

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie
(Campus Virchow-Klinikum)
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Vergleichende Untersuchung der Immunkompetenz Früh-
und Reifgeborener anhand der HLA-DR-Expression
von Monozyten und dendritischen Zellen“

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jessy Linn Johanna Porz

aus Berlin

Datum der Promotion: 04.09.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	5
1. Abstrakt	7
2. Einleitung.....	11
2.1. Komplikationen bei Frühgeborenen.....	11
2.1.1 Epidemiologie von Infektionen Frühgeborener	11
2.1.2 Das akute Atemnotsyndrom bei Frühgeborener	12
2.2 Das innate Immunsystem	13
2.2.1 Komponenten des angeborenen Immunsystems	13
2.2.2 Untergruppen von Monozyten	15
2.2.3 HLA-DR als globaler Marker der Immunkompetenz	16
2.2.4 Dendritische Zellen und HLA-DR 17	
2.3 Das angeborene Immunsystem Neugeborener	19
2.3.1 Risikofaktoren für die erhöhten Infektionsraten Frühgeborener	19
2.3.2 Antigen-präsentierende Zellen	20
2.4 Immunschwäche und Immunparalyse	21
2.5 Spezifische Zielsetzungen der Arbeit	22
3. Material und Methoden	25
3.1 Materialien.....	25
3.1.1 Verwendete Stoffe	25
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	26
3.1.3 Geräte	26
3.1.4 Software	26
3.2 Methodik.....	27
3.2.1 Studiendesign	27
3.2.2 Untersuchungsablauf	28
3.2.3 Grundlagen der FACS-Analyse	31
3.2.4 Analyse der Blutproben: Quantifizierung der monozytären HLA–DR Expression, Analyse der DC-Subpopulationen	32
3.2.5 Darstellung und statistische Auswertung	34
4. Ergebnisse.....	39
4.1 Studienpopulation und Follow up	39
4.2 Verteilung der Leukozyten-Subgruppen	41
4.3 Verteilung dendritischer Zellen	46

4.4 HLA-DR-Expression auf Monozyten und dendritischen Zellen.....	47
4.5 Verlauf der HLA-DR-Expression von Monozyten und dendritischen Zellen in der frühen Postnatalphase	53
4.6 Die Korrelation der HLA-DR-Expression mit klinischen Parametern	56
4.6.1 Korrelation der HLA-DR-Expression mit Gestationsalter und Geburtsgewicht	56
4.6.2 Korrelation der HLA-DR-Expression mit pH-Wert, Apgar-Score, antibiotischer Therapie und mechanischer Ventilation	57
4.6.3 HLA-DR-Expression bei Neugeborenen mit akutem Atemnotsyndrom	58
5. Diskussion	63
5.1 Erhöhte Anzahl von zirkulierenden Leukozyten und Monozyten- Subpopulationen bei Neugeborenen	64
5.2 Frequenzen myeloider und plasmazytoider dendritischer Zellen.....	65
5.3 HLA-DR-Expression auf Monozyten an T1	67
5.4 HLA-DR-Expression an T1 bei dendritischen Zellen.....	69
5.5 Ansteigendes HLA-DR bei Monozyten und dendritischen Zellen im Beobachtungszeitraum.....	70
5.6 Die Korrelation der HLA-DR-Expression mit klinischen Parametern	71
5.7 Zusammenfassung/Ausblick	73
5.8 Limitationen der vorliegenden Arbeit	75
6. Literaturverzeichnis	77
7. Eidesstattliche Versicherung	83
8. Lebenslauf	85
9. Publikation	86
10. Danksagung.....	87

Abkürzungsverzeichnis

Ab	engl.: antibody
ANS	akutes Atemnotsyndrom
APC	Allophycocyanin
APC	engl.: antigen presenting cell
Aqua dest.	Latein: aqua destillata
ARDS	engl.: acute respiratory distress syndrome
BDCA	engl.: blood dendritic cell antigen
BE	Basenexcess
CD	engl.: cluster of differentiation
CPAP	engl.: continuous positive airway pressure
CRIB	engl.: clinical risk score for babies
CRP	C-reaktives Protein
DC	dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Erythrozytenkonzentrat
et al.	Latein: et alii
FACS	engl.: fluorescence activated cell sorting
FiO ₂	Fraktion des inhalierten Sauerstoffs
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	engl: forward scatter
g	Gramm
HLA	engl.: humane leukocyte antigen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
MDC	myeloide dendritische Zelle
MHC	engl.: major histocompatibility complex
Min	Minuten
Monos	Monozyten
PDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Komplex

Abkürzungsverzeichnis

SSC	engl.: side scatter
SSW	Schwangerschaftswochen
T	Untersuchungszeitpunkt
TLR	Toll-like-Rezeptor
VLBW/ VLBWI	engl.: very low birth weight infants
ZVK	zentraler Venenkatheter

1. Abstrakt

Einleitung: Frühgeborene haben die höchsten Infektionsraten von allen pädiatrischen Patienten. Die erhöhte Anfälligkeit insbesondere Frühgeborener gegenüber Infektionen ist trotz intensiver Bemühungen zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht umfassend geklärt. Als Antigen-präsentierende Zellen spielen Monozyten und dendritische Zellen eine entscheidende Rolle in der frühen Immunantwort. Über MHC-Klasse-II-Moleküle präsentieren sie fragmentierte Antigene und bewirken so eine Aktivierung spezifischer Immunzellen. HLA-DR ist das am stärksten exprimierte Klasse-II-MHC Molekül auf humanen Monozyten und eignet sich als ein globaler Parameter der Immunkompetenz. Inwiefern phänotypische Unterschiede in der HLA-DR-Expression Früh- und Reifgeborener im Vergleich zu Erwachsenen als Ausdruck einer verminderten Immunkompetenz in den ersten Lebenstagen und -wochen vorliegen, ist Gegenstand der aktuellen Untersuchung. Methodik: In einer monozentrischen prospektiven Beobachtungsstudie wurden 28 Frühgeborene an fünf Zeitpunkten innerhalb der ersten 28 Lebenstage sowie 15 Reifgeborene und 10 Erwachsene einmalig untersucht. Stellvertretend für die Gesamtpopulation Antigen-präsentierender Zellen analysierten wir mittels Durchflusszytometrie verschiedene Subpopulationen von Monozyten ($CD14^{++}16^{-}$, $CD14^{+}16^{+}$, $CD14^{(+)}16^{++}$ Monos) und dendritischen Zellen (myeloide und plasmazytoide) nach ihrem Expressionsmuster von HLA-DR in der frühen Postnatalperiode. Ergebnisse: Wir sahen einen klaren Zusammenhang zwischen niedrigem Gestationsalter, geringem Geburtsgewicht und verminderter monozytärer HLA-DR-Expression. Ferner zeigte sich die HLA-DR-Expression auf klassischen Monozyten, Übergangsmoноzyten und dendritischen Zellen bei Neugeborenen im Vergleich zu Erwachsenen reduziert, wobei diese Beobachtung bei Frühgeborenen am deutlichsten war. Für pro-inflammatorische Monozyten fanden sich dagegen bei Neugeborenen vergleichbare oder sogar höhere HLA-DR-Expressionen als bei Erwachsenen. Weiterhin kam es bei Frühgeborenen zu einem deutlichen Anstieg der monozytären HLA-DR-Expression während des Beobachtungszeitraums. Diskussion: Bereits frühere Studien deuten auf eine passagere schwerwiegende Immundefizienz Frühgeborener im Vergleich zu Reifgeborenen in der frühen

Postnatalperiode hin. Auch die durch uns beobachtete verminderte HLA-DR-Expression auf Monozyten und dendritischen Zellen bei Neugeborenen beschreibt einen vom Gestationsalter und Geburtsgewicht abhängigen Zustand immunologischer Unreife und könnte mitverantwortlich sein für die deutlich erhöhten Infektionsraten von Frühgeborenen. Die Identifizierung weiterer immunologischer Parameter zur Vorhersagbarkeit eines erhöhten Infektionsrisikos dieser Hochrisiko-Gruppe Neugeborener sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Selbstkritisch bleibt anzumerken, dass die Bewertung der Allgemeingültigkeit unserer Beobachtungen insbesondere durch die im Hinblick auf klinische Fragestellungen sehr niedrige Fallzahl an Studienprobanden limitiert ist.

Abstract

Introduction: Pre-term neonates have an increased susceptibility to bacterial and viral pathogens, which leads to the highest infection rates of all pediatric patients. Despite intense scientific efforts, this phenomenon has not been fully elucidated yet. Since monocytes and dendritic cells present peptides of intracellular-processed antigens *via* MHC II molecules, these antigen-presenting cells play a crucial role in early immune responses. On human monocytes, HLA-DR shows highest expression of all class II MHC molecules and may therefore serve as a parameter to globally assess immunocompetence. This work focusses on the central question if phenotypic differences in monocytic as well as dendritic cell HLA-DR expression between pre-term neonates and full-term neonates in comparison to adults can be detected as a marker of reduced immunocompetence during the first days and weeks of life. Methods: In a monocentric prospective observational study, 28 pre-term neonates (5 different time points during the first 28 days of life), 15 full-term neonates (72-96 hours after birth) and 10 adults were investigated. As a substitute of the total population of antigen-presenting cells, different subpopulations of monocytes (CD14⁺⁺16⁻, CD14⁺16⁺, CD14⁽⁺⁾16⁺⁺) and dendritic cells (myeloid, plasmacytoid) were analyzed for their HLA-DR expression patterns. Results: A clear correlation between low gestational age, low birth weight and diminished monocytic HLA-DR expression could be established. Moreover, HLA-DR expression on classic

monocytes, transitional monocytes and dendritic cells was found to be reduced in neonates when compared to adults. This observation was most obvious in pre-term neonates. In contrast, proinflammatory monocytes showed similar or even higher HLA-DR expression levels in neonates than in adults. Moreover, an increase on monocytic HLA-DR expression was detected in pre-term neonates during the observation period. Discussion: Previous analyses have already pointed towards a temporary severe immunodeficiency of pre-term neonates in comparison to full-term babies during the early postnatal period. In line with this, diminished monocytic and dendritic cell HLA-DR expression in neonates were observed in this study, arguing for a state of immunological immaturity that correlates with gestational age as well as birth weight. This condition may in part account for increased infection rates in pre-term neonates. Further work focusing on the identification of additional immunological parameters is needed in order to accurately predict susceptibility to infections in this high-risk population. However, taking into account the limited number of subjects which could be investigated in this study, the observations discussed here may not fully apply to other populations.

2. Einleitung

Frühgeborene haben die höchsten Infektionsraten von allen pädiatrischen Patienten (Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen am Institut für Hygiene und Umweltmedizin Charité – Universitätsmedizin Berlin, 2009). Für eine adäquate Immunabwehr gegen mikrobielle Organismen sind komplexe Mechanismen des innaten und des erworbenen Immunsystems sowie eine koordinierte Immunantwort entscheidend. Bereits in früheren Studien wurde diskutiert, dass nicht nur organ-spezifische Komplikationen die erhöhten Infektionsraten Frühgeborener bedingen, sondern zusätzlich eine Unreife der zellulären Immunität als Ausdruck einer frühen Geburt vorzuliegen scheint. Die zunehmende Inzidenz von Frühgeburtlichkeit sowie verbesserte Überlebenschancen Frühgeborener durch eine fortschrittliche medizinische Versorgung führen zu einer steigenden Anzahl von Säuglingen mit erhöhtem und verlängertem Infektionsrisiko (Strunk et al., 2011).

2.1. Komplikationen bei Frühgeborenen

2.1.1 *Epidemiologie von Infektionen Frühgeborener*

Komplikationen durch Infektionen sind der Hauptgrund für ein ungünstiges Outcome bei Frühgeborenen (Strunk et al., 2011). So stellt die neonatale Sepsis die führende Todesursache bei Kindern dar; die Mortalitätsrate liegt bei mehr als einer Millionen Tote pro Jahr weltweit (Gentile et al., 2014).

In Deutschland machen Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht <2500g jährlich einen Anteil von ca. 5-15% aller Lebendgeborenen aus (Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention, Robert Koch-Institut, 2007). Die Mehrheit aller Infektionen tritt bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht <1500g (sog. VLBWI = Very low Birth Weight Infants) und/ oder einem Gestationsalter < 28 SSW (Schwangerschaftswochen) auf (Gentile et al., 2014). Diese Subpopulation, in Deutschland ca. 0,8-1,5% aller Lebendgeborenen von 1993-2003 (Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention, Robert Koch-Institut, 2007), weist ein deutlich erhöhtes Risiko auf, eine Sepsis oder eine schwere Infektion zu entwickeln und obwohl sie nur einen geringen Prozentsatz aller Neugeborenen in Industrienationen ausmacht, trägt sie als

Hochrisikogruppe einen unverhältnismäßig hohen Anteil an Morbidität und Mortalität bei Neugeborenen. So konnte in Studien gezeigt werden, dass mehr als 60% aller dokumentierten nosokomialen Infektionen bei Frühgeborenen auftreten und daraus deutlich verlängerte Liegezeiten resultieren im Vergleich zu Neugeborenen ohne Infektionen (Gastmeier et al., 1998, Drews et al., 1995, Hentschel et al., 1998). 2,4-7% aller VLBWI entwickeln eine Early-onset Sepsis (Sepsis beginnend vor der 72. Lebensstunde) (Pisani et al., 2012). Maternale Dispositionen wie präpartale Infektionen (z.B. ein Amnioninfektionssyndrom und/ oder Fieber $>38^{\circ}\text{C}$) oder vorzeitige Blasensprünge erhöhen das Risiko Frühgeborener, eine Early-onset Sepsis zu entwickeln. Prädisponierende Faktoren für das Auftreten von Infektionen sind weiterhin ein niedriges Gestationsalter, niedrige Apgar-Werte sowie ein hoher CRIB-Score (Pisani et al., 2012).

Auch die Mehrheit aller nosokomialen Infektionen tritt bei Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht $<1500\text{g}$ (VLBWI) und/ oder einem Gestationsalter <28.0 SSW auf; so erkrankten z.B. etwa 30% aller VLBW-Frühgeborenen an einer nosokomialen Sepsis (Late-onset-Sepsis) mit einer Mortalitätsrate von ca. 18% (Bersani et al., 2012).

Während das Keimspektrum bei einer Early-onset Sepsis vorrangig im gramnegativen Bereich liegt (besonders häufig E.coli, (Pisani et al., 2012)), spielen bei der Late-onset Sepsis neben gramnegativen Erregern wie E.coli, Klebsiellen, Pseudomonaden, Serratien und Enterobacter auch grampositive Keime wie koagulase-negative Staphylokokken, Staphylococcus aureus und Enterokokken eine entscheidende Rolle (Bersani et al., 2012). Eine Infektion mit gramnegativen Erregern führt häufiger zu fulminanten Verläufen mit Multiorganversagen und Tod auf den Intensivstationen (Bersani et al., 2012).

2.1.2 Das akute Atemnotsyndrom bei Frühgeborenen

Das akute Atemnotsyndrom ist neben Infektionen eine weitere häufige Komplikation von Frühgeburtslichkeit und führt nicht selten zu langfristigen Atemwegserkrankungen wie einer bronchopulmonalen Dysplasie, welche gegenwärtig bei rund 15% der Frühgeborenen unter 32 Schwangerschaftswochen in Europa beobachtet wird (Gortner et al., 2011). Aufgrund der insuffizienten Synthese von Surfactant in der unreifen fetalen Lunge

kommt es zu einem unzureichenden Gasaustausch mit folgender Hypoxie, Hyperkapnie sowie zu alveolären Atelektasen. Eine antenatale Steroidtherapie bei drohender Frühgeburt verbessert nachweislich die Prognose von Frühgeborenen und gilt inzwischen seit mehr als 30 Jahren als sicherste Prophylaxe eines akuten Atemnotsyndroms aber auch anderer Komplikationen wie intraventrikulären Hirnblutungen sowie nekrotisierender Enterokolitis (Liggins et al., 1972, Serrano et al., 2013, Sotiriadis et al., 2009, Romejko-Wolniewicz et al., 2013, Wilms et al., 2011). Erst ab der 34. Schwangerschaftswoche wird in der fetalen Lunge ausreichend Surfactant für einen effektiven Gasaustausch gebildet (Serrano et al., 2013). Eine maternale Steroidgabe wird demzufolge bei drohender Frühgeburtlichkeit von der 24.-34. Schwangerschaftswoche empfohlen (Serrano et al., 2013, Sotiriadis et al., 2009). Der beste Zeitraum einer Verabreichung liegt dabei mindestens 24-48 Stunden bis maximal 7 Tage vor der Geburt (Romejko-Wolniewicz et al., 2013, Wilms et al., 2011). Der genaue Mechanismus des positiven Effekts von Glukokortikoiden ist bis ins Detail nicht geklärt; unter anderem kommt es zu einer Aktivierung Lipogenese-induzierender Enzyme, die für die Bildung des Surfactant mitverantwortlich sind. Neben dem positiven Effekt in Bezug auf die Verhinderung organspezifischer Komplikationen wird in anderen Studien jedoch die Begünstigung einer postnatalen passageren Immundepression bei Frühgeborenen durch Steroide postuliert (Palojärvi A, Andersson S et al., 2013).

2.2 Das innate Immunsystem

2.2.1 Komponenten des angeborenen Immunsystems

Eine physiologische Reaktion des Körpers auf das Vorhandensein pathogener Mikroorganismen ist die Induktion einer unspezifischen protektiven Entzündungsreaktion und die dadurch initiierte Aktivierung immunologischer Prozesse zur effizienten Bekämpfung der Pathogene am Ort des Geschehens.

