten IL-10-Antwort auf inflammatorische Stimuli verbunden ist (Hurme et al., 1998, Gallagher et al., 2003). Es ist zu vermuten, dass es unter den Neugeborenen, deren Mütter einen klinischen Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom haben, genetisch bedingte „IL-10-High-Responder“ gibt, die empfänglicher für bakterielle Infektionen sind. Diese Hypothese muss in weiteren prospektiven Studien geprüft werden.

Darüber hinaus konnte anhand der Genexpression von IL-10 die Entwicklung einer early-onset Infektion in der Risikogruppe vorhergesagt werden. Die 5 Neugeborenen, die eine early-onset Infektion entwickelten, exprimierten eine 11-fach höhere IL-10-mRNA-Menge im Nabelschnurblut als die nicht infizierten 25 Neugeborenen von Schwangeren mit Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom. Das Fehlen einer Überlappung beim Vergleich der infizierten mit den nicht infizierten Neugeborenen im Risikokollektiv könnte IL-10 zu einem interessanten Vorhersage-Marker werden lassen.

Der zelluläre Ursprung der mRNA-Hochregulation von IL-10 im Nabelschnurblut ist nicht endgültig geklärt. Ein möglicher Produktionsort könnten zirkulierende Monozyten sein. Das immunregulatorische Zytokin IL-10 hat die Fähigkeit, Biosynthese und Wirkungen der inflammatorischen Zytokine zu antagonisieren (de Waal-Malefyt et al., 1991). Es spielt eine wichtige Rolle im Netzwerk der Zytokine. Die Aktivität von IL-10 wird durch inflammatorische Stimuli (z. B. TNF- $\alpha$ ) über den NF- $\kappa$ B- (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) Weg (Barsig et al., 1995, Meisel et al., 1996) und Stresshormone (z. B. Katecholamine) (Woiciechowsky et al., 1998) getriggert. Monozyten und Makrophagen sind dabei die wichtigsten Produktionsorte. Die IL-10-Sekretion schützt vor infektionsassoziierten pathologischen Vorgängen, hauptsächlich Hyperinflammation und Schock. Im Maus- und Rattenmodell führten die Neutralisierung von IL-10 oder ein ausgelöster IL-10-Gendefekt zu einer erhöhten Anfälligkeit für eine LPS-induzierte Schockreaktion und zum Tod (Berg et al., 1995). Andererseits ist eine lang

anhaltende IL-10-Produktion mit einem erhöhten Risiko für infektionsbedingte Komplikationen bei Intensivpatienten aufgrund einer verminderten Immunantwort auf pathogene Bakterien und Pilze verbunden. Somit stellt eine hohe IL-10-Expression einen sensitiven Marker sowohl zur Erfassung systemischer Entzündungsprozesse als auch der Immunsuppression dar.

Die erhöhte mRNA-Expression von IL-6 und TNF- $\alpha$  sowie IL-10 in den mononukleären Zellen des Nabelschnurbluts könnte beim Fehlen klinischer Zeichen einer early-onset Infektion des Neugeborenen einen ersten Anhaltspunkt für das Entstehen eines infektiösen Geschehens, einige Stunden bevor es zu einem Anstieg des CrP kommt, geben und als zusätzlicher Parameter für die Diagnostik hinzugezogen werden. Eine erhöhte mRNA-Expression der Zytokine könnte Anlass zu intensiverer Überwachung sein und die Neugeborenen, die von einer frühen Therapie einer early-onset Infektion profitieren, rechtzeitig identifiziert werden. Das CrP steigt etwa 6 - 12 Stunden nach Infektion an. Mittels real-time TaqMan RT-PCR wäre die Zytokinbestimmung in entsprechenden Verdachtsfällen eines Amnioninfektionssyndroms innerhalb eines Zeitfensters von etwa 3 - 4 Stunden möglich. Trotzdem ist das Verfahren immer noch zu aufwendig und teuer, als dass man dessen Anwendung uneingeschränkt in der Routine empfehlen könnte.

#### **4.4 Rolle der inflammatorischen und anti-inflammatorischen Zytokine bei histologischer Chorioamnionitis**

Eine histologische Chorioamnionitis wurde in 19 untersuchten Plazenten (31,7 %) des Gesamtkollektivs gefunden. In der Kontrollgruppe wurde eine histologische Chorioamnionitis in 5 Plazenten (16,7 %), in der Risikogruppe in 14 Plazenten (46,7 %) nachgewiesen, wobei das Vollbild einer histologischen Chorioamnionitis in 2 bzw. 7 Plazenten nachweisbar war.

Die Häufigkeit eines Amnioninfektionssyndroms liegt weit unter der Häufigkeit einer histologisch nachzuweisenden Chorioamnionitis, da die meisten Fälle einer histologischen Chorioamnionitis subklinisch verlaufen (Yoon et al., 2001, Romero et al., 2007a). Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Häufigkeit einer histologischen Chorioamnionitis von 31,7 % im Gesamtkollektiv (Kontrollgruppe: 16,7 %, Risikogruppe: 46,7 %) bei einem Frühgeborenenanteil von 15 % ist mit den aus größeren Kollektiven stammenden

Häufigkeitsangaben vergleichbar. Die höchste Prävalenz der Chorioamnionitis wurde in Untersuchungen an Plazenten Frühgeborener bzw. septischer Aborte zwischen der 20. - 24. SSW mit 50 – 90 % gefunden und sank mit steigendem Gestationsalter auf 10 – 20 % bei Reifgeborenen (Benirschke, 1990, Vogel, 1996, Redline, 2006). Mueller-Heubach et al. (1990) fanden in einer Untersuchung an 1 834 Einlingsplazenten die Häufigkeit einer Chorioamnionitis mit 66 % bei Frühgeborenen bzw. septischen Aborten der 20. - 26. SSW, 22,5 % in der 33. - 36. SSW und mit 19 % bei Geburten am Termin. Lahra und Jeffery (2004) untersuchten die Plazenten Frühgeborener zwischen 20 und 34 vollendeten Schwangerschaftswochen (n = 3 928) und sahen insgesamt eine Inzidenz der histologischen Chorioamnionitis von 31 %, in der 34. SSW von 16 %. Goldenberg et al. (2006) fanden in einem Kollektiv von 457 Frühgeborenen zwischen 23 und 32 SSW in 49,9 % der Plazenten eine histologische Chorioamnionitis.

In der vorliegenden Arbeit konnte für die inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression im Nabelschnurblut der 7 Schwangeren mit klinischem Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom, in deren Plazenten sich ein Vollbild einer Chorioamnionitis histologisch nachweisen ließ, gegenüber den 15 Schwangeren, deren Plazenten einen Normalbefund aufwiesen, gezeigt werden. Für die inflammatorischen Zytokine IL-8, G-CSF sowie die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$ 1 konnte eine tendenzielle, aber nicht signifikante Erhöhung der mRNA-Expression gezeigt werden.