Insbesondere in den ersten Lebensmonaten kommt dem innaten oder auch angeborenen Immunsystem eine Schlüsselrolle bei der körpereigenen Abwehr zu (Tissières et al., 2012). Das angeborene Immunsystem besteht aus einer Vielzahl löslicher und zellulärer Komponenten, welche Mikroorganismen binden, opsonisieren und zerstören. Zu den löslichen Bestandteilen zählt unter anderem

Einleitung

neben unspezifischen Mediatoren wie Interferonen, Kollektinen, Pentraxinen, Defensinen und Interleukinen das Komplementsystem. Über verschiedene Wege werden als Komplementfaktoren bezeichnete Proteasen aktiviert und führen so zur Formatierung eines proteolytischen Komplexes (C5-Konvertase). Prinzipiell wird zwischen drei Wegen der Komplementaktivierung unterschieden: erstens einem klassischen, vorrangig durch IgG- und IgM-Komplexe vermittelten Antikörper-abhängigen Weg, zweitens dem Lectin-Weg, der über eine Bindung an Mannose-Resten auf Bakterien erfolgt und drittens dem alternativen Weg, der über Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien vermittelt wird. Neben der Bildung von Anaphylatoxinen mit vasodilatatorischer und chemotaktischer Wirkung kommt es zur Ausbildung eines sogenannten „Membranangriffskomplexes“ (MAK) (Ward, 2004).

Unter den zellulären Komponenten stellen natürliche Killerzellen, neutrophile Granulozyten und myeloide APCs einen wichtigen Bestandteil des innaten Immunsystems dar. Zu den sogenannten Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) gehören Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und B-Lymphozyten. APCs sind imstande, Pathogene aufzubereiten, dem adaptiven Immunsystem als antigene Peptide zu präsentieren, T-Zellen zu aktivieren und dadurch wiederum die Bildung spezifischer Antikörper durch B-Zellen einzuleiten. Durch eine Interaktion mit Lymphozyten sezernieren APCs weiterhin spezifische Interleukine (z.B. IL-1, IL-6) und initiieren dadurch die sogenannte „Akute-Phase-Antwort“; eine koordinierte Reaktion des Organismus auf bakterielle Infektionen oder Gewebeerletzungen. Im Rahmen der „Akute-Phase-Reaktion“ kommt es unter anderem zu einem Anstieg der Biosynthese spezieller Plasmaproteine, den „Akute-Phase-Proteinen“, sowie zu einer Rekrutierung neutrophiler Granulozyten. So wird beispielsweise Interleukin 6 (IL-6) als Aktivator der Akute-Phase-Reaktion und als Lymphozyten-stimulierender Faktor angesehen. Weiterhin ist IL-6 bei der Regulation der Apoptose von Leukozyten beteiligt und begrenzt die Migration neutrophiler Granulozyten am Ort der Inflammation. Ein Ansteigen von IL-6 ist meist vor dem Nachweis erhöhter Konzentrationen von C-reaktivem Protein (CRP) und TNF-alpha zu beobachten (Fan et al., 2012).

Zu den Antigen-präsentierenden Zellen zählen Monozyten; sie sind Vorläuferzellen anderer Immunzellen wie beispielsweise Makrophagen, welche als Phagozyten der Beseitigung von Mikroorganismen dienen (Dasari et al.,

2011). Die neben den Monozyten unter den im peripheren Blut zirkulierenden APCs sind Vorläufer dendritischer Zellen (DC). Dendritische Zellen werden im Wesentlichen in myeloide (MDC) und plasmazytoide (PDC) dendritische Zellen unterschieden und stellen die potentesten Antigen-präsentierenden Zellen dar (Shortman et al., 2002). Sie sind entscheidend für die Aktivierung der spezifischen Immunantwort bei Anwesenheit pathogener Mikroorganismen (Li et al., 2012). Zusammengefasst sind APCs gleichzeitig als eine Schnittstelle und als eine wesentliche Verbindung zwischen dem unspezifischen angeborenen und dem antigen-spezifischen erworbenen Immunsystem zu sehen (Strunk et al., 2011).

2.2.2 Untergruppen von Monozyten

Monozyten stellen eine Untergruppe der Leukozyten dar und kommen in allen Wirbeltieren vor. Sie werden sowohl durch ihr Vorkommen und ihren Phänotyp als auch durch ihre charakteristische Gen- und RNA-Expression definiert. Monozyten machen ca. 10% aller kernhaltigen Zellen in humanem Blut aus; weiterhin findet sich ein nicht unerheblicher Pool in Milz und Lunge, welcher bei Bedarf mobilisiert werden kann. Im Blut weisen Monozyten eine relativ kurze Halbwertszeit von ca. 20 Stunden auf. Dieser Fakt und die Beobachtung, dass sie in verschiedenen inflammatorischen Situationen zu einem Anstieg gewebständiger Zellen beitragen, legen nahe, dass im Blut zirkulierende Monozyten ein transientes Reservoir für Vorläuferzellen gewebständiger Bestandteile des mononukleär-phagozytären Systems (MPS) darstellen (Ginhoux et al., 2014). Humane Monozyten können anhand ihrer Expression der Oberflächenmarker CD14 und CD16 (auch bekannt als Fcγ RIII) hauptsächlich in drei Subpopulationen unterteilt werden: in CD14⁺⁺CD16⁻ (sogenannte „klassische“), CD14⁺CD16⁺ (sogenannte Übergangs-) und CD14⁽⁺⁾CD16⁺⁺ (sogenannte pro-inflammatorische) Monozyten (das + steht dabei für positiv, das – für negativ). In gesunden Erwachsenen machen CD14⁺⁺CD16⁻ Zellen etwa 80-90% aller zirkulierenden Monozyten aus (Sohlberg et al., 2011). Bei inflammatorischen Prozessen oder Verletzungen werden sie rekrutiert und dienen als Vorläufer peripherer mononukleärer Phagozyten. 10-15% humaner Monozyten sind pro-inflammatorisch; sie sind unter anderem für eine intakte endotheliale Funktion, die Koordination immunologischer Antworten auf

intraluminalen Stress und eine Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zuständig (Ginhoux et al., 2014) und lassen sich interessanterweise bei erwachsenen Patienten mit Sepsis oder Autoimmunerkrankungen in deutlich erhöhten Frequenzen nachweisen (Belge et al., 2002, Poehlmann et al., 2009). Nach Stimulation durch spezifische Mediatoren fallen CD14⁽⁺⁾16⁺⁺ Monozyten durch die Sekretion größerer Mengen pro-inflammatorischer Zytokine wie beispielsweise TNF-alpha und Interleukin 12 auf (Ziegler-Heitbrock, 2014). Da sie morphologische, zytochemische, immunphänotypische und funktionelle Unterschiede zu klassischen Monozyten aufweisen, werden sie von manchen Autoren auch als eine dritte Gruppe dendritischer Zellen betrachtet (Darmochwal-Kolarz et al., 2003). Zellen, die sich in ihrer Oberflächenexpression CD14⁺CD16⁺ zeigen, bilden die dritte Population von Monozyten: die Übergangsmoноzyten. In klinischen Studien konnte eine Expansion von Übergangsmoноzyten während verschiedener autoimmuner und maligner Erkrankungen wie beispielsweise Sarkoidose, Asthma oder bei kolorektalen Karzinomen beobachtet werden. Funktionelle Arbeiten zeigten eine höhere Antigen-präsentierende und pro-angiogenetische Aktivität als bei anderen Monozyten-Subpopulationen (Ziegler-Heitbrock, 2014). Weiterhin scheint eine zunehmende Anzahl von Übergangsmoноzyten auch eine erhöhte Anzahl an pro-inflammatorischen Monozyten nach sich zu ziehen, was auf eine nahe Verwandtschaft beider Zellreihen hindeutet (Ziegler-Heitbrock 2014).

2.2.3 HLA-DR als globaler Marker der Immunkompetenz

Eine wesentliche Eigenschaft von APCs ist neben der für alle kernhaltigen Körperzellen gültigen Expression von Klasse-I-MHC-Molekülen (Haupthistokompatibilitätskomplex, engl.: major histocompatibility complex, MHC) die Oberflächenexpression von Klasse-II-MHC-Molekülen. Die zentrale Rolle dieser HLA-Moleküle (HLA: Humanes Leukozyten-Antigen) in der Immunantwort wird in der Präsentation von, aus der Prozessierung von Proteinantigenen hervorgegangenen, Proteinfragmenten zur Steuerung der Reifung und Funktionalität von T-Lymphozyten gesehen. Eine Darbietung phagozytierter und fragmentierter Antigene über Klasse-II-MHC-Moleküle führt zusammen mit der Bereitstellung ko-stimulatorischer Signale unter anderem über die Aktivierung von T-Helferzellen zur Initiierung einer spezifischen Immunantwort (Waßmuth,

2005). HLA-DR ist das am stärksten exprimierte Klasse-II-MHC Molekül auf humanen Monozyten und eignet sich als ein globaler Parameter der Immunkompetenz. Sein Abfall geht sowohl mit einer Verminderung der Expression ko-stimulatorischer Moleküle (wie z.B. CD80 und CD86) als auch mit einer herabgesetzten Zytokinsekretionskapazität der Zellen einher (Döcke et al., 2005). Eine verminderte Expression von HLA-DR auf Monozyten lässt sich häufig bei erwachsenen Patienten nach schwerem Trauma, großen Operationen sowie im Verlauf einer Sepsis beobachten und ist mit einer erhöhten Inzidenz von Infektionen und einer schlechteren Prognose assoziiert (Azizia et al., 2012, Höflich et al., 2002, Monneret et al., 2004, Monneret et al., 2006, Hynninen et al., 2003, Meisel et al., 2005). Eine erniedrigte monozytäre HLA-DR-Expression bei Patienten mit vorliegender Sepsis wird als „Sepsis-assoziierte Immunsuppression“ (SAI) bezeichnet und ist mit einem ungünstigen Outcome assoziiert (Schefold et al., 2007, Meisel et al., 2009). Die herabgesetzte HLA-DR-Expression scheint dabei Ausdruck einer funktionellen Deaktivierung der Zellen zu sein und geht mit einer unzureichenden Antigen-Präsentation einher. Die unter anderem dadurch induzierte Immunsuppression ist eine wesentliche Ursache für Sepsis-begleitende Morbidität und Mortalität bei adulten Patienten (Hotchkiss, 2013).

Die klinische Relevanz der Expression von HLA-DR auf klassischen, CD14-positiven, Monozyten ist gut untersucht. Deutlich weniger Daten existieren für die Population der pro-inflammatorischen Monozyten, welche sich durch eine im Vergleich höhere Oberflächenexpression von Klasse-II-MHC-Molekülen und eine damit verbundene effektivere Antigen-Präsentation auszeichnet.

2.2.4 Dendritische Zellen und HLA-DR

Dendritische Zellen stellen die potentesten antigen-präsentierenden Zellen dar (Adkins et al., 2004, Poehlmann et al., 2009) und bilden eine Brücke zwischen dem innaten Immunsystem und der erworbenen Immunität (Huang et al., 2007). Neben der Induktion einer frühen Immunantwort regulieren dendritische Zellen die Immuntoleranz und sind entscheidend beteiligt an der Induktion der T-Zell-vermittelten Immunantwort. Dendritische Zellen sind in der Lage, die Antigen-spezifische Aktivierung und Differenzierung von naiven T-Zellen zu induzieren (Darmochwal-Kolarz et al., 2003).

Einleitung

Im peripheren Blut lassen sich im Wesentlichen zwei verschiedene Linien dendritischer Zellen (DC) unterscheiden: myeloide (MDC) und plasmazytoide (PDC) dendritische Zellen (Shortman et al., 2002). Diese DC-Subpopulationen weisen funktionelle Unterschiede hinsichtlich ihres Aktivierungsmodus, ihrer Freisetzung von Zytokinen und ihrer Effektorfunktion auf. Myeloide dendritische Vorläuferzellen stellen die Hauptpopulation humaner dendritischer Zellen im peripheren Blut dar; sie zeigen sich in ihrer Oberflächenexpression mit CD4+, Lin-, CD11c++, CD123(+), CD45Ro+ und CD2+ und exprimieren typische myeloide Marker (CD13 und CD33 sowie die Fc-Rezeptoren CD32, CD64 und FcεRI). Morphologisch ähneln sie den Monozyten und produzieren u.a. hohe Konzentrationen von IL-12 nach Stimulation durch TNF-alpha. Dadurch bewirken sie eine Differenzierung von T- zu TH1-Lymphozyten. Plasmazytoide dendritische Zellen sind BDCA-2+ und weiterhin charakterisiert durch ihre Oberflächenexpression mit CD4+, Lin-, CD11c-, CD123++, CD45RA+, CD2-. PDC exprimieren weder myeloide Marker (wie CD13 oder CD33) noch Fc-Rezeptoren. Nach entsprechender Aktivierung induzieren sie eine Differenzierung von T-Lymphozyten zu Th2-Zellen (Darmochwal-Kolarz et al., 2003). Die Aktivierung der MDC erfolgt im Wesentlichen durch mikrobielle Stimuli wie LPS (Lipopolysaccharide von Bakterien) über den Toll-like Rezeptor 4 (TLR) und resultiert in der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine (z.B. TNF-alpha, IL-1β und IL-6), wohingegen PDC über den intrazellulären TLR-9 aktiviert werden und eine große Menge an INF-alpha ausschütten (Poehlmann et al., 2009).

Unreife DC nehmen Antigene aus der Umgebung auf, fragmentieren, prozessieren und präsentieren diese mithilfe von MHC-Molekülen (Huang et al., 2007). Dadurch (Li et al., 2012) und über eine TLR-vermittelte Stimulation durch z.B. LPS (Vega-Ramos et al., 2012) kommt es zu einem Reifungsprozess: während sich die Kapazität zur Antigen-Aufnahme durch den Verlust der Endo- und Phagozytose-Rezeptoren verringert, verbessert sich gleichzeitig die Fähigkeit zur Antigen-Präsentation über eine Höher-Regulation co-stimulatorischer Moleküle (z.B. CD 80 und CD 86) sowie ihrer HLA-DR-Expression. Die Ausweitung ihrer Dendriten führt zu einer besseren Interaktion mit T-Zellen (Huang et al., 2007). Eine ausreichende Differenzierung ist ausschlaggebend für die Effizienz der Immunantwort dendritischer Zellen (Li et al., 2012). Demzufolge lassen sich auch vom funktionellen Gesichtspunkt

aus zwei Arten dendritischer Zellen unterscheiden: die „unreifen“ Antigen-aufnehmenden und die „reifen“ immun-stimulierenden Zellen. Der Reifungsprozess dendritischer Zellen kann somit als Bindeglied zwischen innatem und erworbenem Immunsystem betrachtet werden (Huang et al., 2007). Es konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass eine inadäquate Stimulation durch DC lediglich zu T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften oder sogar zu anergen oder apoptotischen T-Zellen führt (Huang et al., 2007, Faivre et al., 2012).

Interessanterweise wurde in Sepsis-Tiermodellen beobachtet, dass eine beeinträchtigte Funktion dendritischer Zellen mit einem schlechteren Outcome assoziiert ist und dass bei humaner (adult) Sepsis ein früher Abfall zirkulierender DC mit einer erhöhten Mortalitätsrate einhergeht (Poehlmann et al., 2009, Huang et al., 2007). Weiterhin fand sich, analog zur monozytären HLA-DR-Expression, auch auf dendritischen Zellen eine verminderte HLA-DR-Expression in adulten Patienten mit Sepsis (Poehlmann et al., 2009, Guisset et al., 2007). Neben einer offenbar beeinträchtigten Funktion zeigten sich weiterhin erniedrigte Konzentrationen zirkulierender DC bei Patienten mit Verbrennungen und schwerer Sepsis (Riccardi F, 2011, Poehlmann et al., 2009). Das ursächlich vermutete Phänomen der Sepsis-induzierten Apoptose betraf beide Subpopulationen (MDC und PDC) gleichermaßen. Ein Abfall der DC-Konzentrationen war bei Patienten, die starben und/ oder nosokomiale Infektionen entwickelten, deutlich ausgeprägter zu beobachten im Vergleich zu Überlebenden und Patienten ohne Infektionen (Guisset et al., 2007).

2.3 Das angeborene Immunsystem Neugeborener

2.3.1 Risikofaktoren für die erhöhten Infektionsraten Frühgeborener

Die am häufigsten durch Infektionen betroffenen Neugeborene sind Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht <1500g bzw. einem Gestationsalter < 28 SSW (Gentile et al., 2014). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass das Risiko Frühgeborener, an einer ernsthaften Infektion zu erkranken, somit umgekehrt proportional zu Gestationsalter und Geburtsgewicht ist (Tissières et al. 2012, Pisani et al., 2012, Strunk et al., 2011).

Die erhöhte Prävalenz von Infektionen bei Frühgeborenen hat verschiedene Ursachen (Förster-Waldl et al., 2005, Strunk et al., 2011): Neben Infektionsbegünstigenden spezifischen Organkomplikationen wie z.B. einem ARDS (Acute respiratory distress Syndrome), einem persistierenden Ductus arteriosus Botalli, intrazerebralen Blutungen, nekrotisierender Enterokolitis und bronchopulmonaler Dysplasie benötigen Frühgeborene im Vergleich zu Reifgeborenen eine durchschnittlich längere intensivmedizinische Versorgung. Allein die prolongierte mechanische Ventilation bewirkt bei Neugeborenen auch ohne die Entwicklung von Bakteriämien eine systemische Entzündungsreaktion mit erhöhten Serumkonzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine wie z.B. TNF-alpha, IL-1 β und von IL-8 (Bose et al., 2013). Zusätzlich wird durch mechanische Ventilation, intravenöse und andere Katheter sowie parenterale Ernährung die physiologische Barriere gegen Mikroorganismen gestört und das Eindringen nosokomialer Keime erleichtert, was häufiger zur Kolonisation durch Keime aus dem intensivmedizinischen Milieu führt.

Für eine adäquate Immunabwehr gegen mikrobielle Organismen sind verschiedene Mechanismen des innatens und des erworbenen Immunsystems sowie eine koordinierte Immunantwort entscheidend. Die maternal-fetale Übertragung von Immunglobulinen (IgG) beginnt ab ca. der 32. Schwangerschaftswoche. Während die Serumkonzentrationen von IgG bei Reifgeborenen zum Zeitpunkt der Geburt vergleichbare oder sogar höhere Werte als maternale Serumkonzentrationen erreichen, zeigen die Konzentrationen bei Frühgeborenen eine hohe Abhängigkeit vom Gestationsalter (Bersani et al., 2012). Daneben sind viele Funktionen des erworbenen Immunsystems bei Neu- und insbesondere Frühgeborenen bekanntermaßen noch nicht voll ausgereift (Strunk et al., 2011). Eine andauernde postnatale Reifung des angeborenen Immunsystems wurde in früheren Studien postuliert (Levy, 2007).

2.3.2 Antigen-präsentierende Zellen

Zum Zeitpunkt der Geburt weisen Neugeborene zumeist höhere Leukozytenzahlen auf als gesunde Erwachsene (Caron et al., 2010). Die Funktion von Leukozyten Neugeborener scheint jedoch noch nicht voll ausgereift zu sein; so zeigen beispielsweise neutrophile Granulozyten nur schwache inflammatorische Antworten auf pathogene Stimuli und auch Lymphozyten sowie

dendritische Zellen sind in ihrer Funktion der zellulären Immunabwehr eingeschränkt (Dasari et al., 2011). Im Blut zirkulierende Monozyten treten etwa ab einem Gestationsalter von 18-20 SSW auf und mit zunehmendem Gestationsalter kann ein physiologischer kontinuierlicher Anstieg der Monozyten-Konzentration bis zur Geburt beobachtet werden (Christensen et al., 1982, Kovarik et al., 1998, Adkins et al., 2004, Velilla et al., 2006, Gentile et al., 2014). Zum Zeitpunkt einer termingerechten Geburt liegen die Konzentrationen in der Regel ähnlich hoch (Caron et al., 2010) oder sogar höher als bei Erwachsenen (Belderbos et al., 2009, Pérez et al., 2010). Dementsprechend zeigen Neugeborene mit einem niedrigen Gestationsalter eine verminderte Anzahl von zirkulierenden Monozyten im Vergleich zu Reifgeborenen (Kovarik et al., 1998, Adkins et al., 2004, Velilla et al., 2006, Gladstone et al., 1990, Hallwirth et al., 2004).

Die Kompetenz von Monozyten, Antigene zu erkennen, aufzunehmen, zu prozessieren und dem erworbenen Immunsystem zu präsentieren, reift mit zunehmendem Gestationsalter (Holloway et al., 2009). Doch auch nach der Geburt haben diese Antigen-präsentierenden Zellen noch nicht ihre volle Funktionsfähigkeit erreicht. Eine Unreife in der Differenzierung zu Makrophagen und die verminderte Sekretion von Zytokinen bewirkt, dass Monozyten Neugeborener Zellen des spezifischen Immunsystems noch nicht in ausreichend effektivem Umfang aktivieren können (Strunk et al., 2011).

Interessanterweise zeigte sich dagegen die monozytäre Phagozytosekapazität Neugeborener größtenteils vergleichbar zu der monozytären Phagozytose-Kompetenz Erwachsener (Dasari et al., 2011). Eine Ausnahme stellt dabei die Phagozytosekapazität für gramnegative Bakterien wie z.B. E.coli dar (Velilla et al., 2006).

2.4 Immunschwäche und Immunparalyse

Für Erwachsene existieren zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten über Fehlfunktionen des innate Immunsystems während schwerer Infektionen und Sepsis. Neben veränderten Mechanismen von Zytokinsynthese und zellulärer Apoptose konnte in vorherigen Studien eine verringerte Expression von Klasse-II-MHC-Molekülen auf Antigen-präsentierenden gezeigt werden (Schefold et al.,

2008, Hotchkiss et al., 2013). Für Neu- und insbesondere Frühgeborene gibt es diesbezüglich kaum Daten. Monozyten gesunder Erwachsener zeigen im Durchschnitt eine Oberflächenexpression von >15000 HLA-DR-Molekülen pro Zelle (mAb/cell). Eine Immunschwäche ist bei adulten Patienten definiert als eine über einen längeren Zeitraum persistierende Verminderung der monozytären HLA-DR-Expression auf <60%. Bezogen auf die Antigen-Dichte gilt eine monozytäre HLA-DR-Expression von 10000 – 15000 mAb/cell als Immundepression; die Verminderung der HLA-DR-Expression auf über 5000 und unter 10 000 mAb/cell geht mit einer beginnenden Immunparalyse einher. Eine manifeste Immunparalyse besteht ab einer HLA-DR-Expression von <5000 mAb/cell bzw. einer Reduktion auf <30% (Döcke et al., 2005).

Eine erniedrigte monozytäre HLA-DR-Expression bis hin zur Immunparalyse wird oft auf Intensivstationen beobachtet. Für Frühgeborene sind Immunschwäche und Immunparalyse in der frühen Postnatalperiode bisher kaum untersucht. Frühere publizierte Studien beschreiben eine verminderte HLA-DR-Expression auf klassischen Monozyten bei Neugeborenen mit einem niedrigen Gestationsalter doch insbesondere die Funktion der anderen ebenfalls stark HLA-DR-exprimierenden Subpopulationen von Monozyten und dendritischen Zellen Neu- und Frühgeborener ist bisher nicht ausreichend geklärt (Sohlberg et al., 2011).

2.5 Spezifische Zielsetzungen der Arbeit

Die erhöhte Anfälligkeit Reif- und insbesondere Frühgeborener gegenüber Infektionen ist trotz intensiver Bemühungen zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht umfassend geklärt. Noch immer stellt die neonatale Sepsis in Industrieländern die führende Todesursache bei Kindern dar (Gentile et al., 2014). Bisherige Ansätze, die Immundefizienz Frühgeborener durch verschiedene immunmodulatorische Therapien wie z.B. Austausch- oder Granulozytentransfusionen, eine Verabreichung von GM-CSF, Probiotika, Lactoferrin oder intravenöser Immunglobuline auszugleichen, haben nach aktuellem Forschungsstand zu keiner signifikanten Senkung der Morbidität und Mortalität Neugeborener geführt (Bersani et al., 2012). Neben organspezifischen Risikofaktoren scheint auch die unreife Immunkompetenz Frühgeborener das

vermehrte Auftreten von Infektionen in dieser Subpopulation zu begünstigen. Aktuelle Studien konnten zeigen, dass Frühgeborene, die innerhalb der ersten Lebenstage eine Sepsis entwickeln (Early-onset Sepsis), bereits am Tag der Geburt eine signifikante Reduktion der monozytären Expression von Klasse-II-MHC-Molekülen im Vergleich zu Frühgeborenen ohne Infektionszeichen in den ersten Lebenstagen aufweisen (Genel et al, 2010, Azizia et al., 2012). Bei Frühgeborenen mit einer Infektion kam es weiterhin zu keiner adäquaten regulatorischen Erhöhung der HLA-DR-Expression (Strunk et al., 2011). Antigen-präsentierende Zellen spielen eine entscheidende Rolle in der frühen Immunantwort. Über MHC-Klasse-II-Moleküle präsentieren sie fragmentierte Antigene und bewirken so eine Aktivierung spezifischer Immunzellen. Neben B-Lymphozyten und Makrophagen sind Monozyten und dendritische Zellen wichtige Antigen-präsentierende Zellen. Die Konzentration von Klasse-II-MHC-Molekülen auf APCs korreliert mit deren Effektivität, Antigene zu präsentieren (Hunt et al., 1994) und wie bereits erwähnt, fand sich eine verminderte HLA-DR-Expression bei Frühgeborenen mit Infektionen in den ersten Lebenstagen. Die Bestimmung der monozytären Expression von HLA-DR könnte somit als prognostischer Marker für eine pränatale Disposition zu Infektionen und anderen Komplikationen dienen (Azizia et al.2012).

Das zentrale Ziel der vorliegenden prospektiven monozentrischen Beobachtungsstudie war es, immunologische Marker zu definieren, die eine frühzeitige und zuverlässige Aussage über die Immunkompetenz Früh- und Reifgeborener in den ersten Lebenswochen ermöglicht. Es wurde eine vergleichende Analyse zur Aussagekraft der HLA-DR-Expression auf Monozyten und dendritischen Zellen in Bezug auf die angeborene Immunkompetenz von Frühgeborenen mit einem Gestationsalter <33.0 Schwangerschaftswochen und Reifgeborenen ab der 72. Lebensstunde im Vergleich zu gesunden Erwachsenen durchgeführt.

Frühere Untersuchungen liefern Informationen über die Expression von Klasse-II-MHC Molekülen Frühgeborener innerhalb der ersten 7 Lebenstage (Azizia et al. 2012). Unser Ziel war die quantitative Untersuchung der HLA-DR-Expression von Monozyten und dendritischen Zellen Frühgeborener ab der 72. Lebensstunde bis zum 28. Lebenstag als ein Marker für die innate Immunkompetenz dieser

Einleitung

Hochrisiko-Subpopulation in der frühen Postnatalperiode. In dem Bestreben, die Pathophysiologie des Immunsystems Reif- und Frühgeborener besser zu verstehen, wollten wir den Phänotyp der verschiedenen Subpopulationen von Monozyten und dendritischen Zellen charakterisieren. Unsere Ausgangshypothese war, dass Frühgeborene im Vergleich zu Reifgeborenen eine verminderte HLA-DR-Expression auf Monozyten und dendritischen Zellen in den ersten Lebenstagen und -wochen aufweisen. Dabei sollte der Verlauf der HLA-DR-Expression auf klassischen CD-14 positiven Monozyten mit dem anderer Antigen-präsentierender Zellen (pDC, mDC und CD16-positive Monozyten) verglichen werden. Weiterhin vermuteten wir einen Anstieg der HLA-DR-Expression auf Monozyten und dendritischen Zellen bei Frühgeborenen innerhalb der ersten 4 Lebenswochen. Durch den Vergleich mit einer Kontrollgruppe gesunder Erwachsener sollte weiterhin eine Aussage über den Immunstatus Reifgeborener ermöglicht werden. Unter der Fragestellung, inwiefern eine Veränderung der HLA-DR-Expression von Monozyten und dendritischen Zellen Frühgeborener mit Komplikationen im klinischen Verlauf assoziiert ist, erfolgte die simultane Aufzeichnung klinischer Parameter während des gesamten Untersuchungszeitraums.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Verwendete Stoffe

Lösungen und Puffer

Name		Hersteller
FACS-Lyse	FACS lysing solution, verdünnt 1:10 mit Aqua, dest.	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Puffer	Falk-Lösung, - 0,1% Na-Acid - 2% FCS, endotoxinfrei	Charité Apotheke Serva, Heidelberg Biochrom, Berlin
Aqua dest.	Ampuwa für Spülung	Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H
FACS Flow		Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Clean		Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Rinse		Becton Dickinson, Heidelberg

Färbungen am Durchflusszytometer

Antikörper	Farbstoff	Hersteller
CD14	Peridin Chlorophyll Protein- Cy5.5 (PerCP-Cy5.5)	Becton Dickinson, Heidelberg
CD16	Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)	Becton Dickinson, Heidelberg
CD33	Allophycocyanin (APC)	Becton Dickinson, Heidelberg
BDCA2	Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Quantibrite anti-HLA-DR/anti- monocyte		Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-Mouse Igk	Compensation Beads	Becton Dickinson, Heidelberg
Negative control (FBS)	Compensation Beads	Becton Dickinson, Heidelberg

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Reaktionsgefäße 0.5, 1.5, 2ml, Safe seal	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 10, 200, 1000µl	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon Röhrchen 50ml	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Röhrchen 5ml	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrovette 200µl, Kalium-EDTA	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrovette 1,3ml, Lithium Heparin	Sarstedt, Nümbrecht
Monovette 2.7ml, Kalium EDTA	Sarstedt, Nümbrecht
Monovette 2.7ml, Lithium Heparin	Sarstedt, Nümbrecht

3.1.3 Geräte

Name	Hersteller
Pipetten 10, 50, 200, 1000µl	Eppendorf, Hamburg
Plattenzentrifuge Centrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg
Tube Zentrifuge NeoLab 16/18	NeoLab, Berlin
Megafuge, Heraeus 40	Thermo Scientific, USA
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Absaugpumpe Laboport	Neuberger, Freiburg
Rüttler Vortex Genie2	Scientific Industries, USA

3.1.4 Software

Name	Hersteller
CellQuest	Becton Dickinson, Heidelberg
QuantiBrite	Becton Dickinson, Heidelberg
QuantiCalc	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Diva	Becton Dickinson, Heidelberg
SPSS 11.5	SPSS
FlowJo 8.6.3	Tree Star, Ashland, USA
MS Office 2010	Microsoft
Mendeley Ltd. 7.1	United Kingdom, London

3.2 Methodik

3.2.1 Studiendesign

In einem Universitätsklinikum wurden insgesamt n=43 konsekutive Neugeborene in eine monozentrische prospektive Beobachtungsstudie eingeschlossen. Im Zeitraum von Dezember 2005 bis Juli 2007 konnten darunter n=28 Frühgeborene (definiert mit einem Gestationsalter <33.0 Schwangerschaftswochen, „Frühgeborenen-Gruppe“) und n = 15 Reifgeborene (definiert mit einem Gestationsalter >36.0 Schwangerschaftswochen, „Reifgeborenen-Gruppe“) rekrutiert werden. Zu Vergleichszwecken wurden im Juli 2007 einmalig n=10 freiwillige gesunde erwachsene Probanden untersucht („Vergleichsgruppe“).

Die Rekrutierung der Neugeborenen und die Blutentnahmen erfolgten in der Klinik für Neonatologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte, in Berlin Deutschland. Probenbearbeitung und Datenanalyse wurden am Institut für Medizinische Immunologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte, in Berlin Deutschland vorgenommen.

Folgende Ein- und Ausschlusskriterien wurden vereinbart:

Einschlusskriterien:

- Alle Frühgeborenen <33.0 Schwangerschaftswochen
(„Frühgeborenen-Gruppe“)
- Alle Reifgeborenen >36.0 Schwangerschaftswochen
(„Reifgeborenen-Gruppe“)
- Immunkompetente Erwachsene („Vergleichsgruppe“)
- Studieneinschluss der Reif- und Frühgeborenen ab der 72. Lebensstunde
- Monitoring der Frühgeborenen bis zum 28.Lebenstag

Ausschlusskriterien:

- Early – onset Sepsis
- Antibiotische Therapie über 72 Stunden postnatal
- Angeborene, lebensbedrohliche und/oder operationsbedürftige Fehlbildungen
- Spezifische konnatale bakterielle oder virale Infektionen (Cytomegalie, positiver HIV-Status, Tuberkulose, Röteln, Toxoplasmose, Parvovirus B19)

- Fehlendes Einverständnis der Eltern/Sorgeberechtigten

Die Studie wurde in strikter Befolgung der „Deklaration von Helsinki“ und im Einverständnis der medizinischen Ethik-Kommission der Charité durchgeführt.

3.2.2 Untersuchungsablauf

3.2.2.1 Zeitlicher Ablauf

Für alle Frühgeborenen <33.0 Schwangerschaftswochen und alle Reifgeborenen <36.0 Schwangerschaftswochen erfolgten Aufklärung und die Einholung der schriftlichen Einverständniserklärung der Eltern ab der Geburt sowie die Erhebung demographischer und klinischer Daten (s.u.). Für Frühgeborene erfolgte ein kontinuierliches Monitoring sowie die Dokumentation des klinischen Verlaufs bis zum 28. Lebenstag nach folgendem Schema:

Abkürzung	Untersuchungszeitpunkt
T₁	72. - 96. Lebensstunde
T₂	96. - 120. Lebensstunde
T₃	11. ± 3 Lebenstag
T₄	18. ± 3 Lebenstag
T₅	25. ± 3 Lebenstag

Tabelle 1: Abnahme- und Untersuchungszeitpunkte für Frühgeborene im gesamten Beobachtungszeitraum.

Der Abnahme- und Untersuchungszeitpunkt für Reifgeborene wurde einmalig - analog zu Frühgeborenen an T1- zwischen der 72. und 96. Lebensstunde (= 4. Lebenstag) definiert. Die Untersuchung der gesunden Erwachsenen (Kontrollgruppe) fand einmalig nach Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung statt.

Die Blutentnahmen der Neugeborenen erfolgten im Rahmen diagnostischer Blutentnahmen zur weiteren Bearbeitung.

3.2.2.2 Demographische Daten, klinische Parameter, Monitoring

Demographische Daten

Erhoben wurden für Früh- und Reifgeborene: Geschlecht, ethnische Herkunft, Gestationsalter in Wochen plus Tage, Zwillings- und Mehrlingsgeburten, Art der Entbindung (beispielsweise Sectio).

Klinische Parameter

Einmalig nach Geburt wurden für Früh- und Reifgeborene dokumentiert: morphologisches Alter in Wochen, Gewicht in Gramm, Apgar-Score nach einer, fünf und zehn Minuten post partum (siehe Tabelle 2), CRIB-Score bei Geburt („clinical risk score for babies“).

Über den Beobachtungszeitraum dokumentiert wurden: minimale, maximale und mittlere FiO₂ bei mechanischer Ventilation in den ersten 12 Lebenstagen, prophylaktische Antibiotikagabe in den ersten 3 Lebenstagen, Antibiotikagabe über den 3. Lebenstag hinaus.

Kontinuierliches Monitoring von Tagen unter: metabolischer Azidose, einer Rekapilarisierungszeit von >2 sec, liegendem ZVK, arterieller Blutdruckmessung, Magensonde, Blasenverweilkatheter, mechanischer Ventilation, pathologischen Abweichungen des Hautkolorits, Tachypnoe - und Tachykardie-Episoden, Hyperthermie und Hypothermie, Hypertonie und Hypotonie, Apnoe-Episoden.

Laborchemische Parameter

Wenn verfügbar dokumentierten wir am Tag der Geburt: Nabelschnur-pH, maximaler BE bis zur 12. Lebensstunde.

An allen Untersuchungszeitpunkten (T1-T5): Hämatokrit, Hämoglobin-Konzentration, Gesamt-Bilirubin, IL-6, C-reaktives Protein, die Gesamtzahl von Thrombozyten, Leukozyten und Monozyten, die IT-Ratio (= the immature-to-total neutrophil ratio), Fibrinogen und Antithrombin III.