Miyano et al. (1996) fanden mittels ELISA auf Proteinebene bei 215 Früh- und Reifgeborenen eine signifikante Erhöhung der IL-6-Konzentration im Nabelschnurblut der Schwangeren, in deren Plazenten eine histologische Chorioamnionitis nachweisbar war, gegenüber denen mit einem normalen Plazentabefund. Yoon et al. (2000) zeigten eine signifikant höhere Konzentration von IL-6 im Nabelschnurblut Frühgeborener zwischen 20 und 35 SSW, deren Plazenten ein Minimal- oder Teilbild einer Chorioamnionitis aufwiesen (72/315), gegenüber solchen mit Normalbefund. Auch die IL-6-Konzentration im Nabelschnurblut der Frühgeborenen, in deren Plazenten ein Vollbild der Chorioamnionitis nachgewiesen wurde (72/315), war gegenüber solchen mit einem Minimal- oder Teilbild bzw. Normalbefund signifikant erhöht. Eine IL-6-Konzentration  $\geq$  17,5 pg/ml zeigte eine Sensitivität von 70 % und eine Spezifität von 78 % in der Identifikation eines Vollbilds der Chorioamnionitis. Kashlan et al. (2000) bestätigten in einem

Kollektiv Frühgeborener  $\leq$  32 SSW eine signifikante Erhöhung der IL-6-Konzentration, wenn in der Plazenta ein Vollbild einer Chorioamnionitis vorlag, gegenüber einem Plazentanormalbefund. Keine signifikanten Unterschiede konnten sie für das zusätzlich untersuchte Zytokin TNF- $\alpha$  finden. Rogers et al. (2002) verglichen die Konzentration von IL-6 im Nabelschnurblut Früh- (n = 110) und Reifgeborener (n = 137), in deren Plazenten histologisch ein Minimal-, Teil- und Vollbild einer Chorioamnionitis nachgewiesen wurde. Sie fanden eine Zunahme der IL-6-Konzentrationen bei zunehmender Schwere des histologischen Befunds, wobei Reifgeborene signifikant höhere IL-6-Konzentrationen als Frühgeborene bei Vorliegen eines Minimal- und Teilbilds zeigten, was mit der relativen Unreife des Immunsystems Frühgeborener erklärt wurde. Wenn ein Vollbild vorlag, waren die IL-6-Konzentrationen zwischen Früh- und Reifgeborenen nicht signifikant unterschiedlich. Auf Proteinebene konnten Büscher et al. (2000) signifikant erhöhte IL-1 $\beta$ - und IL-6-Konzentrationen mittels ELISA im Nabelschnurblut von Schwangeren nachweisen, in deren Plazenten eine histologische Chorioamnionitis gefunden wurde (35/195). Für IL-6 zeigten sich bei einem cut-off Punkt von 15 pg/ml eine Sensitivität von 57,1 % und eine Spezifität von 68,8 % in der Voraussage einer histologischen Chorioamnionitis. Die Konzentrationen der beiden anderen durch diese Arbeitsgruppe untersuchten inflammatorischen Zytokine IL-8 und G-CSF waren nicht signifikant erhöht. Salafia et al. (1997) wiesen im Nabelschnurblut 32 Frühgeborener, die zwischen 20 und 36 SSW geboren wurden, ebenfalls eine signifikante Erhöhung der IL-1 $\beta$ - und IL-6-Konzentrationen nach, wenn in der histologischen Untersuchung ein Vollbild einer Chorioamnionitis gefunden wurde, verglichen mit einem Minimal- oder Teilbild und nahmen einen vorwiegend placentaren Ursprung der Zytokine an. Sie fanden keine Korrelation der mütterlichen Serum-Zytokin-Konzentrationen mit dem Vorliegen einer histologischen Chorioamnionitis.

D'Alquen et al. (2005) wiesen signifikant erhöhte Konzentrationen von IL-1 $\beta$ , IL-6 sowie zusätzlich IL-8 im Nabelschnurblut Frühgeborener (25 - 28 vollendete SSW) nach, deren Plazenten das Vollbild einer Chorioamnionitis zeigten, gegenüber solchen, die nur ein Minimal- oder Teilbild entwickelten. Auch Sorensen et al. (2007) fanden neben IL-6 eine signifikant erhöhte IL-8-Konzentration im Nabelschnurblut Frühgeborener zwischen 28 und 34 SSW, bei denen eine histologische Chorioamnionitis nachgewiesen wurde. Abrams et al. (2004) fanden im Nabelschnurblut Frühgeborener, deren Plazenten eine histologische Chorioamnionitis zeigte, gegenüber solchen mit normalem Plazentabe-

fund signifikant erhöhte Konzentrationen von IL-6, aber auch von IL-8, während die Konzentrationen von TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ 1 nicht signifikant unterschiedlich waren. Døllner et al. (2002) untersuchten Nabelschnurblut von Schwangeren mit normalen Geburten (n = 82) und durch Amnioninfektionssyndrom, vorzeitige Wehen oder vorzeitigen Blasensprung beeinträchtigte Geburten (n = 139) sowie die dazugehörigen Plazenten. Sie fanden signifikant erhöhte Konzentrationen von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 sowie TNF- $\alpha$  im Nabelschnurblut der Schwangeren, in deren Plazenten das Vollbild einer Chorioamnionitis (n = 63) gefunden wurde, gegenüber den Schwangeren, deren Plazenten nicht infiziert waren (n = 74). In der ersten Gruppe befanden sich allerdings mehr Frühgeburten < 37 + 0 SSW (39,6 % vs. 32,4 %). Zwischen nicht infizierten Plazenten (n = 74) und Minimal- oder Teilbild einer Chorioamnionitis (n = 84) zeigte sich kein Unterschied der Zytokin-Konzentrationen im Nabelschnurblut.

In der Frage nach der Korrelation von histomorphologischem Plazentabefund und Infektionsmanifestation beim Neugeborenen zeigte sich in der vorliegenden Arbeit ein signifikanter Zusammenhang, der entsprechende Korrelationskoeffizient lag bei 0,43. Von den 5 Neugeborenen mit neonataler early-onset Infektion, davon 2 Frühgeborene (< 37 + 0 SSW), zeigte die Plazentauntersuchung in allen Fällen eine histologische Chorioamnionitis, in 3 Fällen war sogar ein Vollbild nachweisbar. Hochgradige Chorioamnionitiden bei Frühgeborenen scheinen stärker mit dem Auftreten einer neonatalen Infektion assoziiert zu sein als bei Reifgeborenen. In der schon erwähnten Studie von Døllner et al. (2002) waren signifikant höhere Konzentrationen von IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$ , nicht aber IL-1 $\beta$  im Nabelschnurblut von Schwangeren, deren Plazenten das Vollbild einer Chorioamnionitis aufwiesen und deren Neugeborene eine early-onset Sepsis entwickelten, gegenüber Schwangeren, deren Plazenten ebenfalls das Vollbild einer Chorioamnionitis zeigten, aber deren Neugeborene gesund waren, nachweisbar. Die Daten lassen vermuten, dass die histologische Entzündungsreaktion als ätiologischer Faktor für das Entstehen einer early-onset Sepsis anzusehen ist, wie dies auch von Yoon et al. (2000) und Büscher et al. (2000) postuliert wird. In der Literatur gibt es nur wenige Untersuchungen, die sich mit der Korrelation von histomorphologischem Plazentabefund und infektiösen Komplikationen der Neugeborenen befassen. In einigen Untersuchungen wurden kindliche Infektionsparameter hinsichtlich ihrer Assoziation mit entzündlichen Veränderungen der Plazenten geprüft (Dong et al., 1987, de Araujo et al.,

1994). Dabei konnte eine deutliche Korrelation von entzündlichen Veränderungen der Plazenten mit early-onset Infektionen der Neugeborenen nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei der histologischen Untersuchung der Plazenten in der Kontroll- und der Risikogruppe eine Diskrepanz zwischen dem Nachweis einer Chorioamnionitis und der relativ geringen Prävalenz infizierter Neugeborener. Auch dies wurde in verschiedenen früheren Studien beschrieben (Hillier et al, 1991, Seo et al., 1992). Yoon et al. (2000) diagnostizierten 7-mal häufiger und Büscher et al. (2000) 3-mal häufiger eine histologische Chorioamnionitis als eine early-onset Infektion. Dies deckt sich mit den vorliegenden Untersuchungsergebnissen.