3.2.2.3 Definitionen, Begrifflichkeiten

- Apgar-Score: Punkteschema zur standardisierten Ermittlung des klinischen Zustandes des Neugeborenen und seiner unmittelbaren postnatalen Anpassung an das Leben außerhalb der Gebärmutter in den ersten 10 Lebensminuten.

Klinisches Kriterium	0 Punkte	1 Punkt	2 Punkte
Herzfrequenz	Kein Herzschlag	<100 b/min	>100b/min
Ventilation	Keine Spontanatmung	Unregelmäßig, flach	Regelmäßig, Kind schreit
Reflexe	keine	Grimassieren	Kräftiges Schreien
Muskeltonus	schlaff	Flexion der Extremitäten	Spontane Bewegungen aller Extremitäten
Hautkolorit	Blass, livide	Stamm rosig, Extremitäten zyanotisch	Gesamtes Kind rosig

Tabelle 2: Apgar-Score für Neugeborene. Die optimale Punktezahl liegt bei 9-10 Punkten.

- CRIB-Score (Clinical risk index for babies): Maß zur Ermittlung des initialen Mortalitätsrisikos eines Neugeborenen <1500g Geburtsgewicht. In die Beurteilung fließen ein: Geburtsgewicht, Gestationsalter, kongenitale Fehlbildungen, maximaler Basenüberschuss in den ersten 12 Lebensstunden, minimal erforderliche FiO₂ in den ersten 12 Lebensstunden, maximal erforderliche FiO₂ in den ersten 12 Lebensstunden.
- Klinische Parameter: Die folgenden klinischen Definitionen wurden auf dem Boden der durch das Robert-Koch-Institut 2009 im Rahmen des Krankenhaus-Infektions-Surveillance-Systems (KISS) veröffentlichten Definition der nosokomialen Sepsis (Neo-KISS 2009, Haque et al., 2005) festgelegt:
 - Apnoe(en): Atemstillstand > 20 Sekunden
 - Hautkolorit: unterschieden wurden rosig, blass, grau/septisch.
Als pathologisch wurden alle Abweichungen von rosig gewertet.
 - Hyperthermie: Körperkerntemperatur > 38° C
 - Hypothermie: Körperkerntemperatur < 36,5° C
 - Hypotonie: Mittlerer arterieller Blutdruck < Schwangerschaftsalter
 - Metabolische Azidose: BE < - 10mval
 - Rekapillarierungszeit (RKZ): als pathologisch wurde eine RKZ von > 2 Sekunden angesehen
 - Tachykardie - Episoden: Herzfrequenz > 200 /min
 - Tachypnoe - Episoden: Atemfrequenz > 60 /min

3.2.3 Grundlagen der FACS-Analyse

Die fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie (FACS: fluorescence activated cell sorting) ist ein Messverfahren, bei dem Zellen nach ihrer Emission von optischen Signalen sortiert, analysiert und quantifiziert werden können. Hierbei können sowohl morphologische (beispielsweise die Zellgröße) oder molekulare (wie z.B. Rezeptoren) Gesichtspunkte untersucht werden. Die zu analysierenden Zellen werden im FACSCalibur in einer Trägerflüssigkeit einzeln an einem monochromatischen Laserstrahl vorbeigeleitet und anhand ihrer optischen Eigenschaften durch unterschiedliche Fotodetektoren erfasst und digitalisiert. Dieses Verfahren wird mit dem Einsatz spezifischer Fluoreszenzmarker (mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte organische Moleküle oder Antikörper gegen spezifische Oberflächenantigene wie z.B. Proteine der CD-Klassifikation) kombiniert. Als Fluoreszenzmarker werden beispielsweise FITC (=Fluoreszeinisothiocyanath), PE (=Phycoerythrin), PerCP (=Peridinin-Chlorophyll-Komplex) und APC (=Allophycocyanin) verwendet. Die Unterscheidung der verschiedenen so markierten Zellen erfolgt über die unterschiedlichen Emissionsmaxima der Konjugate. Gemessen werden dabei das Vorwärtsstreulicht (FSC = forward scatter, proportional zur Zellgröße) sowie das Seitwärtsstreulicht der Zelle (SSC = side scatter, Maß für die interne Zellgranularität) in zwei dafür vorgesehenen Streulichtkanälen. Anhand ihrer charakteristischen Größe und Granularität können so die unterschiedlichen Leukozyten-Populationen (Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten) getrennt voneinander in einem Diagramm (Scatterplot) dargestellt werden.

Zur Auswertung der Emissionsspektren hat das FACSCalibur drei Fluoreszenzkanäle (FL 1-3). Durch eine gewisse Überlappung von Emissionsspektren parallel eingesetzter Fluoreszenzfarbstoffe und damit auch messbaren Impulsen im angrenzenden Kanal kommt es bei Mehrfarbenmessungen zu Ungenauigkeiten. Die sogenannte Kompensation ist die rechnerische Subtraktion der überlappenden Spektralemissionen und damit die Korrektur dieses Phänomens. Die gemessene Fluoreszenzintensität ist proportional zur Anzahl an Fluoreszenzmolekülen pro Zelle.

3.2.4 Analyse der Blutproben: Quantifizierung der monozytären HLA-DR Expression, Analyse der DC-Subpopulationen

Die Bearbeitung der Blutproben erfolgte innerhalb von 4 Stunden; bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei 4°C unter Lichtschutz gekühlt.

Die Analyse erfolgte für folgende Zellpopulationen:

	Subsets	Oberflächenmarker
Monozyten	„klassische“	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻
	Übergangsmoноzyten“	CD14 ⁺ CD16 ⁺
	„pro-inflammatorische“	CD14 ⁽⁺⁾ CD16 ⁺⁺
Dendritische Zellen	myeloide	CD33 ⁺ CD14 ⁻ HLA-DR ⁺
	plasmazytoide	BDCA2 ⁺ HLA-DR ⁺

Tabelle 3: Analytierte Zellpopulation und ihre spezifischen Oberflächenmarker.

Durchführung: Die angewendeten Antikörper richten sich gegen die Zelloberflächenmoleküle CD (Cluster of Differentiation) sowie gegen HLA-DR (Klasse-II-MHC Molekül auf Antigen-präsentierenden Zellen) und BDCA2. Zusammengefasst wurden insgesamt 150µl Blut mit konjugierten Antikörpern angefärbt:

Ansatz 1

Antikörper	Menge in µl
FITC anti-human CD16	2,5
BD Quantibrite anti-HLA-DR/anti-monocyte	20
Facs-Puffer	2,5

Tabelle 4: Ansatz zur Färbung der Monozyten-Subsets für 50µl EDTA-Vollblut

Ansatz 2

Antikörper	Menge in µl
FITC anti-human BDCA2	10
CD33APC	5
Quantibrite anti-HLA-DR/anti-monocyte	10
PerCP anti-human CD14	10
Facs-Puffer	5

Tabelle 5: Ansatz zur Färbung von MDC und PDC für 100µl EDTA-Vollblut

Die Aufarbeitung der Proben erfolgte nach standardisiertem Protokoll von Becton Dickinson in Kooperation mit dem Institut für Medizinische Immunologie der Charité, Berlin Deutschland (Döcke et al., 2005):

Die oben genannten Blutvolumina wurden zusammen mit den AK-Ansätzen in jeweils ein FACS-Tube vorgelegt, anschließend erfolgte eine Durchmischung im Vortexmischer. Der Monozyten-Ansatz wurde für 30 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur, der Ansatz zur Färbung dendritischer Zellen 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein erneutes Durchmischen und das Hinzugeben von 0,5ml „FACS Lysing Solution“ (Lösung, die ein mildes hypotonisches Umgebungsmilieu schafft; hierunter werden Erythrozyten lysiert, während Leukozyten erhalten bleiben). Nach einer erneuten Inkubationszeit von 15 Minuten erfolgte eine Ultrazentrifugation mit 300xg bei Raumtemperatur über 5 Minuten. Der entstandene Überstand wurde für beide Ansätze dekantiert. Nach erneutem Durchmischen im Vortexmischer wurde das Zellpellet in 1ml FACS-Puffer aufgenommen und erneut 5 Minuten mit 300xg bei Raumtemperatur gewaschen (Lyse-Wasch-Methode nach Becton Dickinson). Nach Absaugen des Überstandes erfolgten Durchmischung und die Resuspension mit 50µl FACS-Puffer.

Die Messung der Proben erfolgte im Routine-Labor des Instituts für Medizinische Immunologie am FACSCalibur-Durchflusszytometer entweder sofort oder innerhalb der nächsten 24 Stunden.

Für die Quantifizierung der monozytären HLA-DR-Expression eignen sich zwei verschiedene Analysemethoden: zum einen die Ermittlung der Frequenz HLA-DR-positiver Monozyten (Normwerte 80-100%) sowie zum anderen die in der Studie angewandte Messung der Antigendichte pro Monozyt mittels der sogenannten QuantiBrite-Methode (Normwerte für Erwachsene >20 000/Monozyt): Mittels Quantibrite-PE-Beads und der Anfärbung von HLA-DR auf Monozyten mit einem im Verhältnis von 1:1 mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiertem anti-HLA-DR-Antikörper erfolgte das Anlegen einer Eichkurve. Durch den Vergleich der spezifischen Fluoreszenzintensitäten konnte so die Anzahl der HLA-DR-Moleküle pro Monozyt ermittelt werden. Die Frequenz der Monozyten wurde durch die Verwendung eines mit PerCP-Cy5.5 konjugierten Antikörper gegen CD14 bestimmt. Bis zur Messung wurden die Ansätze bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

3.2.5 Darstellung und statistische Auswertung

Die Identifizierung der unterschiedlichen Zellpopulationen erfolgte nach folgender Strategie: Die unterschiedlichen Emissionen und die Intensität des gemessenen Lichtes der Antikörper-Antigen-Komplexe wurden in Form von Streudiagrammen (Dot-Plots) und Histogrammen wiedergegeben. Anhand mitgeführter Positiv- und Negativkontrollen wurden Schwellenwerte für die Detektion sowie Vorwärts- und Seitwärtsstreuung eingestellt und das zu analysierende Fluoreszenzniveau adjustiert, sodass sich die interessierende Zellpopulation bestmöglich von anderen Zellpopulationen unterschied (der FSC Schwellenwert z.B. ist optimal, wenn der Debris (= Zellabfall) weitgehend von der Datenaufnahme ausgeschlossen ist). In der Dot-Plot Darstellung ist jede Zelle durch einen Punkt repräsentiert. Durch die individuelle Definition eines Analysefensters, das sogenannte „Gating“, können selektiv bestimmte Zellpopulationen betrachtet werden (siehe Abbildung 1). Mithilfe eines Histogramms wird die Häufigkeitsverteilung der Signale in den einzelnen Fluoreszenzkanälen dargestellt (siehe Abbildung 2).

Erfasst wurden die „Gated Events“, d.h. die Anzahl der Zellen für jede gewählte Subpopulation. Die Darstellung der HLA-DR-Expression von Monozyten und dendritischen Zellen erfolgte mithilfe der QuantiCalc-Software; hier wurde die Anzahl der gebundenen HLA-DR-Antikörper pro Zelle als geometrischer Mittelwert sowie die MFI (mittlere Fluoreszenzintensität) als Maß für die Menge des gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes pro Partikel angegeben. Durch die simultane Messung der QuantiBrite-PE-Beads ließ sich dann die absolute Anzahl der gebundenen Antikörper pro Zelle und analog die HLA-DR-Expression pro Zelle berechnen.

PDC wurden als BDCA2+ CD33- HLA-DR+ CD14- und MDC als BDCA2- CD33++ CD14- HLA-DR+ gated. Die absoluten Frequenzen der APC-Populationen wurden kalkuliert, indem die Leukozytenanzahl mit der Ratio der APC-Populationen an allen Leukozyten multipliziert wurde.

Abbildung 1

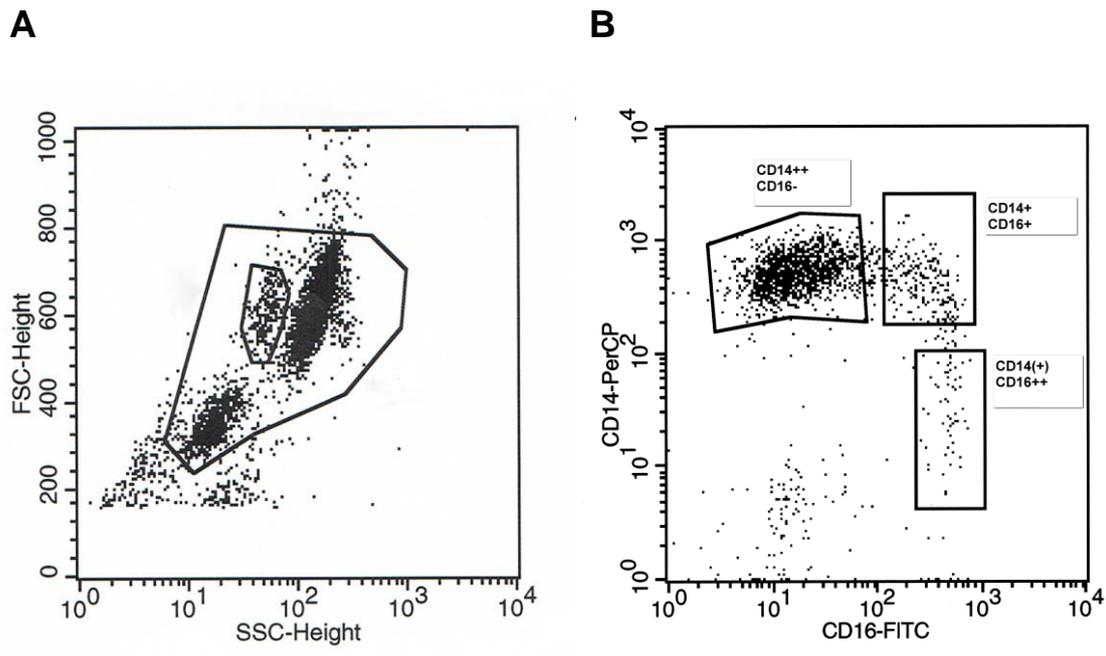
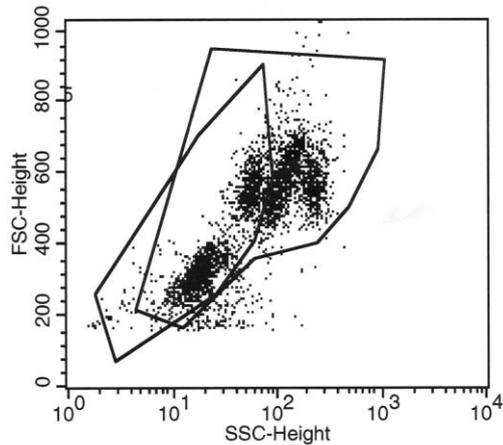


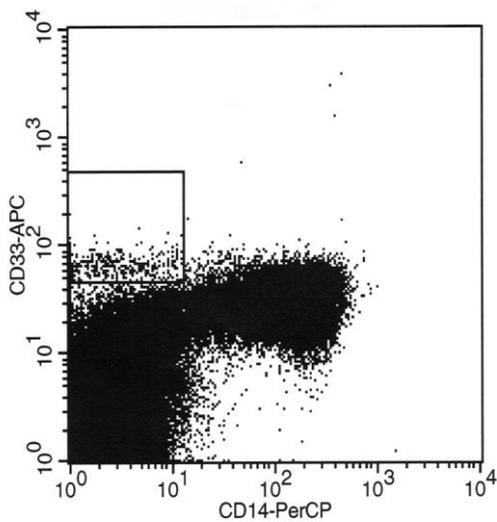
Abbildung 1 A, B: Exemplarische Darstellung durchflusszytometrischer Gating-Strategien von Monozyten. Die Abszissen (logarithmische Skalierung) der Punktauftragungen (Dot Plots) zeigen das Seitwärtsstreulicht als Ausdruck der Granularität (A) bzw. die CD16-Expressionsstärke. Auf der Ordinate in A (lineare Skalierung) ist das Vorwärtsstreulicht als Maß für die Zellgröße, auf der Ordinate in B (logarithmische Skalierung) die CD14-Expressionsstärke dargestellt. Durch die Verwendung eines Dot Plots (Punktauftragung) von FSC (forward scatter) und SSC (side scatter) kann die Population der Monozyten aus den Leukozyten näher eingegrenzt werden (A). Gemäß ihrer unterschiedlichen Expressionen der Oberflächenmarker CD14 und CD16 können drei verschiedene Monozyten-Subpopulationen detektiert werden: CD14⁺⁺CD16⁻ („klassische Monozyten“), CD14⁺CD16⁺ (Übergangsmozyten“) und CD14⁽⁺⁾CD16⁺⁺ („pro-inflammatorische Monozyten“) (B). In den rechteckigen Feldern sind die korrespondierenden Entitäten aufgeführt.

Abbildung 2

A



B



C

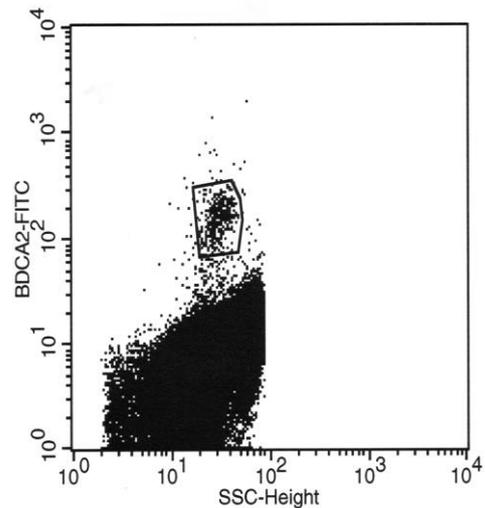


Abbildung 2 A-C: Exemplarische Darstellung durchflusszytometrischer Gating-Strategien für MDC und PDC. In A zeigt die Abszisse (logarithmische Skalierung) des Dot Plots das Seitwärtsstreulicht, die Ordinate (lineare Skalierung) das Vorwärtsstreulicht. In B zeigt die Abszisse die CD14-Expressionsstärke und die Ordinate (logarithmische Skalierung) die CD33-Expressionsstärke. In C sind auf der Abszisse (logarithmische Skalierung) das Seitwärtsstreulicht und auf der Ordinate (logarithmische Skalierung) die BDCA2-Expressionsstärke aufgetragen. Durch die Verwendung eines Dot Plots von FSC (forward scatter) und SSC (side scatter) kann die Population der dendritischen Zellen aus den Leukozyten näher eingegrenzt werden (A). Myeloide dendritische Zellen (MDC) werden definiert als CD14-CD33++ (B). Plasmazytoide dendritische Zellen (PDC) werden durch die Verwendung eines BDCA-2/SSC Dot Plots identifiziert als HLA-DR+BDCA-2++ (C).

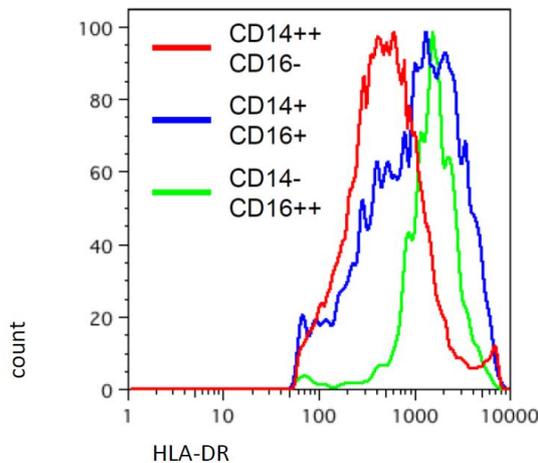
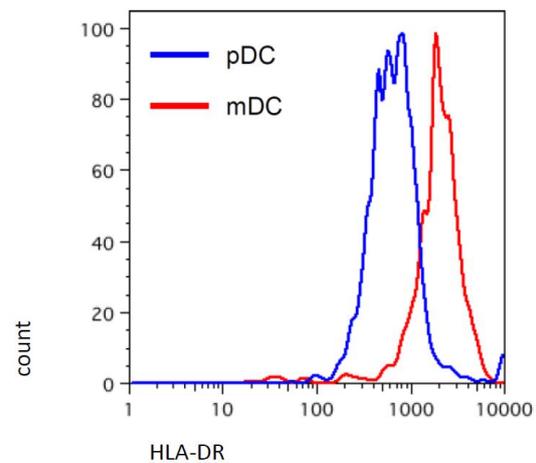
Abbildung 3**A****B**

Abbildung 3 A-B: HLA-DR-Expression auf Monozyten (A) und auf dendritischen Zellen (B). Die Abszissen (logarithmische Skalierung) der Histogramme zeigen die HLA-DR-Expressionsstärke, die Ordinaten (lineare Skalierung) geben die Anzahl der erfassten Ereignisse an.

3.2.5.1 Statistik

Die Aufstellung der Daten erfolgte in Excel. Für die statistische Aufarbeitung wurde SPSS Version 11.5 verwendet. Mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test wurden die vorhandenen Daten auf Normalverteilung geprüft. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben, falls nicht anders ausgewiesen. $p < 0.05$ wurde als signifikant angesehen. Bei der Interpretation der Ergebnisse wurde zur Prüfung von Mittelwerten auf signifikante Unterschiede der Zweistichproben-t-Test für unverbundene Stichproben oder der exakte Test nach Fisher verwendet. Diagramm-Darstellungen in dieser Arbeit zeigen – sofern nicht anders angegeben – für eine Datenreihe jeweils den Mittelwert mit Standardabweichungen.

4. Ergebnisse

4.1 Studienpopulation und Follow up

Details der Studienpopulation können Tabelle 6 und Tabelle 7 entnommen werden.

Im o.g. Zeitraum wurden insgesamt $n = 43$ Patienten in die Studie einbezogen. In der Verteilung von Geschlecht, Ethnizität und venösem Nabelschnur-pH-Wert ergaben sich keine Differenzen zwischen der Frühgeborenen- und der Reifgeborenenengruppe. Erwartungsgemäß fanden sich dagegen signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen in Gestationsalter und morphologischem Alter bei Geburt sowie beim Geburtsgewicht (alle Merkmale $p < 0.0001$ für alle Vergleiche). Als Geburtsmechanismus zeigte sich eine signifikant höhere Rate an Schnittentbindungen (*Sectiones caesareae*) in der Frühgeborenenengruppe. Weiterhin fand sich eine größere Anzahl an Zwillings-/ Mehrlingsgeburten in der Gruppe der Frühgeborenen. Statistisch signifikante Unterschiede waren bei den Apgar-Scores zu beobachten. Zu allen Zeitpunkten (Apgar nach 1min, 5min und 10min postnatal) fanden sich niedrigere Apgar-Werte in der Gruppe der Frühgeborenen (für 1min $p = 0.01$, für 5min $p = 0.001$, für 10min $p = 0.002$), siehe Abbildung 4.

Es erfolgte eine Dokumentation der Inzidenzen von Late-onset Sepsis und ARDS (Acute respiratory distress syndrom); in der vorliegenden Arbeit synonym zu ANS (akutes Atemnotsyndrom) verwendet. In der Frühgeborenenengruppe fanden sich $n = 2$ Patienten, die eine Sepsis und insgesamt $n = 7$ Patienten, die im Beobachtungszeitraum ein ANS entwickelten. Im Durchschnitt erhielten Patienten in der Gruppe der Frühgeborenen für 8.0 ± 9.4 Tage eine mechanische Ventilation und eine antibiotische Therapie für 1.9 ± 4.5 Tage (Tabelle 7). Alle Patienten überlebten.

Ergebnisse

	Frühgeborene	Reifgeborene	p-Wert zwischen beiden Gruppen
Gestationsalter (in Tagen)	218.4±11.5	268.9±10.7	p<0.0001
Geschlecht (männlich)	11 (39%)	9 (60%)	p=0.22*
Morphologisches Alter - in Wochen - in Tagen	31.6±1.6 221.2±10.9	38.1±1.4 266.9±9.9	p<0.0001 p<0.0001
Körpergewicht (in g)	1448±336	3346±430	p<0.0001
Ethnizität kaukasisch ja	23 (82%)	15 (100%)	p=0.14*
Entbindungsmodus Sectio caesaria	21 (75%)	5 (33%)	p=0.01*
Zwillings-/Mehrlingsgeburten	13 (46%)	1(6%)	p=0.01*

Tabelle 6: Demographische Daten. Angegeben werden Mittelwerte ± Standardabweichung. Durchgeführt wurden der Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben und der exakte Test nach Fisher (*). p<0.05 wird als statistisch signifikant angesehen.

	Frühgeborene	Reifgeborene	p-Wert zwischen beiden Gruppen
Nabelschnur pH-Wert	7.3±0.1	7.3±1	p=0.30
Entwicklung einer Sepsis/ eines septischen Schocks im Beobachtungszeitraum	2 (7%)	0 (0%)	p=0.54*
Entwicklung eines ANS im Beobachtungszeitraum	7 (25%)	0 (0%)	p=0.08*
Apgar-Wert 1min postpartum 5min postpartum 10min postpartum	6.9±2.1 7.9±1.4 8.7±0.7	8.6±1.5 9.2±0.8 9.5±0.7	p=0.01 p=0.001 p=0.002
CRIB Score Gesamtwert für Gewicht für Gestationsalter für Dysplasien für Base-Excess	1.0±1.1 0.6±0.8 0.0±0.0 0.1±0.3 0.2±0.7	- - - - -	- - - - -
Tage unter/mit mechanischer Ventilation Vasopressoren Antibiose Zentralvenenkatheter Apnoe-Episoden Hyperthermie (>38°C) Blasenverweilkatheter Magensonde Transfusion von EK(in ml)	8.0±9.4 0.04±0.2 2.8±4.7 1.9±4.5 3.1±4.4 0.7±1.2 0.4±2.1 25.8±3.6 117.8±325.0	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -

Tabelle 7: Klinische Daten und klinischer Verlauf. Angegeben werden Mittelwerte ± Standardabweichung. Durchgeführt wurden der Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben und der exakte Test nach Fisher (*). p<0.05 wird als statistisch signifikant angesehen.

Abbildung 4

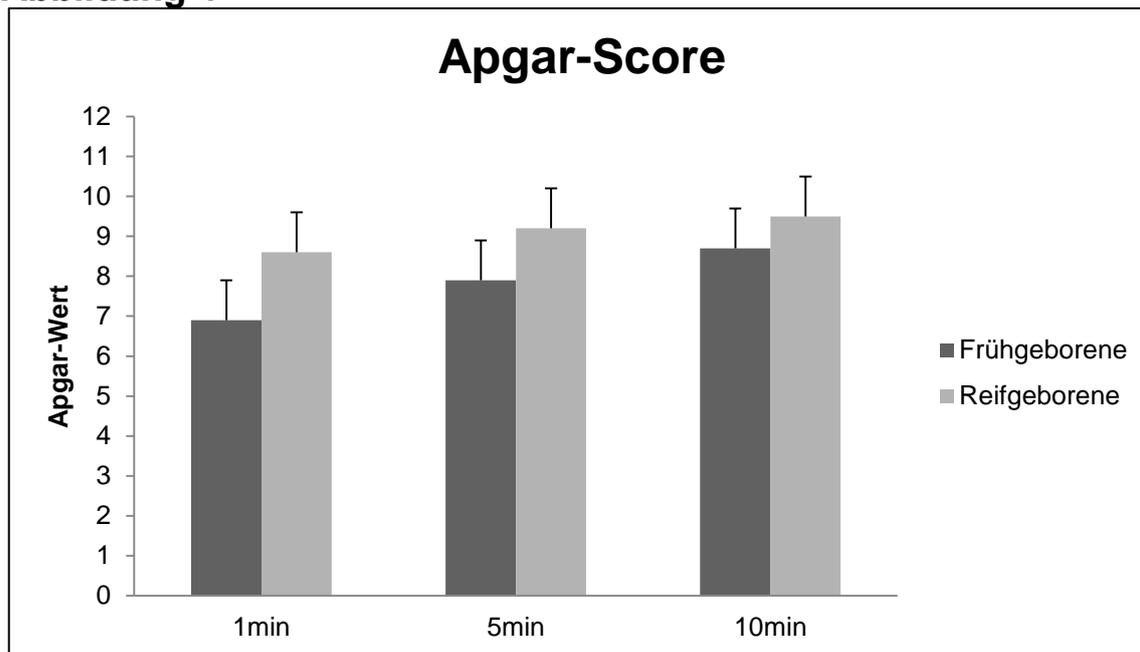


Abbildung 4: Apgar-Werte für Früh- und Reifgeborene nach 1min, 5min und 10min postnatal. Für die Grafik verwendet wurde das arithmetische Mittel. Vertikale Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

4.2 Verteilung der Leukozyten-Subgruppen

Die Baseline-Werte können Tabelle 8 entnommen werden.

Anhand ihrer Expression der Oberflächenmarker CD14 und CD16 können drei verschiedene Untergruppen von Monozyten im peripheren Blut unterschieden werden: die klassischen ($CD14^{++}CD16^{-}$), die pro-inflammatorischen ($CD14^{(+)}CD16^{++}$) und die Übergangs- ($CD14^{+}CD16^{+}$) monozyten.

Es zeigten sich in der Gruppe der Reifgeborenen gegenüber der adulten Kontrollgruppe signifikant erhöhte Zellzahlen zirkulierender Leukozyten ($p=0.016$). Auch für die Gruppe der Frühgeborenen konnte dieser Trend gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet werden (10260.4 ± 7435.3 cells/ μ l versus 6816 ± 1332.9 cells/ μ l, mit $p=0.16$ nicht signifikant). Zwischen beiden Gruppen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p=0.8$), siehe Abbildung 5A. Es zeigten sich ferner in der Gruppe der Reifgeborenen gegenüber der adulten Kontrollgruppe signifikant erhöhte Konzentrationen an Monozyten ($p<0.0001$). Auch für die Gruppe der Frühgeborenen konnte eine statistisch relevant erhöhte Anzahl an zirkulierenden Monozyten gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet werden ($p=0.013$). Zwischen beiden Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p=0.28$), siehe Abbildung 5B.

Für die Subpopulationen der klassischen Monozyten (CD14⁺⁺CD16⁻) und der Übergangsmoноzyten (CD14⁺CD16⁺) konnten im Vergleich zur adulten Kontrollgruppe signifikant höhere Konzentrationen in beiden Gruppen (Frühgeborene und Reifgeborene) gezeigt werden ($p < 0.02$ für alle Vergleiche). Es fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen, siehe Abbildungen 5C und 5D. Während sich ebenfalls eine erhöhte Anzahl der pro-inflammatorischen Monozyten bei Reifgeborenen im Vergleich zur adulten Kontrollgruppe zeigte ($p < 0.0001$), fanden sich in der Frühgeborenengruppe dahingegen erniedrigte Werte ($p = 0.013$, Abbildung 5E).

	Einheit	Gruppe	Baseline (T1)	p-Wert im Vergleich zu Erwachsenen (Kontrolle)	p-Wert zwischen beiden Gruppen
Leukozyten gesamt	/μl	Frühgeborene	10260.4±7435.3	p=0.16	
		Reifgeborene	10827.1±5328.4	p=0.016	p=0.80
		Erwachsene	6816±1332.9		
Monozyten gesamt	/μl	Frühgeborene	1038.9±601.8	p=0.013	
		Reifgeborene	1257.4±515.8	p<0.0001	p=0.28
		Erwachsene	499.6±133.2		
CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten	/μl	Frühgeborene	640.6±340.1	p=0.013	
		Reifgeborene	656.8±283.0	p<0.0001	p=0.27
		Erwachsene	361.2±69.2		
CD14⁺CD16⁺ Monozyten	/μl	Frühgeborene	182.9±157.6	p=0.013	
		Reifgeborene	141.7±88.1	p<0.0001	p=0.27
		Erwachsene	13.8±6.6		
CD14⁽⁺⁾CD16⁺⁺ Monozyten	/μl	Frühgeborene	28.8±27.9	p=0.013	
		Reifgeborene	99.7±71.3	p<0.0001	p=0.276
		Erwachsene	37.5±32.2		
PDC	/μl	Frühgeborene	4.7±3.4	p<0.0001	
		Reifgeborene	7.7±4.1	p=0.24	p<0.0001
		Erwachsene	6.4±5.4		
MDC	/μl	Frühgeborene	5.3±3	p<0.0001	
		Reifgeborene	6.1±4.5	p=0.285	p<0.0001
		Erwachsene	13±4.4		

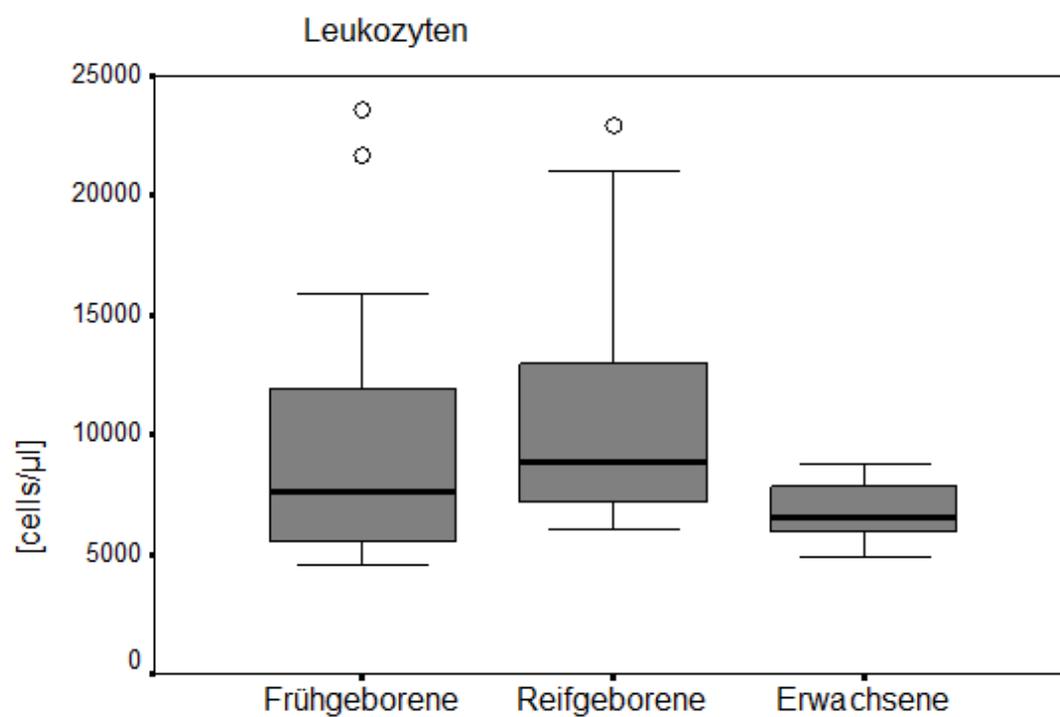
Tabelle 8: Verteilung der Leukozyten, Monozyten, Monozyten-Subpopulationen und Populationen der dendritischen Zellen an Zeitpunkt T1 (baseline). Angegeben werden Mittelwerte ± Standardabweichung. Durchgeführt wurde der Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben. $p < 0.05$ wird als statistisch signifikant angesehen.