## 5 Zusammenfassung

Das Amnioninfektionssyndrom bedeutet eine Gefahr für Schwangere und Mutter, Fötus und Neugeborenes. Die daraus resultierende early-onset Infektion des Neugeborenen ist neben der Frühgeburtlichkeit die häufigste Ursache für neonatale Morbidität und Mortalität. Die frühe Diagnose und Therapie dieser Infektionen stellen die behandelnden Ärzte vor eine große Herausforderung, da deren klinische Symptome auch bei unspezifischen Infektionen oder anderen pathologischen Zuständen auftreten. Föten sind jedoch in der Lage, spezifisch auf eine intraamniotische Infektion durch Freisetzung von Zytokinen zu reagieren. Das Verstehen der Mechanismen und Regulationen der fetalen Immunantwort während eines Amnioninfektionssyndroms und nachfolgend der neonatalen Immunantwort ist wichtig für die adäquate postpartale Therapie. Durch die Etablierung früher und zuverlässiger Marker für die Diagnose eines Amnioninfektionssyndroms bzw. einer early-onset Infektion könnten die unnötige Anwendung von Anti-biotika und die Gefahr der Entstehung von Resistenzen reduziert werden. Diesem Ziel versuchte sich die vorliegende Arbeit zu nähern.

Dazu wurden prospektiv 30 Schwangere mit den klinischen Zeichen eines Amnioninfektionssyndroms (Risikogruppe) und 30 Schwangere ohne Infektionszeichen (Kontrollgruppe) in die Studie eingeschlossen. Nach Abnablung der Neugeborenen wurde Nabelschnurvenenblut entnommen und in den mononukleären Zellen die relativen mRNA-Mengen inflammatorischer (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, G-CSF, TNF- $\alpha$ ) und anti-inflammatorischer (IL-10, TGF- $\beta$ 1) Zytokine erstmals mittels real-time TaqMan RT-PCR bestimmt. Der klinische postpartale Verlauf der Neugeborenen, v. a. die mögliche Entwicklung einer early-onset Infektion wurde beobachtet und dokumentiert. Die Plazenten wurden histologisch untersucht und das Vorliegen einer histologisch gesicherten Chorioamnionitis erfasst.

Die mRNA-Expression aller untersuchten Zytokine war bei den Schwangeren der Risikogruppe gegenüber denen der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Eine early-onset Infektion wurde bei 5 von 30 Neugeborenen von Schwangeren der Risikogruppe diagnostiziert, kam hingegen in der Kontrollgruppe nicht vor. Im Nabelschnurblut der infizierten Neugeborenen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression der Zyto-

kine IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-10. Eine Chorioamnionitis ließ sich histologisch in 14 Plazenten, davon in 7 ein Vollbild, von Schwangeren der Risikogruppe und in 5 Plazenten, davon in 2 ein Vollbild, von Schwangeren der Kontrollgruppe nachweisen. Eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  war im Nabelschnurblut der Schwangeren der Risikogruppe mit einem histologisch diagnostizierten Vollbild einer Chorioamnionitis nachweisbar.

Die signifikant erhöhte mRNA-Expression der untersuchten inflammatorischen und anti-inflammatorischen Zytokine bei Schwangeren der Risikogruppe zeigt die Auslösung der Reaktionskaskade der fetalen und neonatalen Immunantwort auf eine intraamniotische Infektion und ihr Zusammenwirken innerhalb des Zytokinnetzwerks. Die Bestimmung der Zytokin-Expression auf mRNA-Ebene führt dabei zur frühestmöglichen Erfassung des Beginns einer intrauterinen fetalen Reaktion auf eine intraamniotische Infektion, gefolgt von der Freisetzung der Zytokine auf Proteinebene.

Eine Konsequenz dieser Arbeit könnte der Einsatz der real-time TaqMan RT-PCR zur unmittelbar postpartalen Bestimmung der Zytokin-mRNA-Expression im Nabelschnurblut bei einem Risikokollektiv sein, die schneller verfügbar wäre als die Ergebnisse der CrP-Bestimmung oder der histologischen Untersuchung der Plazenta.

In naher Zukunft könnte die Quantifizierung der mRNA-Expression der Zytokine IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-10 als wertvolles diagnostisches Hilfsmittel zur frühen Vorhersage einer early-onset Infektion infolge eines maternalen Amnioninfektionssyndroms dienen. Eine besondere Rolle könnte dabei das Zytokin IL-10 spielen, da die zu einer Immundepression des Neugeborenen führende IL-10-Überexpression stark mit dem Auftreten einer early-onset Infektion korreliert. Unter Beurteilung der Gesamtsituation könnten sich so einer frühen Diagnose der Infektion ein rascher Therapiebeginn anschließen bzw. bei Ausschluss des Verdachts unnötige Verlegungen und Antibiotikagaben vermieden werden. Weitere Studien an größeren Kollektiven werden zeigen müssen, ob die Hoffnungen auf den bisher vielversprechenden Einsatz der Zytokine als frühe Entzündungsmarker berechtigt sind und dieser in Zukunft dazu führen wird, dass nur noch die wirklich behandlungsbedürftigen Neugeborenen frühzeitig eine Therapie erhalten.

## 6 Literaturverzeichnis

Aaltonen R, Heikkinen T, Hakala K, Laine K, Alanen A. Transfer of proinflammatory cytokines across term placenta. *Obstet Gynecol* 2005;106:802-7.

Abrams ET, Milner Jr DA, Kwiek J et al. Risk factors and mechanisms of preterm delivery in Malawi. *Am J Reprod Immunol* 2004;52:174–83.

de Araujo MC, Schultz R, Vaz FA, Massad E, Feferbaum R, Ramos JL. A case-control study of histological chorioamnionitis and neonatal infection. *Early Hum Dev* 1994;40:51-8.

Asadullah K, Döcke WD, Reinke P, Sterry W, Volk HD. Zytokinbestimmungen - Diagnostischer Einsatz aus klinisch-immunologischer Sicht. *Dtsch Med Wochenschr* 1997;122:1424-31.

Assuma M, Signore F, Pacifico L, Rossi N, Osborn JF, Chiesa C. Serum procalcitonin concentration in term delivering mothers and their healthy offspring: a longitudinal study. *Clin Chem* 2000;46:1583-7.