Alter	Einheit	Leukozyten	Monozyten
3 Tage	/ μ l	9000-28200	200-2700
30 Tage	/ μ l	7200-21600	200-2300
18 Jahre	/ μ l	4020-11400	100-950
>18 Jahre	/ μ l	3900-10500	100-900

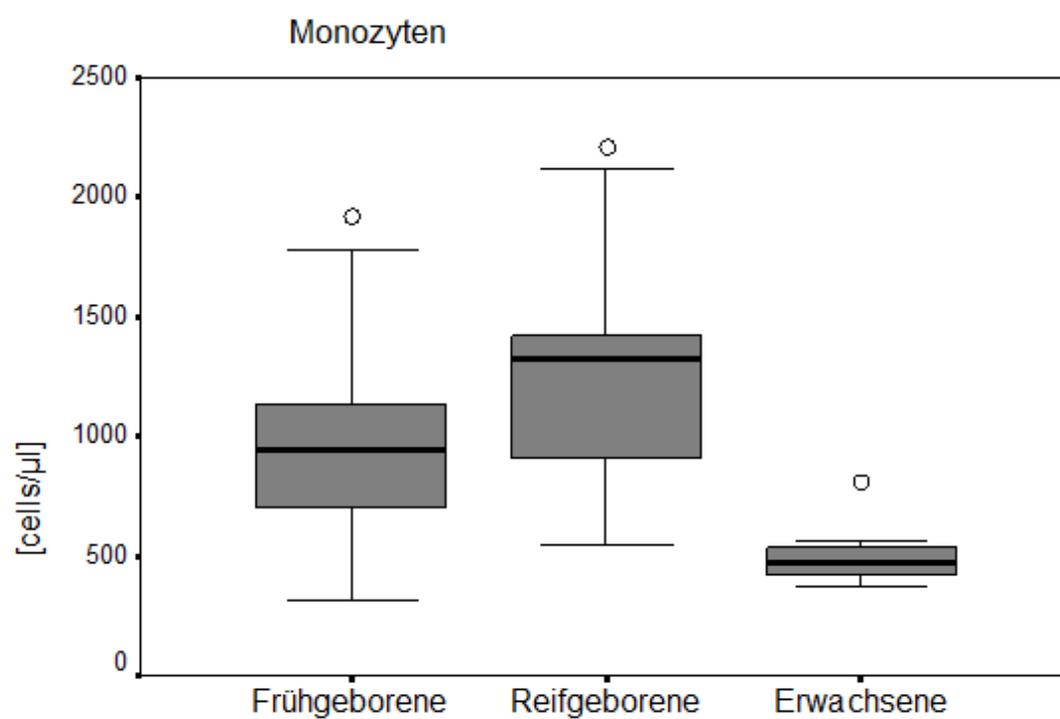
Tabelle 9: Referenzbereiche für die Gesamtanzahl an Leukozyten und Monozyten im peripheren Blut nach Alter (Institut für Medizinische Immunologie, Charité, Campus Mitte).

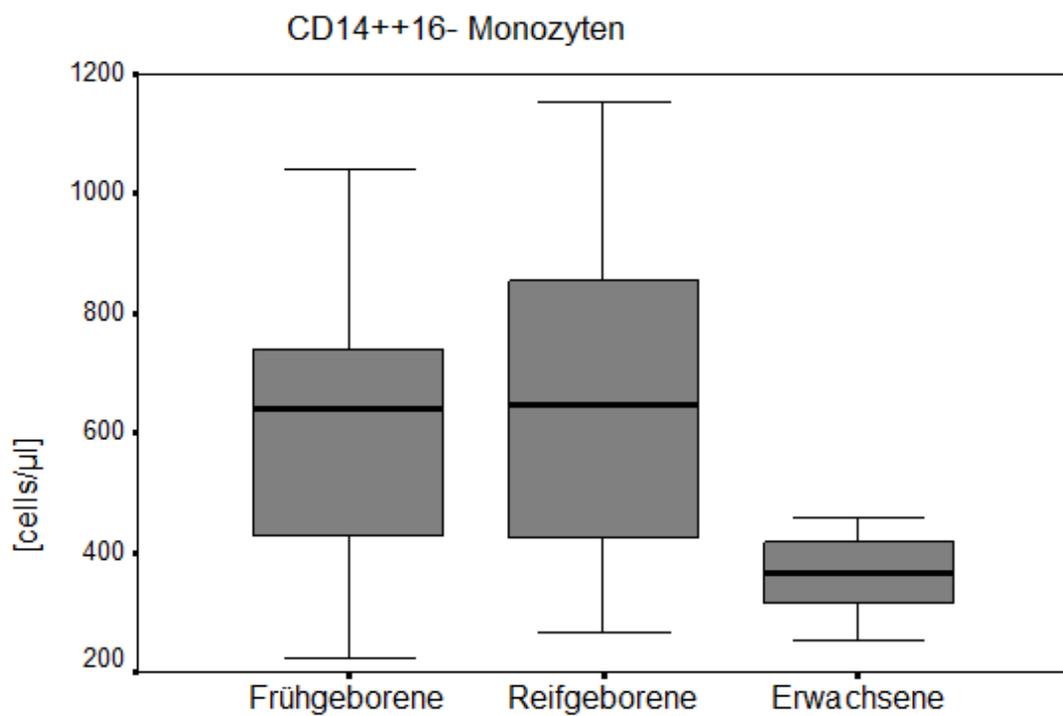
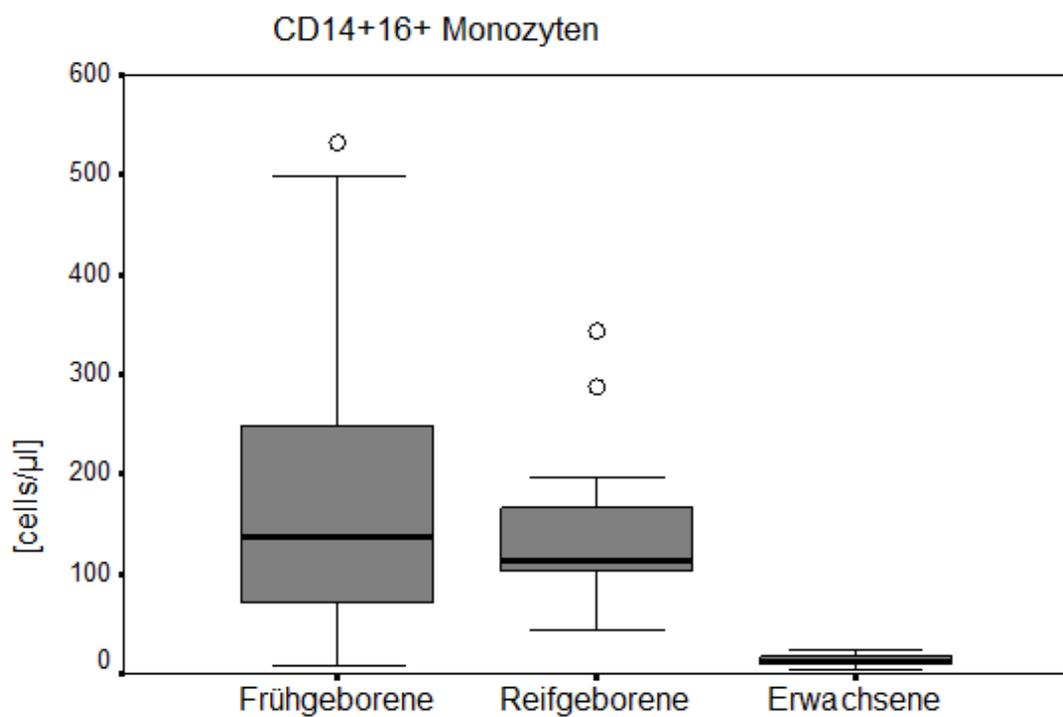
Abbildung 5

A



B



C**D**

E

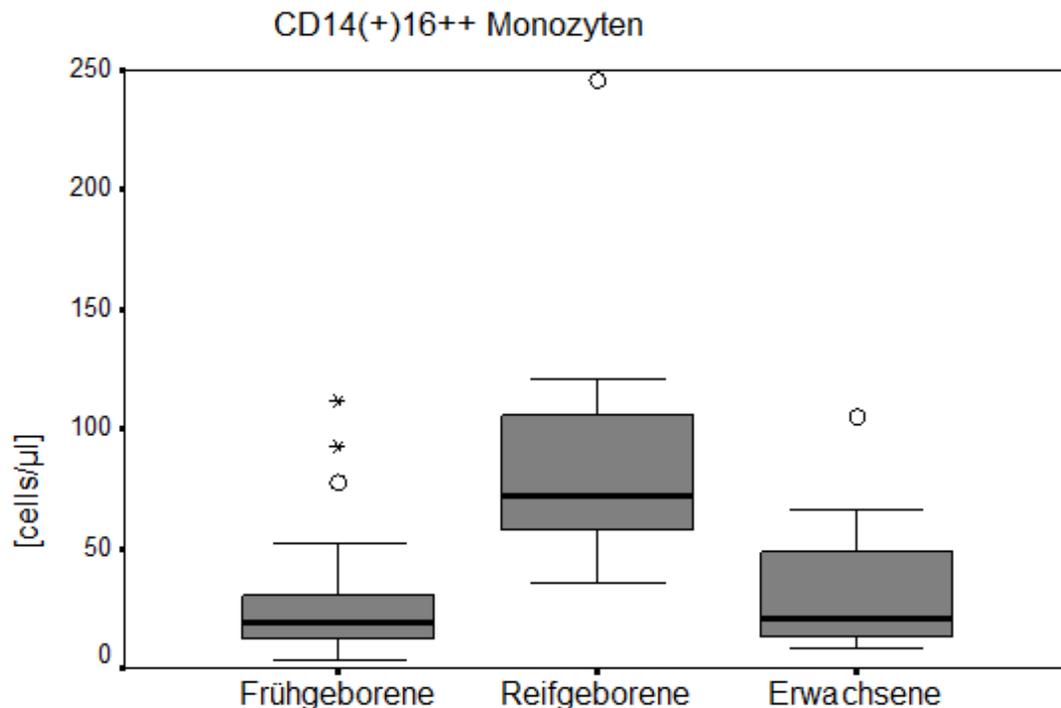


Abbildung 5 A-E: Gesamtanzahl der Leukozyten (A), Gesamt- Monozyten (B), CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten (C), CD14⁺CD16⁺ Monozyten (D) und CD14⁽⁺⁾CD16⁺ Monozyten (E) pro μl an Zeitpunkt T1 (baseline) für Frühgeborene, Reifgeborene und Erwachsene (Kontrolle). Aufgetragen wurden auf der Ordinate (lineare Skalierung) die absoluten Zellzahlen pro μl für alle drei Gruppen (Abszisse). Vertikale Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

4.3 Verteilung dendritischer Zellen

Die Baseline-Werte können Tabelle 8 entnommen werden.

Humanes peripheres Blut weist mindestens zwei verschiedene Populationen dendritischer Zellen (DC) auf. In der vorliegenden prospektiven Beobachtungsstudie wurden die Anzahl und die Funktion der plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDC, z.B. BDCA2⁺HLA-DR⁺) und myeloiden dendritischen Zellen (MDC, z.B. CD33⁺HLA-DR⁺) untersucht.

Im Vergleich zu gesunden adulten Probanden zeigte sich die Anzahl der MDC in der Gruppe der Frühgeborenen signifikant reduziert ($p < 0.0001$). Auch in der Gruppe der Reifgeborenen zeigte sich dieser Trend (keine statistische Signifikanz). Demgegenüber zeigte sich die Anzahl der PDC vergleichbar in allen drei untersuchten Gruppen (4.7 ± 3.4 , 7.7 ± 4.1 und 6.4 ± 5.4 pro μl für Früh-, Reifgeborene und Erwachsene).

In der vorliegenden Untersuchung fanden wir keinen statistisch signifikanten Unterschied in den Frequenzen myeloider und plasmazytoider Zellen für Früh- und Reifgeborene, während in der Kontrollgruppe gesunder Erwachsener eine signifikant höhere Anzahl an myeloiden dendritischen Zellen im Vergleich zu plasmazytoiden Zellen vorlag ($p=0.008$), siehe Abbildung 6.

Abbildung 6

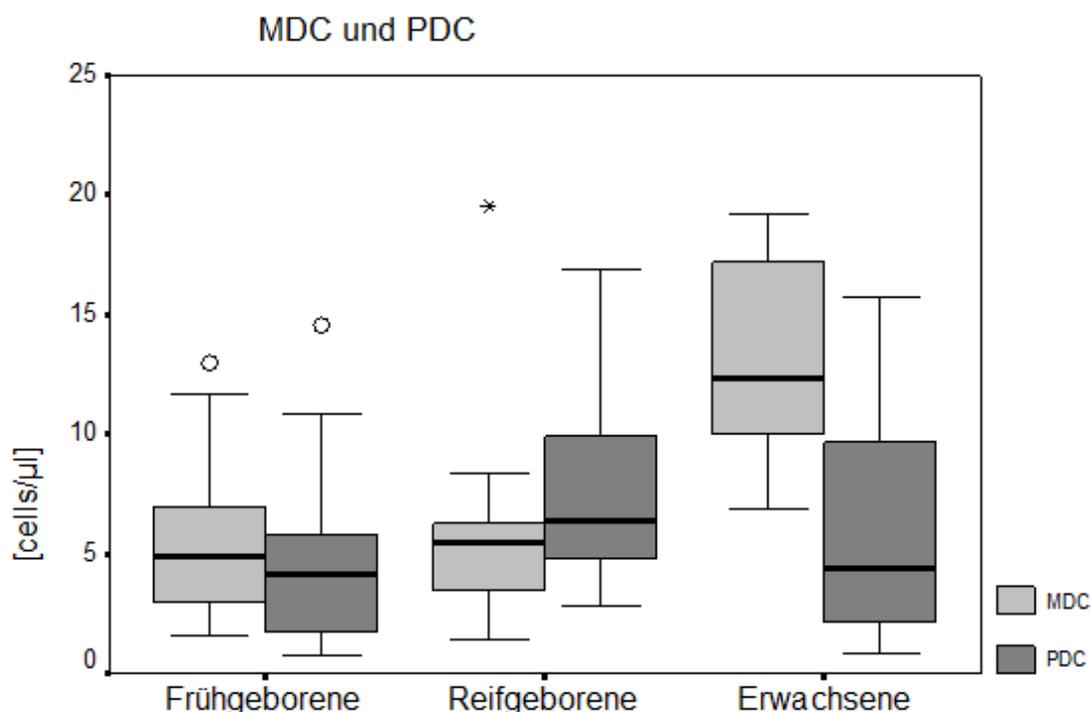


Abbildung 6: Gesamtanzahl der MDC und PDC pro μl an Zeitpunkt T1 für Frühgeborene, Reifgeborene und Erwachsene (Kontrolle). Aufgetragen wurden auf der Ordinate (lineare Skalierung) die absoluten Zellzahlen pro μl für alle drei Gruppen (Abszisse). Vertikale Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

4.4 HLA-DR-Expression auf Monozyten und dendritischen Zellen

Die Baseline-Werte können Tabelle 10 entnommen werden.

Eine reduzierte HLA-DR-Expression auf Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) wie Monozyten und dendritischen Zellen ist ein bekanntes Phänomen bei Immunsuppression in klinischen Situationen wie großen Traumata, Verbrennungen oder schwerer Sepsis und septischem Schock bei adulten Patienten. Während zahlreiche Daten über die HLA-DR-Expression auf klassischen ($\text{CD14}^{++}\text{CD16}^{-}$) Monozyten Frühgeborener existieren, gibt es kaum

Ergebnisse

Informationen über die HLA-DR-Expression von Monozyten-Subpopulationen und dendritischen Zellen Früh- und Reifgeborener. Für eine gesunde Immunkompetenz ist jedoch nicht nur die ausreichende Anzahl entsprechender zirkulierender Immunzellen sondern auch deren intakte Funktion erforderlich.

Die HLA-DR-Expression auf CD14⁺⁺CD16⁻ und CD14⁺CD16⁺ Monozyten (angegeben in mAb/cell: monoklonale Antikörper pro Zelle) zeigte sich in unseren Untersuchungen in beiden Gruppen (Früh- und Reifgeborene) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Erwachsene) reduziert (für alle Vergleiche signifikant bis auf für CD14⁺⁺CD16⁻Monozyten bei Reifgeborenen, hier konnte nur ein Trend beobachtet werden: in der Population der klassischen Monozyten für Frühgeborene $p < 0.0001$, in der Population der Übergangsmoноzyten für Frühgeborene $p < 0.0001$, für Reifgeborene $p = 0.006$), siehe Abbildung 7A und B. Dieser Effekt fand sich am deutlichsten in der Gruppe der Frühgeborenen. Weiterhin fand sich im Gruppenvergleich bei Frühgeborenen eine signifikant niedrigere HLA-DR-Expression als bei Reifgeborenen in den Populationen der klassischen und der Übergangsmoноzyten ($p < 0.0001$ für beide Vergleiche), siehe Abbildung 7A und B.

Interessanterweise konnte dieses Phänomen bei den pro-inflammatorischen (CD14⁽⁺⁾CD16⁺⁺) Monozyten nicht beobachtet werden. Hier zeigte sich die HLA-DR-Expression bei Reifgeborenen erhöht ($p < 0.0001$), während die Expression von HLA-DR bei Frühgeborenen mit der adulten Kontrollgruppe vergleichbar war. Weiterhin zeigte sich die HLA-DR-Expression in der Population im Gruppenvergleich bei Frühgeborenen signifikant niedriger als bei Reifgeborenen ($p < 0.0001$), siehe Abbildung 7C.

Insgesamt war die HLA-DR-Expression bei Früh- und Reifgeborenen in der Subpopulation der pro-inflammatorischen Monozyten höher als bei den klassischen Monozyten ($p < 0.001$), siehe Abbildung 7D.