Azizia MM, Irvine LM, Coker M, Sanusi FA. The role of C-reactive protein in modern obstetric and gynecological practice. *Acta Obstet Gynecol* 2006;85:394-401.

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

Baltimore RS. Neonatal Sepsis. Epidemiology and Management. *Pediatr Drugs* 2003;5:723-40.

Barsig J, Kusters S, Vogt K, Volk HD, Tiegs G, Wendel A. Lipopolysaccharide-induced interleukin-10 in mice: role of endogenous tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Immunol* 1995;25:2888-93.

Bashiri A, Burstein E, Mazor M. Cerebral palsy and fetal inflammatory response syndrome: a review. *J Perinat Med* 2006;34:5-12.

Baumann P, Romero R. Intraamniale Infektion, Zytokine und Frühgeburtlichkeit. *Wien Klin Wochenschr* 1995;107:598-607.

Bek KM, Nielsen FR, Qvist I, Rasmussen PE, Tobiassen M. C-reactive protein (CRP) and pregnancy. An early indicator of chorioamnionitis. A review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1990;35:29-33.

Benirschke K. Infectious diseases. In: Benirschke K, Kaufmann P, eds. *Pathology of the human placenta*. 2nd ed. New York, Heidelberg, Berlin: Springer, 1990:542-635.

Berg DJ, Kühn R, Rajewsky K et al. Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. *J Clin Invest* 1995;96:2339-47.

Berner R, Niemeyer CM, Leititis JU et al. Plasma levels and gene expression of granulocyte colony-stimulating factor, tumor necrosis factor-alpha, interleukin (IL)-1 beta, IL-6, IL-8, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in neonatal early onset sepsis. *Pediatr Res* 1998;44:469-77.

Berner R, Tüxen B, Clad A, Forster J, Brandis M. Elevated gene expression of interleukin-8 in cord blood is a sensitive marker for neonatal infection. *Eur J Pediatr* 2000;159:205-10.

Berner R, Csorba J, Brandis M. Different cytokine expression in cord blood mononuclear cells after stimulation with neonatal sepsis or colonizing strains of *Streptococcus agalactiae*. *Pediatr Res* 2001;49:691-7.

Berner R, Welter P, Brandis M. Cytokine expression of cord and adult blood mononuclear cells in response to *Streptococcus agalactiae*. *Pediatr Res* 2002;51:304-9.

Berry SM, Gomez R, Athayde N et al. The role of granulocyte colony stimulating factor in the neutrophilia observed in the fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:S202.

Bessler H, Osovsky M, Sirota L. Association between IL-1Ra gene polymorphism and premature delivery. *Biol Neonate* 2004;85:179-83.

Beyaert R, Fiers W. Tumor necrosis factor and lymphotoxin. In: Mire-Sluis AR, Thorpe R, eds. *Cytokines*. San Diego, London, Boston: Academic Press, 1998:335-60.

Blanc WA. Amniotic infection syndrome: pathogenesis, morphology, and significance in circumnata mortality. *Clin Obstet Gynecol* 1959;2:705-34.

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

Blanco-Quiros A, Arranz E, Solis G, Garrote JA, Mayo A. High cord blood IL-10 levels in preterm newborns with respiratory distress syndrome. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2004;32:189-96.

Briese V. Amnioninfektionssyndrom. *Gynäkologe* 1999;32:507-11.

Broughton RA, Baker CJ. Role of adherence in the pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection. *Infect Immunol* 1983;39:837-43.

Bry K, Hallman M. Transforming growth factor  $\beta$  prevents preterm delivery induced by interleukin-1 $\alpha$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  in the rabbit. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:1318-22.

Buck C, Bundschu J, Gallati H, Bartmann P, Pohlandt F. Interleukin-6: a sensitive parameter for the early diagnosis of neonatal bacterial infection. *Pediatr* 1994;93:54-8.

Büscher U, Chen FCK, Pitzen A et al. IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 and G-CSF in the diagnosis of early-onset neonatal infections. *J Perinat Med* 2000;28:383-8.

Büscher U, Chen F, Dudenhausen JW. Akute-Phase-Proteine und Zytokine im Nabelschnurblut zur Infektionsdiagnostik beim Neugeborenen. *Gynäkologe* 2001;34:525-30.

Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Technol* 2004;15:155-66.

Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *J Mol Endocrinol* 2005;34:597-601.

Cairo MS, Suen Y, Knoppel E et al. Decreased G-CSF and IL-3 production and gene expression from mononuclear cells of newborn infants. *Pediatr Res* 1992;31:574-8.

Chaiworapongsa T, Romero R, Kim JC et al. Evidence for fetal involvement in the pathologic process of clinical chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:1178-82.

Cherouny PH, Pankuch GA, Romero R et al. Neutrophil attractant/activating peptide interleukin-8: association with histologic chorioamnionitis, preterm delivery and bioactive amniotic fluid leukoattractants. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:1299-303.

Cohen S, Bigazzi PE, Yoshida T. Similarities of T cell function in cell mediated immunity and antibody production. *Cell Immunol* 1974;12:150-9.

Dallman MJ, Montgomery RA, Larsen CP, Wanders A, Wells AF. Cytokine gene expression: analysis using northern blotting, polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Immunol Rev* 1991;119:163-79.

D'Alquen D, Kramer BW, Seidenspinner S et al. Activation of umbilical cord endothelial cells and fetal inflammatory response in preterm infants with chorioamnionitis and funisitis. *Pediatr Res* 2005;57:263-269.

Day D, Ugol JH, French JI, Haverkamp A, Wall RE, McGregor JA. Fetal monitoring in perinatal sepsis. *Am J Perinatol* 1992;9:28-33.

Dembinski J, Behrendt D, Martini R, Heep A, Bartmann P. Modulation of pro- and anti-

inflammatory cytokine production in very preterm infants. *Cytokine* 2003;21:200-6.

Denison FC, Elliott CL, Wallace EM. Dexamethasone-induced leucocytosis in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1997;104:851-3.

Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20:S1-13.

Døllner H, Vatten L, Halgunset J, Rahimipour S, Austgulen R. Histologic chorioamnionitis and umbilical serum levels of pro-inflammatory cytokines and cytokine inhibitors. *Br J Obstet Gynaecol* 2002;109:534-9.

Dong Y, St Clair PJ, Ramzy I, Kagan-Hallet KS, Gibbs RS. A microbiologic and clinical study of placental inflammation at term. *Obstet Gynecol* 1987;70:175-82.

Dudenhausen JW. Vorzeitiger Blasensprung, Amnioninfektionssyndrom. In: Dudenhausen JW, Pschyrembel W. *Praktische Geburtshilfe mit geburtshilflichen Operationen*. 19. Aufl. Berlin, New York: de Gruyter, 2001:88-9.

Duff P, Sanders R, Gibbs RS. The course of labor in term pregnancies with chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 1983;147:391-5.

Dumonde DC, Wolstencroft RA, Panayi GS, Matthew M, Morley J, Howson WT. "Lymphokines": non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation. *Nature* 1969;224:38-42.

Edwards RK. Chorioamnionitis and labor. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2005;32:287-96.

El Maradny E, Kanayama N, Maehara K, Kobayashi T, Terao T. Expression of interleukin-8 receptors in the gestational tissues before and after initiation of labor: immunohistochemical study. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1996;75:790-6.

Ferencik M, Rovensky J, Matha V, Herold M. Kompendium der Immunologie. Grundlagen und Klinik. Wien, New York: Springer, 2006:24-37.

Fidel Jr PL, Romero R, Cutright J et al. Treatment with the interleukin-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor Fc fusion protein does not prevent endotoxin-induced preterm parturition in mice. *J Soc Gynecol Invest* 1997;4:22-6.

Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse helper T-cells. IV. TH2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by TH1 clones. *J Exp Med* 1989;70:2081-95.

Foote MA, Hasibeder H, Campbell R, Dexter TM, Morstyn G. Granulocyte colony-stimulating factor. In: Mire-Sluis AR, Thorpe R, eds. *Cytokines*. San Diego, London, Boston: Academic Press, 1998:231-44.

Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. The effect of transforming growth factor and interleukin-10 on interleukin-8 release by human amniochorion may regulate histologic chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:794-9.

Gallagher PM, Lowe G, Fitzgerald T et al. Association of IL-10 polymorphism with severity of illness in community acquired pneumonia. *Thorax* 2003;58:154-6.

Garnier Y, Gantert M, Berger R. Perinatale Hirnschädigung: Bedeutung der intrauterinen Infektion. *Geburtsh Frauenheilk* 2004;64:464-72.

Gerdes JS. Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis. *Clin Perinatol* 1991;18:361-81.

Gibbs RS, Blanco JD, St Clair PJ, Castaneda YS. Quantitative bacteriology of amniotic fluid from women with clinical intraamniotic infection at term. *J Infect Dis* 1982;145:1-8.

Gibbs RS, Duff P. Progress in pathogenesis and management of clinical intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 1991;164:1317-26.

Gibson EM, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996;6:995-1001.

Gilstrap LC 3rd, Leveno KJ, Cox SM, Burris JS, Mashburn M, Rosenfeld CR. Intrapartum treatment of acute chorioamnionitis: impact on neonatal sepsis. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159:579-83.

Gitelman SE, Derynck R. Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). In: Nicola NA, ed. *Guidebook to cytokines and their receptors*. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press, 1994:223-6.

von Goethe JW. Herrn Staatsminister von Voigt zur Feier des 27. Septembers 1816. In: von Goethe JW. *Werke. Vollständige Ausgabe letzter Hand*. 4. Bd. Stuttgart, Tübingen: J.G. Cotta'sche Buchhandlung, 1828:98.

Goldenberg RL, Andrews WW, Faye-Petersen OM, Cliver SP, Goepfert AR, Hauth JC. The Alabama preterm birth study: corticosteroids and neonatal outcomes in 23- to 32-week newborns with various markers of intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:1020-4.

Gomez R, Romero R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Berry SM. The fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:194-202.

Greig PC, Herbert WNP, Robinette BL, Teot LA. Amniotic fluid interleukin-10 concentrations increase through pregnancy and are elevated in patients with preterm labor associated with intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173:1223-7.

Guzick DS, Winn K. The association of chorioamnionitis with preterm delivery. *Obstet Gynecol* 1985;65:11-6.

Hatzidaki E, Gourgiotis D, Manoura A et al. Interleukin-6 in preterm premature rupture of membranes as an indicator of neonatal outcome. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005;84:632-8.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real-time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;6:986-94.

Herbst A, Wolner-Hanssen P, Ingemarsson I. Risk factors for fever in labor. *Obstet Gynecol* 1995;86:790-4.

Hillier SL, Krohn M, Kiviat N, Watta H, Eschenbach DA. Microbiologic causes and neonatal outcomes associated with chorioamnion infection. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:955-61.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7276-80.

Huovinen P, Cars O. Control of antimicrobial resistance: time for action. *Br Med J* 1998;317:613-4.

Hurme M, Lahdenpohja N, Santtila S. Gene polymorphisms of interleukin 1 and 10 in infections and autoimmune diseases. *Ann Med* 1998;30:469-73.

Illuzzi JL, Bracken MB. Duration of intrapartum prophylaxis for neonatal group B Streptococcal disease. *Obstet Gynecol* 2006;108:1254-65.

Ishii E, Masuyama T, Yamaguchi H et al. Production and expression of granulocyte- and macrophage-colony-stimulating factors in newborns: their roles in leukocytosis at birth. *Acta Haematol* 1995;94:23-31.

Janeway Jr CA, Travers P. Die angeborene Immunität. In: Janeway Jr CA, Travers P, Walport M, Shlomchick M, Hrsg. *Immunologie*. 5. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2002:37-96.

Janssens S, Beyaert R. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:637-46.

Källman J, Ekholm L, Eriksson M, Malmström B, Schollin J. Contribution of interleukin-6 in distinguishing between mild respiratory disease and neonatal sepsis in the newborn infant. *Acta Paediatr* 1999;88:880-4.

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

Kauma S, Matt D, Strom S, Eierman D, Turner T. Interleukin-1beta, human leukocyte antigen HLA-DR alpha, and transforming growth factor-beta expression in endometrium, placenta, and placental membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1990;163:1430-7.

Khong TY, Bendon RW, Qureshi F. Chronic deciduitis in the placental basal plate: definition and inter-observer reliability. *Hum Pathol* 2000;31:292-5.

Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Mol Med* 2002;8:257-60.

Klein JO. Bacterial sepsis and meningitis. In: Remington JS, Klein JO, Baker C, Wilson CB, eds. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2005:943-98.

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

Kotiranta-Ainamo A, Rautonen J, Rautonen N. Imbalanced cytokine secretion in newborns. *Biol Neonate* 2004;85:55-60.

Kramer BW. Antenatal inflammation and lung injury: prenatal origin of neonatal disease. *J Perinatol* 2008;28:S21-8.

Krediet T, Gerards L, Fleer A, van Stekelenburg G. The predictive value of CrP and I/T-ratio in neonatal infection. *J Perinat Med* 1992;20:479-85.

Krueger M, Nauck MS, Sang S, Hentschel R, Wieland H, Berner R. Cord blood levels of interleukin-6 and interleukin-8 for the immediate diagnosis of early-onset infection in premature infants. *Biol Neonate* 2001;80:118-23.

Kruse N, Pette M, Toyka K, Rieckmann P. Quantification of cytokine mRNA expression by RT-PCR in samples of previously frozen blood. *J Immunol Methods* 1997;210:195-203.

Lahra MM, Jeffery HE. A fetal response to chorioamnionitis is associated with early survival after preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:147-51.

Lee LG, Connell CR, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucl Acids Res* 1993;21:3761-6.

Lehrnbecher T, Schrod L, Kraus D, Roos T, Martius J, von Stockhausen HB. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor in cord blood in the diagnosis of early-onset sepsis in neonates. *Acta Paediatr* 1995;84:806-8.

Lehrnbecher T, Schrod L, Rutsch P, Roos T, Martius J, von Stockhausen HB. Immunologic parameters in cord blood indicating early-onset sepsis. *Biol Neonate* 1996;70:206-12.

Leviton A. Preterm birth and cerebral palsy: is tumor necrosis factor the missing link? *Develop Med Child Neurol* 1993;35:553-8.

Levy MM, Fink MP, Marshall JC et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* 2003;29:530-8.