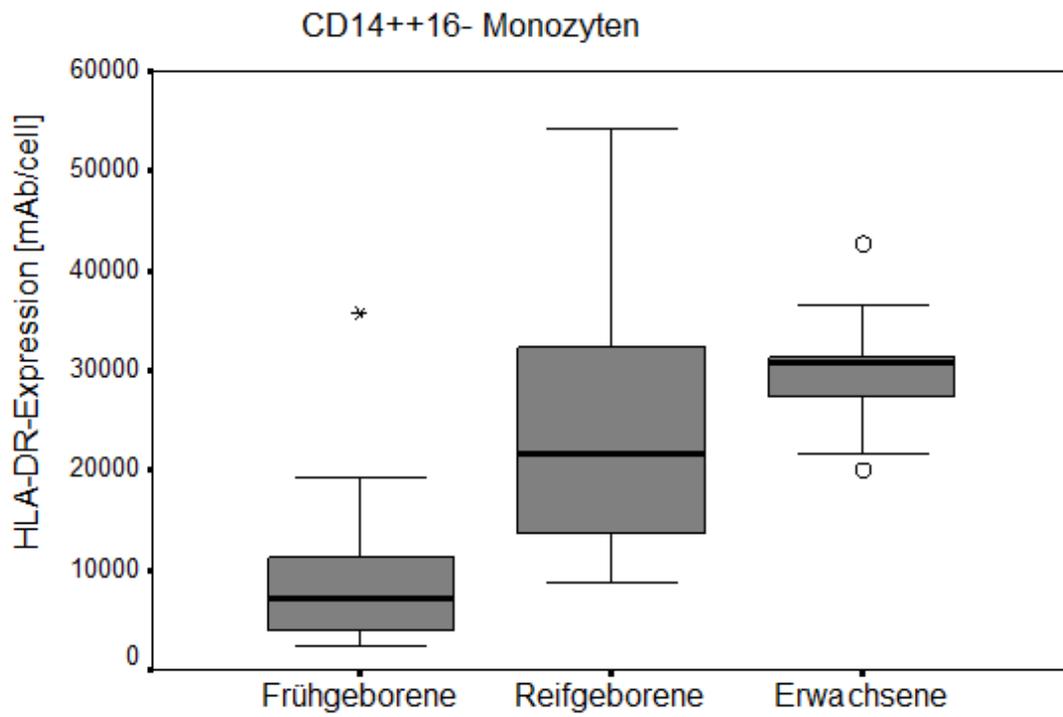
Im Vergleich zu gesunden erwachsenen Probanden fanden wir eine reduzierte HLA-DR-Expression auf MDC und PDC in beiden Gruppen (MDC: für Frühgeborene $p = 0.002$, für Reifgeborene $p < 0.000$, PDC: für Frühgeborene $p < 0.0001$, für Reifgeborene $p = 0.007$), siehe Abbildung 7 E-F.

HLA-DR auf	Gruppe	T1	T2	T3	T4	T5	p-Wert T1 vs. T5	1. p-Wert vs. Frühgeb. 2. vs. Erw. an T1
CD14++ CD16- Monos (mAB/cell)	Frühgeborene	8940.4 ±6901.3	11487.2 ±10879.9	14791.9 ±11010.4	16569.3 ±9805.3	16551.5 ±9805.3	p= 0.004	
	Reifgeborene	24938.4 ±13256.0						p<0.0001 p=0.285
	Erwachsene	30252.6 ±69169.9						p<0.0001
CD14+ CD16+ Monos (mAB/cell)	Frühgeborene	18405.8 ±15332.8	25002.9 ±17817.4	26880.0 ±15581.4	32037.8 ±19144.4	39045.8 ±23604.0	p=0.0009	
	Reifgeborene	104573.6 ±42954.3						p<0.0001 p=0.006
	Erwachsene	160757 ±40680.4						p<0.0001
CD14(+) CD16++ Monos (mAB/cell)	Frühgeborene	28932.6 ±20506.4	41280.4 ±33615.2	43197.2 ±29232.1	48213.8 ±42973.8	53656.9 ±40980.9	p= 0.01	
	Reifgeborene	84151.9 ±41149.3						p<0.0001 p<0.0001
	Erwachsene	20655.4 ±21285.4						p=0.31
MDC (mAB/cell)	Frühgeborene	29080.9 ±16792.6	34613.2 ±16848.2	41626.6 ±18711.2	42752.4 ±18234.9	36517.4 ±14573.9	p= 0.13	
	Reifgeborene	24642.4 ±12187.8						p=0.40 p<0.0001
	Erwachsene	49635.6 ±10068.2						p=0.002
PDC (mAB/cell)	Frühgeborene	16588.3 ±7695.0	17299.8 ±9100.9	16296.0 ±7539.8	16702.1 ±5534.2	15605.4 ±4724.9	p= 0.63	
	Reifgeborene	18558.4 ±6955.8						p=0.44 p=0.007
	Erwachsene	30706.0 ±11870.4						p<0.0001

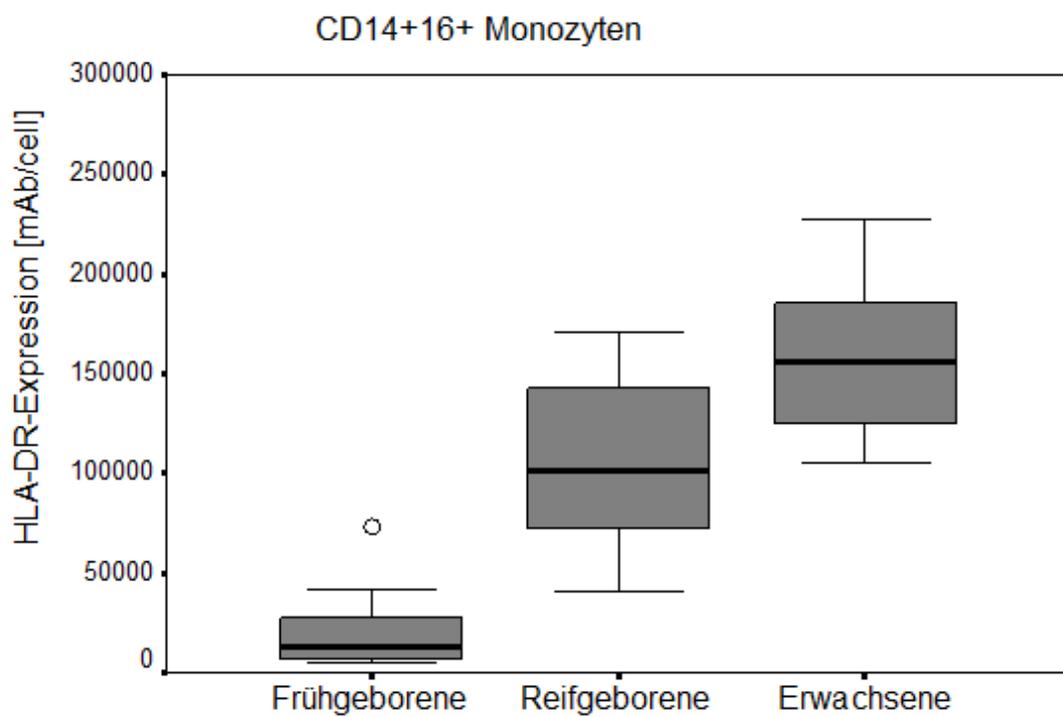
Tabelle 10: HLA-DR-Expression von Monozyten und dendritischen Zellen im Verlauf. Dargestellt wird die HLA-DR-Expression für Früh- und Reifgeborene sowie Erwachsene (Kontrolle) an T1 (baseline) sowie für Frühgeborene im Verlauf des Beobachtungszeitraums zusätzlich an T2, T3, T4 und T5. Angegeben werden Mittelwerte ± Standardabweichung. Durchgeführt wurde der Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben. p<0.05 wird als statistisch signifikant angesehen.

Abbildung 7

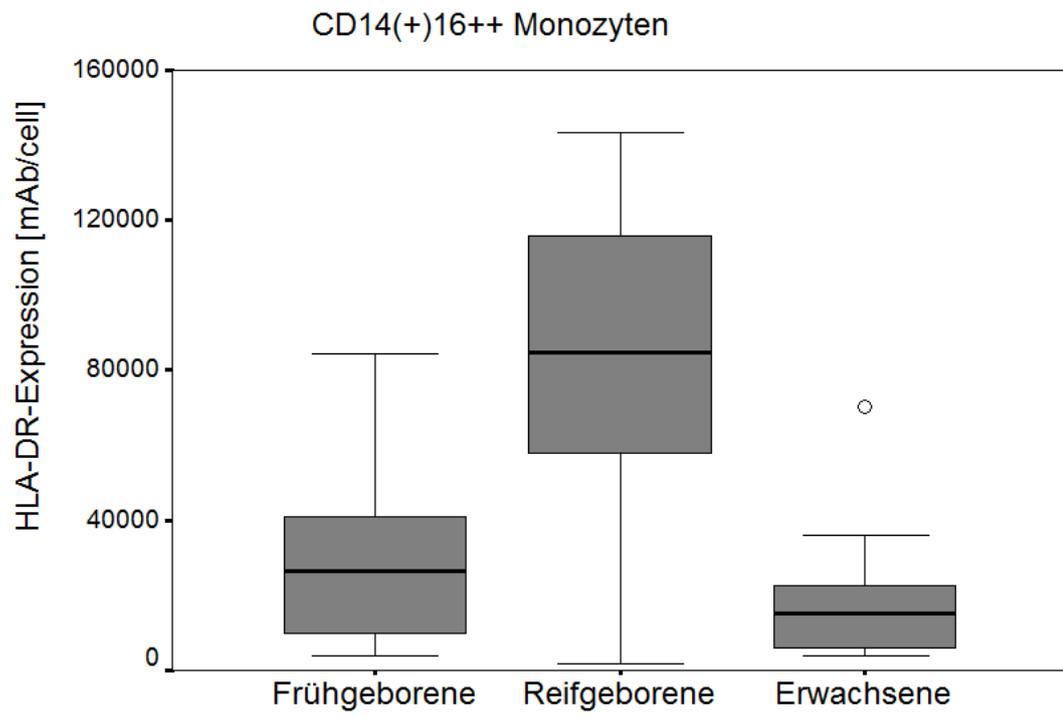
A



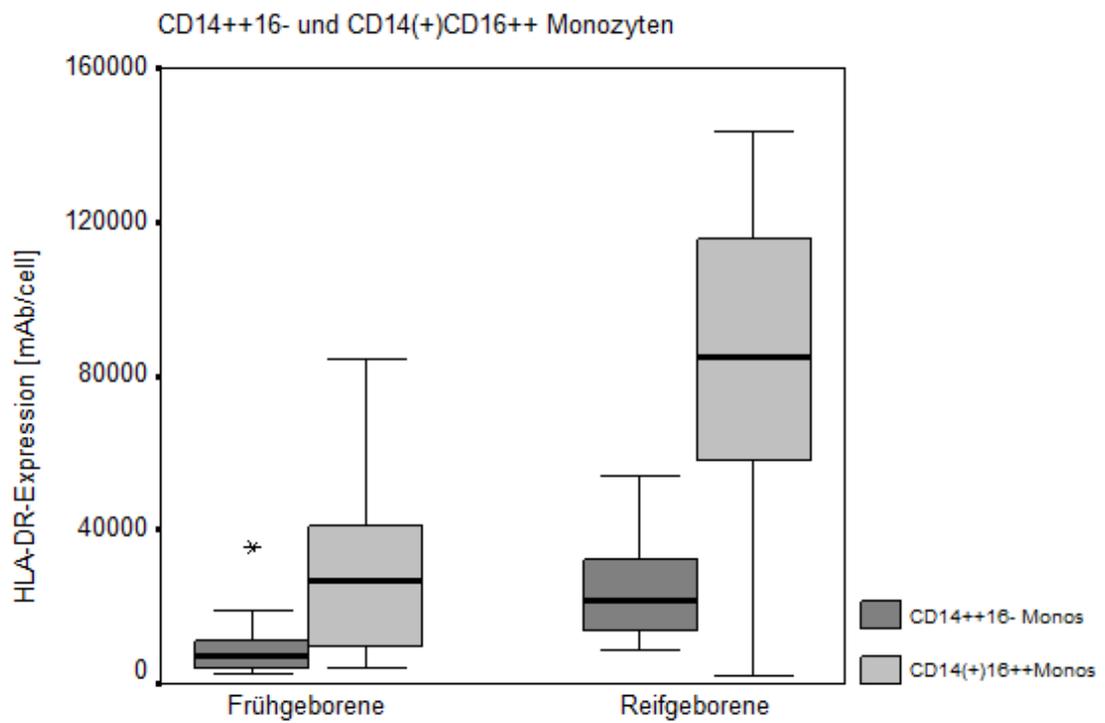
B



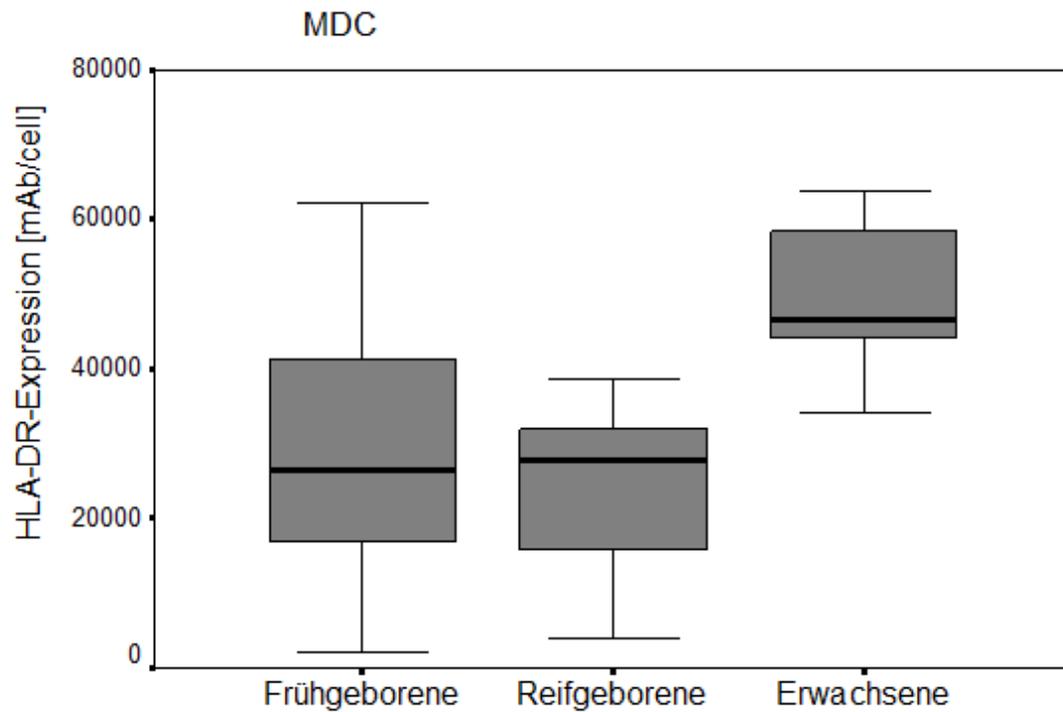
C



D



E



F

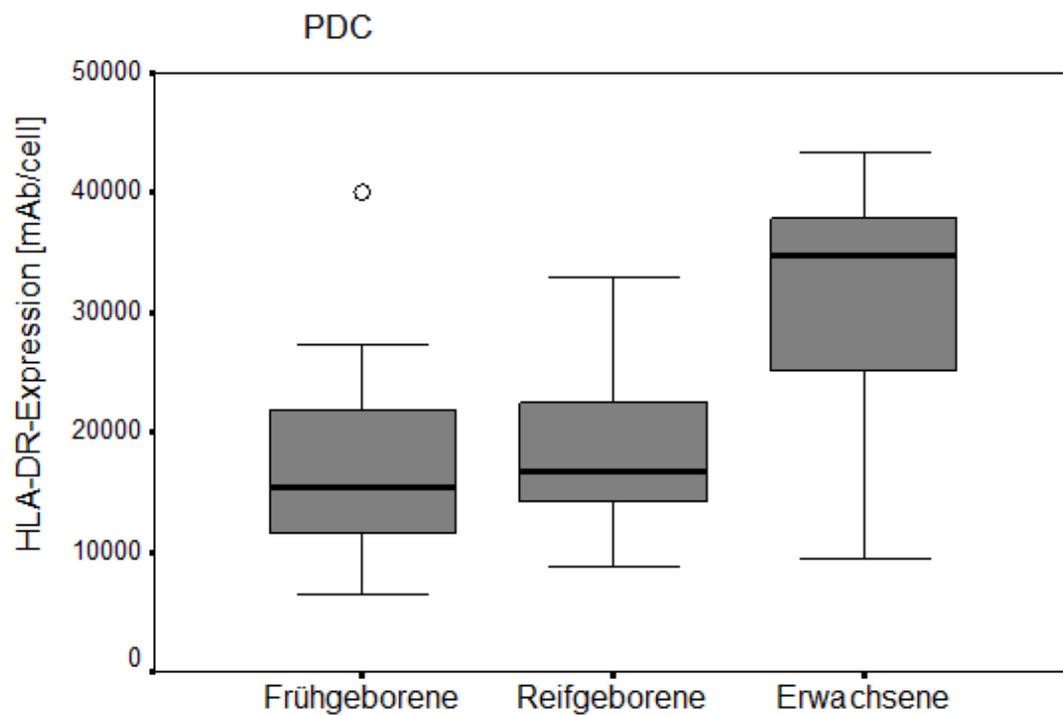


Abbildung 7 A-C, E-F: HLA-DR-Expression auf CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten (A), CD14⁺CD16⁺ Monozyten (B), CD14⁽⁺⁾CD16⁺⁺ Monozyten (C), MDC (E) und PDC (F) in mAb/cell (monoklonale Antikörper pro Zelle). Aufgetragen wurden auf der Ordinate (lineare Skalierung) die Expressionsstärke für die entsprechende Subpopulation in mAb/cell für alle drei Gruppen

(Abszisse). **D:** Vergleich der HLA-DR-Expression auf klassischen ($CD14^{++}CD16^{-}$) und pro-inflammatorischen ($CD(14^{+})CD16^{++}$) Monozyten bei Früh- und Reifgeborenen an T1 (baseline). Aufgetragen wurden auf der Ordinate (lineare Skalierung) die Expressionsstärke für die entsprechende Subpopulation in mAb/cell für die Gruppen der Früh- und Reifgeborenen (Abszisse). Für die Grafik verwendet wurde das arithmetische Mittel. Vertikale Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

4.5 Verlauf der HLA-DR-Expression von Monozyten und dendritischen Zellen in der frühen Postnatalphase

Die Baseline-Werte können Tabelle 10 entnommen werden.