Li Y, Ohls RK, Rosa C, Shah M, Richards DS, Christensen RD. Maternal and umbilical serum concentrations of granulocyte colony-stimulating factor and its messenger RNA during clinical chorioamnionitis. *Obstet Gynecol* 1995;86:428-32.

Lieberman E, Lang JM, Frigletto F, Richardson DK, Ringer SA, Cohen A. Epidural analgesia, intrapartum fever, and neonatal sepsis evaluation. *Pediatr* 1997;99:415-9.

Lindley IJD. Interleukin-8. In: Mire-Sluis AR, Thorpe R, eds. Cytokines. San Diego, London, Boston: Academic Press, 1998:125-40.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. Methods 2001;25:402-8.

Lott, E. Amnioninfektionssyndrom. Eine prospektive klinisch-pathologisch-anatomische Vergleichsstudie. Inauguraldissertation, Berlin: Freie Universität, 1990.

Lyamichev V, Brow MAD, Dahlberg JE. Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases. Science 1993;260:778-83.

Mehr S, Doyle LW. Cytokines as markers of bacterial sepsis in newborn infants: a review. Pediatr Infect Dis J 2000;19:879-87.

Meisel C, Vogt K, Platzer C, Randow F, Liebenthal C, Volk HD. Differential regulation of monocytic tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 expression. Eur J Immunol 1996;26:1580-6.

Messer J, Eyer D, Donato L, Gallati H, Matis J, Simeoni U. Evaluation of interleukin-6 and soluble receptors of tumor necrosis factor for early diagnosis of neonatal infection. J Pediatr 1996;129:574-80.

Miyano A, Miyamichi T, Nakayama M, Kitajima H, Shimizu A. Effect of chorioamnionitis on the levels of serum proteins in the cord blood of premature infants. Arch Pathol Lab Med 1996;120:245-8.

Müller H, Kubli F. Das Amnioninfektionssyndrom und die vorzeitige Amnionruptur. Die manifesten und die drohenden unspezifischen intrauterinen Infektionen des letzten Schwangerschaftsdrittels. Z Geburtsh Perinatol 1975;179:77-100.

Mueller-Heubach E, Rubinstein DN, Shen-Schwarz S. Histologic chorioamnionitis and preterm delivery in different patient populations. Obstet Gynecol 1990;75:622-6.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51:263-73.

Murphy K, Travers P, Walport M, eds. *Janeway's Immunobiology. The immune system in health and disease*. 7th ed. New York: Garland, 2008.

Nelson KB, Dambrosia JM, Grether JK, Phillips TM. Neonatal cytokines and coagulation factors in children with cerebral palsy. *Ann Neurol* 1998;44:665-75.

Newton CR, Graham A. *PCR*. 2. Aufl. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum 1994.

Newton ER. Preterm labor, preterm premature rupture of membranes, and chorioamnionitis. *Clin Perinatol* 2005;32:571-600.

Ng PC, Lam HS. Diagnostic markers for neonatal sepsis. *Curr Opin Pediatr* 2006;18:125-31.

Nupponen I, Turunen R, Nevalainen T et al. Extracellular release of bactericidal/permeability-increasing protein in newborn infants. *Pediatr Res* 2002;51:670-4.

Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock* 2001;16:83-96.

Obladen M. Neonatale Infektionen. In: Dudenhausen JW, Pschyrembel W. *Praktische Geburtshilfe mit geburtshilflichen Operationen*. 19. Aufl. Berlin, New York: de Gruyter, 2001:432-5.

Ohyama M, Itani Y, Yamanak M. Re-evaluation of chorioamnionitis and funisitis with a special reference to subacute chorioamnionitis. *Hum Pathol* 2002;33:183-90.

Opsjon SL, Wathen NC, Tingulstad S et al. Tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6 in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:397-404.

Petrova A, Demissie K, Rhoads GG, Smulian JC, Marcella S, Ananth CV. Association of maternal fever during labor with neonatal and infant morbidity and mortality. *Obstet Gynecol* 2001;98:20-7.

Pinell P, Faro S, Roberts S, Le S, Maccato M, Hammill H. Intrauterine pressure catheter in labor: associated microbiology. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1993;1:60-4.

Plagemann A, Staudt A, Götz F et al. Long-term effects of early postnatally administered interleukin-1 $\beta$  on the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in rats. *Endocrine Regulat* 1998;32:77-85.

QIAamp<sup>®</sup> RNA Blood Mini Handbook. Hilden: QIAGEN GmbH, 1999.

Raynor BD, Clark P, Duff P. Granulocyte colony stimulating factor in amniotic fluid. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1995;3:140-4.

Redline RW. Inflammatory responses in the placenta and umbilical cord. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006;11:296-301.

Richards CD. Interleukin-6. In: Mire-Sluis AR, Thorpe R, eds. *Cytokines*. San Diego, London, Boston: Academic Press, 1998:87-108.

Rogers BB, Alexander JM, Head J, McIntire D, Leveno KJ. Umbilical vein interleukin-6 levels correlate with the severity of placental inflammation and gestational age. *Hum Pathol* 2002;33:335-40.

Romero R, Mazor M. Infection and preterm labor. *Clin Obstet Gynecol* 1988;31:553-84.

Romero R, Wu YK, Mazor M, Hobbins JC, Mitchell MD. Increased amniotic fluid leukotriene C<sub>4</sub> concentration in term human parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159:655-7.

Romero R, Brody DT, Oyarzun E et al. Infection and labor. III. Interleukin-1: a signal for the onset of parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1989;160:1117-23.

Romero R, Avila C, Santhanam U, Sehgal PB. Amniotic fluid interleukin-6 in preterm labor. Association with infection. *J Clin Invest* 1990;85:1392-400.

Romero R, Ceska M, Avila C, Mazor M, Behnke E, Lindley I. Neutrophil attractant/activating peptide 1/interleukin-8 in term and preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1991a;165:823-30.

Romero R, Mazor M, Manogue K, Oyarzun E, Cerami A. Human decidua: a source of cachectin-tumor necrosis factor. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991b;41:123-7.

Romero R, Tartakovsky B. The natural interleukin-1 receptor antagonist prevents interleukin-1-induced preterm delivery in mice. *Am J Obstet Gynecol* 1992;167:1041-5.

Romero R, Salafia CM, Athanassiadis AP et al. The relationship between acute inflammatory lesions of the preterm placenta and amniotic fluid microbiology. *Am J Obstet Gynecol* 1992a;166:1382-6.

Romero R, Mazor M, Sepulveda W, Avila C, Copeland D, Williams J. Tumor necrosis factor in term and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 1992b;166:1576-87.

Romero R, Yoon BH, Mazor M et al. The diagnostic and prognostic value of amniotic fluid white blood cell count, glucose, interleukin-6, and gram stain in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:805-16.

Romero R, Gomez R, Ghezzi F et al. A fetal systemic inflammatory response is followed by the spontaneous onset of preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:186-93.

Romero R, Chairapongsa T, Espinoza J. Micronutrients and intrauterine infection, preterm birth and the fetal inflammatory response syndrome. *J Nutr* 2003;133:S1668-73.

Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Nien JK. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin Fetal Neonat Med* 2006;11:317-26.

Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Hassan S. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med* 2007a;25:21-39.

Romero R, Gotsch F, Pineles B, Kusanovic JP. Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications, and fetal injury. *Nutr Rev* 2007b;65:S194-202.

Rouse DJ, Landon M, Leveno KJ, et al., and National Institute of Child Health and Human Development, Maternal-Fetal Medicine Units Network. The Maternal-Fetal Medicine Units cesarean registry: chorioamnionitis at term and its duration - relationship to outcomes. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:211-6.

Sadowsky DW, Novy MJ, Witkin SS, Gravett MG. Dexamethasone or interleukin-10 blocks interleukin-1 beta-induced uterine contractions in pregnant rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:252-63.

Salafia CM, Sherer DM, Spong CY et al. Fetal but not maternal serum cytokine levels correlate with histologic acute placental inflammation. *Am J Perinatol* 1997;14:419-22.

Sampson JE, Theve RP, Blatman RN et al. Fetal origin of amniotic fluid polymorphonuclear leukocytes. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176:77-81.

Satin AJ, Maberry MC, Leveno KJ, Sherman ML, Kline DM. Chorioamnionitis: a harbinger of dystocia. *Obstet Gynecol* 1992;79:913-5.

Schelonka RL, Infante AJ. Neonatal immunology. *Semin Perinatol* 1998;22:2-14.

Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* 2000;46:69-81.

Schrag SJ, Stoll BJ. Early-onset neonatal sepsis in the era of widespread intrapartum chemoprophylaxis. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25:939-40.

Seaward PG, Hannah ME, Myhr TL et al. International multicentre term prelabor rupture of membranes study: evaluation of predictors of clinical chorioamnionitis and postpartum fever in patients with prelabor rupture of membranes at term. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:1024-9.

Seo K, McGregor JA, French J. Preterm birth is associated with increased risk of maternal and neonatal infection. *Obstet Gynecol* 1992;79:75-80.

Shalak LF, Laptook AR, Jafri HS, Ramilo O, Perlman JM. Clinical chorioamnionitis, elevated cytokines, and brain injury in term infants. *Pediatr* 2002;110:673-80.

Silver HM. Listeriosis during pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 1998;53:737-40.

Simister NE. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine* 2003;21:3365-9.

Singh B, Merchant P, Walker CR, Kryworuchko M, Diaz-Mitoma F. Interleukin-6 expression in cord blood of patients with clinical chorioamnionitis. *Pediatr Res* 1996;39:976-9.

Smulian JC, Shen-Schwarz S, Vintzileos AM, Lake MF, Ananth CV. Clinical chorioamnionitis and histologic placental inflammation. *Obstet Gynecol* 1999a;94:1000-5.

Smulian JC, Vintzileos AM, Lai YL, Santiago J, Shen-Schwarz S, Campbell WA. Maternal chorioamnionitis and umbilical vein interleukin-6 levels for identifying early neonatal sepsis. *J Matern Fet Med* 1999b;8:88-94.

Smulian JC, Bhandari V, Vintzileos AM et al. Intrapartum fever at term: serum and histologic markers of inflammation. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:269-74.

Soper DE, Mayhall CG, Dalton HP. Risk factors for intraamniotic infection: a prospective epidemiologic study. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:562-8.

Sorensen LC, Skogstrand K, Hougaard DM et al. Cord blood inflammatory markers, foetal vasculitis and cerebral MRI abnormalities in preterm infants. *Acta Paediatr* 2007;96:1362-4.

Souaze F, Ntodou-Thome A, Tran CY, Rostene W, Forgez P. Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. *Biotechniques* 1996;21:280-5.

Sprang SR, Bazan JF. Cytokine structural taxonomy and mechanisms of receptor engagement. *Curr Opin Structural Biol* 1993;3:815-27.

Stallmach T, Hebisch G, Joller-Jemelka HI, Orban P, Schwaller J, Engelmann M. Cytokine production and visualized effects in the feto-maternal unit. *Lab Invest* 1995;73:384-92.

Steinborn A, von Gall C, Hildenbrand R, Stutte HJ, Kaufmann M. Identification of placental cytokine-producing cells in term and preterm labor. *Obstet Gynecol* 1998;91:329-35.

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

Svensson L, Ingemarsson I, Mardh PA. Chorioamnionitis and the isolation of microorganisms from the placenta. *Obstet Gynecol* 1986;67:403-9.

Taniguchi T, Matsuzaki N, Shimoya K et al. Fetal mononuclear cells show a comparable capacity with maternal mononuclear cells to produce IL-8 in response to lipopolysaccharide in chorioamnionitis. *J Reprod Immunol* 1993;23:1-12.

TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol, Foster City: Applied Biosystems, 1999.

Tasci Y, Dilbaz B, Uzmez Onal B et al. The value of cord blood interleukin-6 levels for predicting chorioamnionitis, funisitis, and neonatal infection in term premature rupture of membranes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006;128:34-9.

Terrone DA, Rinehart BK, Granger JP, Barrilleaux PS, Martin Jr JN, Bennett WA. Interleukin-10 administration and bacterial endotoxin-induced preterm birth in a rat model. *Obstet Gynecol* 2001;98:476-80.

Töllner U. Early diagnosis of septicaemia in the newborn: clinical studies and sepsis score. *Eur J Pediatr* 1982;138:331-7.

Trautman MS, Collmer D, Edwin SS, White W, Mitchell MD, Dudley DJ. Expression of Interleukin-10 in human gestational tissues. *J Soc Gynecol Invest* 1997;4:247-53.

Tsutsumi H, Matsuda K, Sone S, Takeuchi R, Chiba S. Respiratory syncytial virus-induced cytokine production by neonatal macrophages. *Clin Exp Immunol* 1996;106:442-6.

User Bulletin No. 2. Relative quantitation of gene expression. Foster City: Applied Biosystems, 2001.

Vadillo-Ortega F, Estrada-Gutierrez G. Role of matrix metalloproteinases in preterm labour. *Br J Obstet Gynaecol* 2005;112 Suppl 1:19-22.

Vogel M, Lott E, Dudenhausen JW. Korrelation von morphologischem Stadium und klinischem Symptom einer Amnionentzündung. In: Dudenhausen JW, Saling E, Hrsg. *Perinatale Medizin X*. Stuttgart: Thieme, 1984:266-7.

Vogel M. Entzündliche Veränderungen der Plazenta und ihrer Anhänge. In: Vogel M. *Atlas der morphologischen Plazentadiagnostik*. 2. Aufl. Berlin: Springer, 1996:93-110.

Volk HD, Döcke WD. *Praktikum Immunologische Methoden/Semiquantitative RT-PCR*. Berlin: Institut für Medizinische Immunologie, Charité, 2000.

Volk HD, Keyßer G, Burmester GR. Zytokine und Zytokin-Rezeptoren. In: Thomas L, Hrsg. *Labor und Diagnose*. 7. Aufl. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft, 2008:1039-51.

de Waal-Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CF, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis in human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174:1209-20.

Weeks JW, Reynolds N, Taylor D, Lewis J, Wan T, Gall SA. Umbilical cord blood interleukin-6 levels and neonatal morbidity. *Obstet Gynecol* 1997;90:815-8.

Wendel PJ, Cox SM, Roberts SW, Dax J, Gilstrap LC 3rd. Chorioamnionitis: The association of non-reassuring fetal heart-rate patterns and interval from diagnosis to delivery on neonatal outcome. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1994;2:162-6.

Winkler M. Role of cytokines and other inflammatory mediators. *Br J Obstet Gynaecol* 2003;110 Suppl 20:118-23.

Woiciechowsky C, Asadullah K, Nestler D et al. Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury. *Nat Med* 1998;4:808-13.

Yoon BH, Romero R, Yang SH et al. Interleukin-6 concentrations in umbilical cord plasma are elevated in neonates with white matter lesions associated with periventricular leukomalacia. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:1433-40.

Yoon BH, Kim CJ, Romero R et al. Experimentally induced intrauterine infection causes fetal brain white matter lesions in rabbits. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:797-802.

Yoon BH, Romero R, Park JS et al. Fetal exposure to an intra-amniotic inflammation and the development of cerebral palsy at the age of three years. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:675-81.

Yoon BH, Romero R, Moon JB et al. Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:1130-6.

Yoon BH, Park CW, Chaiworapongsa T. Intrauterine infection and the development of cerebral palsy. *Br J Obstet Gynaecol* 2003;110,Suppl 20:124-7.

Zahl PA, Bjerknes C. Induction of decidua-placental hemorrhage in mice by the endotoxins of certain gram-negative bacteria. *Proc Soc Exp Biol Med* 1943;54:329-32.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

AIS	Amnioninfektionssyndrom
BE	Base excess
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
CrP	C-reaktives Protein
C <sub>T</sub>	Threshold cycle, Schwellenwertzyklus
CTG	Kardiotokogramm
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FET	Fluoreszenz-Energietransfer
FIRS	fetal inflammatory response syndrome
g	Gramm
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
h	Stunde(n)
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IgG	Immunglobulin G
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-1Ra	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
IL-2	Interleukin-2
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
I/T-Ratio	Immature/Total neutrophils-Ratio

kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NapH	Nabelarterien-pH
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
nl	Nanoliter
NO	Stickstoffmonoxid
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PCR	Polymeraseketten-Reaktion
pg	Picogramm
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde(n)
SGA	small for gestational age
spm	Schläge pro Minute
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SSW	Schwangerschaftswoche(n)
TGF-β1	Transforming-growth-factor-β1
TNF-α	Tumornekrose-Faktor-α
U	Units
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar

## 8 Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Ulrich Büscher für die Überlassung des Themas und die intensive und unermüdliche Unterstützung des Entstehens der Arbeit sowie die stets anregende wissenschaftliche Diskussion und konstruktive Kritik.

Mein besonderer Dank gilt meinem Chef und akademischen Lehrer Herrn Professor Dr. med. Joachim W. Dudenhausen, Direktor der Kliniken für Geburtsmedizin der Charité, für seine Anregungen, Ausdauer und kritische Anteilnahme an dieser Arbeit. Durch sein Vorbild hat er das Interesse an wissenschaftlicher Arbeit in mir geweckt.

Bei Herrn Professor Dr. med. Hans-Dieter Volk, Direktor des Instituts für Medizinische Immunologie der Charité, und seinem Team möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, in seinem Labor die der Arbeit zugrunde liegenden Methoden zu erlernen. Ich danke Herrn PD Dr. rer. nat. Thomas Ritter und seiner Arbeitsgruppe im Ida-Simon-Haus, vor allem Frau MTA Katrin Vogt, für Hilfe, Ratschläge und eine gute Arbeitsatmosphäre.

Herrn Professor Dr. med. Michael Obladen und Herrn Professor Dr. med. Christoph Bühner, Direktor der Klinik für Neonatologie der Charité, danke ich für die Möglichkeit des Einblicks in die faszinierende Welt der Neugeborenen.

Herrn Professor Dr. med. Martin Vogel danke ich für die Vermittlung grundlegender Kenntnisse in der Plazentologie.

Herrn Dr. med. Frank Chen und Herrn Dr. med. Thomas Harder danke ich für wertvolle Hinweise in Fragen der statistischen Auswertung.

Einen aufrichtigen Dank möchte ich dem Kreißsaalteam der Klinik für Geburtsmedizin der Charité, Campus Virchow-Klinikum, das mir beim Sammeln der Nabelschnurblutproben geholfen hat, aussprechen.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre fortwährende Geduld, Unterstützung und Motivation zu dieser Arbeit bedanken.

## **9 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## 10 Publikationen

Henrich W, Stupin JH, Bühling KJ, Bühler C, Bassir C, Dudenhausen JW. Prenatal sonographic findings of thalamic cavernous angioma. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2002;19:518-22.

Stupin JH, Henrich W, Bühler C, Dudenhausen JW. [Prenatal findings, perinatal management and postoperative course in a child suffering from a cavernous tumour of the thalamus.] *Zentralbl Gynakol* 2002;124:336-7.

Luttkus AK, Stupin JH, Callsen TA, Dudenhausen JW. Feasibility of simultaneous application of fetal electrocardiography and fetal pulse oximetry. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003;82:443-8.

Luttkus AK, Callsen TA, Stupin JH, Dudenhausen JW. Pulse oximetry during labour--does it give rise to hope? Value of saturation monitoring in comparison to fetal blood gas status. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;110 Suppl 1:S132-8.

Luttkus AK, Norén H, Stupin JH et al. Fetal scalp pH and ST analysis of the fetal ECG as an adjunct to CTG. A multi-center, observational study. *J Perinat Med* 2004;32:486-94.

Sehouli J, Stupin JH, Schlieper U et al. Actinomycotic inflammatory disease and misdiagnosis of ovarian cancer. A case report. *Anticancer Res* 2006;26:1727-31.

Harder T, Schellong K, Stupin J, Dudenhausen JW, Plagemann A. Where is the evidence that low birthweight leads to obesity? *Lancet* 2007;369:1859.

Norén H, Luttkus AK, Stupin JH et al. Fetal scalp pH and ST analysis of the fetal ECG as an adjunct to cardiotocography to predict fetal acidosis in labor--a multi-center, case controlled study. *J Perinat Med* 2007;35:408-14.

Stupin JH, David M, Siedentopf JP, Dudenhausen JW. Emergency cerclage versus bed rest for amniotic sac prolapse before 27 gestational weeks. A retrospective, comparative study of 161 women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008;139:32-7.

Plagemann A, Harder T, Rodekamp E, Schellong K, Stupin J, Dudenhausen JW. Ernährung und frühkindliche Prägung. In: Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V., Hrsg. Ernährungsbericht 2008. Meckenheim: DGE Medienservice, 2008:271-300.

Henrich W, Blasi I, Stupin JH, Dudenhausen JW. Ectopic pregnancy complicated by an arteriovenous malformation of the fallopian tube: preoperative sonographic findings and intraoperative correlation. *J Ultrasound Med* 2008;27:1257-61.

## 11 Erklärung

„Ich, Jens Stupin, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

**Quantitative mRNA-Bestimmung von Zytokinen aus mononukleären Nabelschnurblutzellen nach Geburten von Schwangeren mit Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom mittels real-time TaqMan RT-PCR**

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 24. Oktober 2009