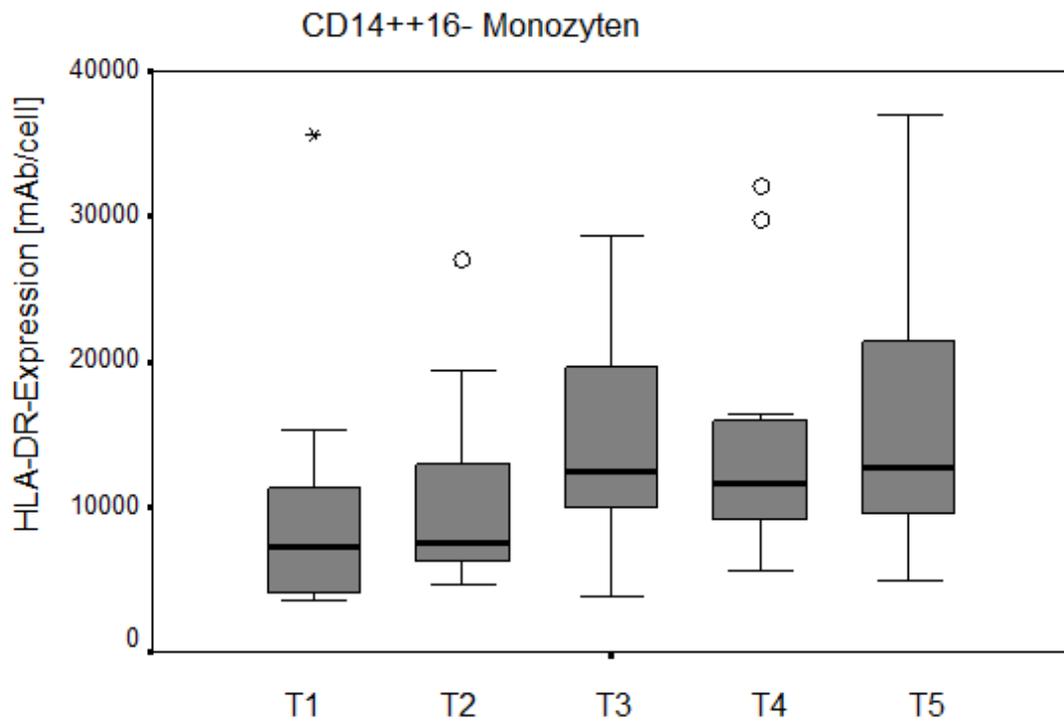
Um die Reifung der Immunkompetenz Frühgeborener zu untersuchen, betrachteten wir die HLA-DR-Expression auf Monozyten und dendritischen Zellen über einen Zeitraum von 28 Tagen.

Zwischen den Zeitpunkten T1 (72. – 96.Lebensstunde) und T5 (25 ± 3 Lebenstage) konnte ein signifikanter Anstieg der HLA-DR-Expression in allen drei Monozyten-Subpopulationen beobachtet werden (für $CD14^{++}CD16^{-}$ Monozyten $p=0.004$, Anstieg um 46%, für $CD14^{+}16^{+}$ Monozyten $p=0.0009$, Anstieg um 53% und für $CD14^{(+)}16^{++}$ Monozyten $p=0.01$, Anstieg um 46%). Ferner glichen sich die dokumentierten Konzentrationen an T4 / T5 denen gesunder adulter Probanden an; siehe Abbildungen 8A-C.

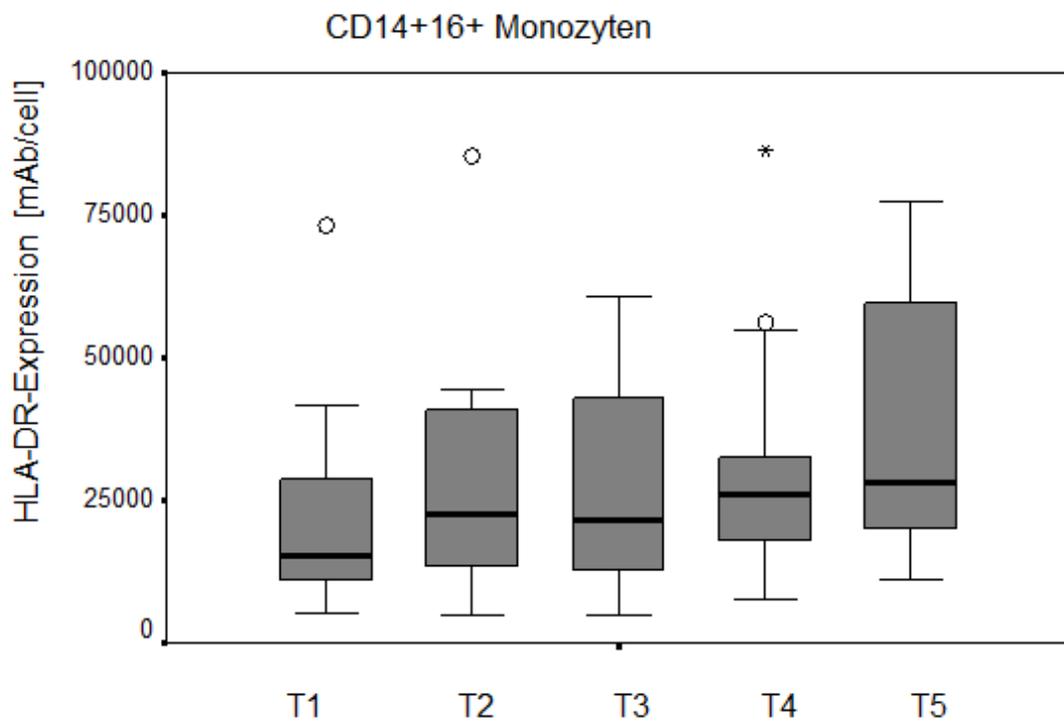
In der Population der dendritischen Zellen fand sich bei den MDC lediglich der Trend eines Anstiegs der HLA-DR-Expression über die beobachtete Zeit (nicht signifikant mit $p=0.13$). Interessanterweise zeigte sich diese Entwicklung bei den PDC nicht. Hier fand sich in der Gruppe der Frühgeborenen eine nahezu unveränderte HLA-DR-Expression während des gesamten Beobachtungszeitraumes, siehe Abbildungen 8D-E.

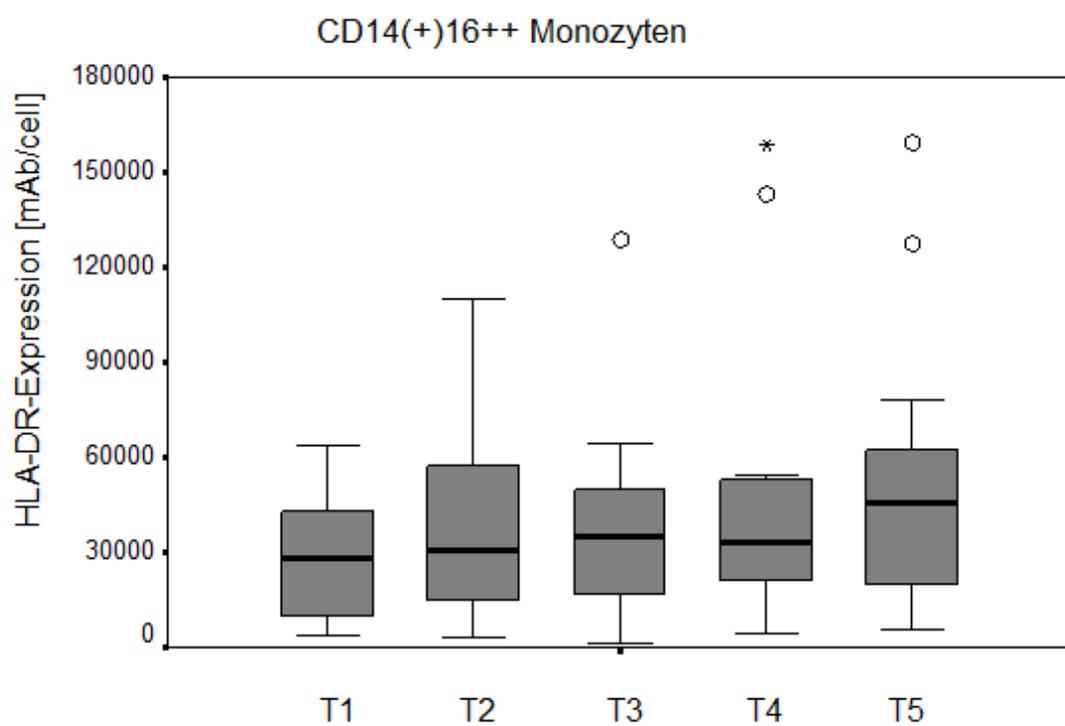
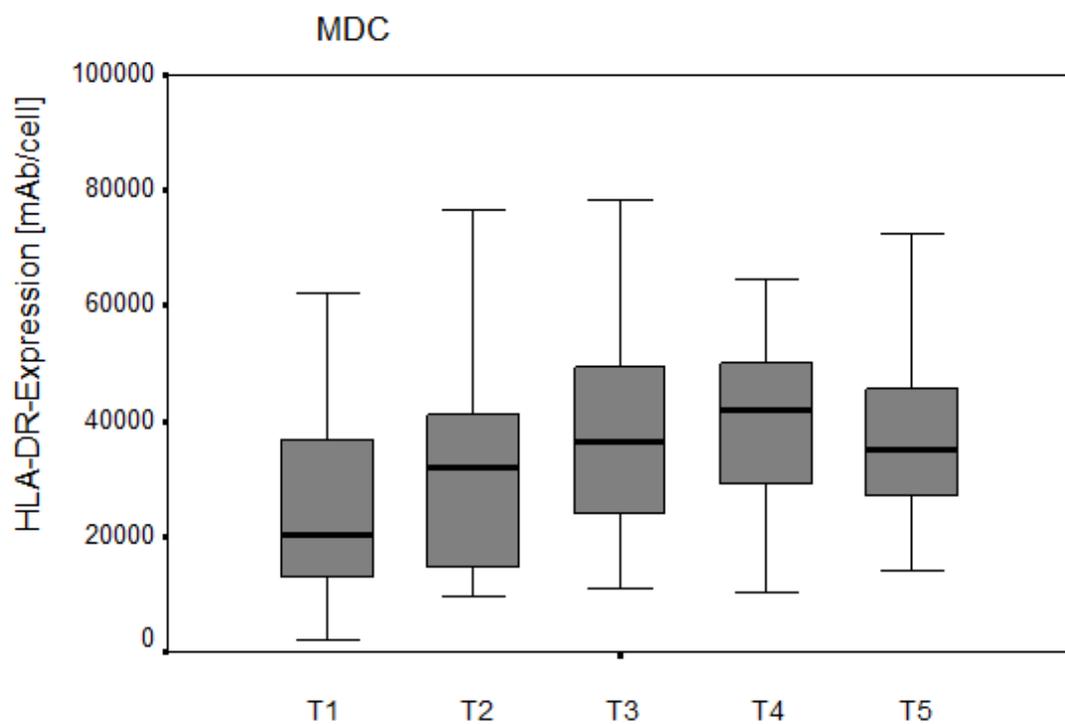
Abbildung 8

A



B



C**D**

E

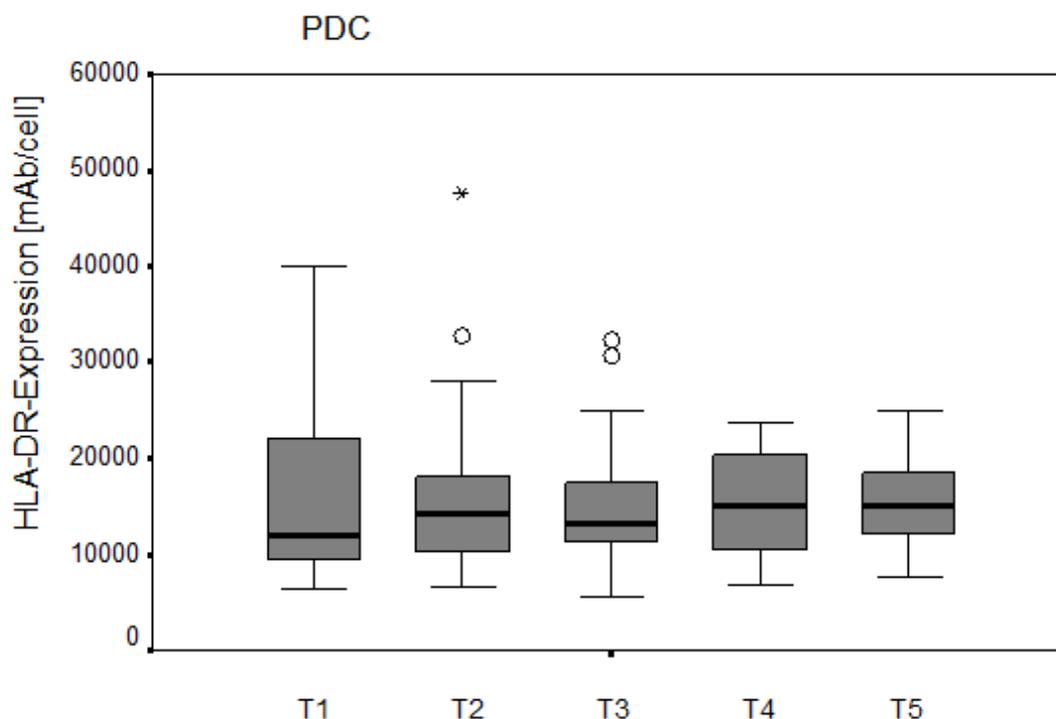


Abbildung 8 A-E: Verlauf der HLA-DR-Expression auf CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten (A), CD14⁺CD16⁺ Monozyten (B), CD14⁽⁺⁾CD16⁺⁺ Monozyten (C), myeloiden (D) und plasmazytoiden (E) dendritischen Zellen an den Zeitpunkten T1 (baseline), T2, T3, T4 und T5 (Endpunkt des Beobachtungszeitraums). Auf der Ordinate (lineare Skalierung) wurden die Expressionsstärken der entsprechenden Subpopulationen in mAb/cell für Frühgeborene zu allen Untersuchungszeitpunkten (Abszisse) aufgetragen. Für die Grafik verwendet wurde das arithmetische Mittel. Vertikale Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

4.6 Die Korrelation der HLA-DR-Expression mit klinischen Parametern

Korrelationskoeffizienten nach Pearson und p-Werte können Tabelle 11 entnommen werden.

4.6.1 Korrelation der HLA-DR-Expression mit Gestationsalter und Geburtsgewicht

Es zeigte sich bei den Neugeborenen (Früh- und Reifgeborene) eine signifikante Korrelation zwischen Gestationsalter und der monozytären HLA-DR-Expression an T1 in allen drei Subpopulationen: ein ansteigendes Gestationsalter war klar assoziiert mit einer ansteigenden monozytären HLA-DR-Expression ($p < 0.001$ für alle Vergleiche). Bei den DC zeigte sich dieser Zusammenhang nicht (entsprechend $p = 0.85$ für MDC und $p = 0.1$ für PDC). Ferner war ein niedriges Gewicht bei Geburt signifikant assoziiert mit einer verminderten HLA-DR-

Expression bei CD14⁺⁺CD16⁻, CD14⁺CD16⁺ und CD14⁽⁺⁾CD16⁺⁺ Monozyten ($p < 0.001$ für alle Vergleiche). Bei dendritischen Zellen war dieses Phänomen nicht zu beobachten (entsprechend $p = 0.44$ für MDC und $p = 0.35$ für PDC).

4.6.2 Korrelation der HLA-DR-Expression mit pH-Wert, Apgar-Score, antibiotischer Therapie und mechanischer Ventilation

Es fand sich weder in der Frühgeborenen- noch in der Reifgeborenenengruppe eine Korrelation zwischen pH-Wert bei Geburt und Höhe der HLA-DR-Expression auf Monozyten und dendritischen Zellen. Dagegen zeigte sich eine starke Assoziation zwischen dem 1-min Apgar-Score und der monozytären HLA-DR-Expression ($p < 0.02$ für alle Subpopulationen). Je niedriger der 1-min Apgar-Score ausfiel, desto geringer war die monozytäre HLA-DR-Expression. Dieser Zusammenhang zeigte sich nicht in den Populationen dendritischer Zellen.

Weiterhin untersuchten wir einen möglichen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Tage unter antibiotischer Therapie und der HLA-DR-Expression auf Monozyten und dendritischen Zellen an T1. Insgesamt $n = 16$ Patienten erhielten eine Antibiose mit einer durchschnittlichen Dauer von 2.8 ± 4.7 Tage. Für keine der untersuchten Zellpopulationen zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen Dauer der antiinfektiven Therapie und Höhe der HLA-DR-Expression ($p \geq 0.2$ für alle Vergleiche). Ferner zeigte sich ebenfalls kein Zusammenhang zwischen der Dauer einer mechanischen Ventilation und der Höhe der HLA-DR-Expression im beobachteten Zeitraum ($p \geq 0.2$ für alle Vergleiche). Die Anzahl der Apnoe-Episoden und Tage unter Hyperthermie (definiert als Körperkerntemperatur $> 38^\circ\text{C}$) zeigten keine Korrelation mit der HLA-DR-Expression auf Monozyten oder dendritischen Zellen.

		HLA-DR-Expression auf CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ Monozyten	HLA-DR-Expression auf CD14 ⁺ CD16 ⁺ Monozyten	HLA-DR-Expression auf CD14 ⁽⁺⁾ CD16 ⁺⁺ Monozyten	HLA-DR-Expression auf MDC	HLA-DR-Expression auf PDC
Gestationsalter	Korrelation	0.624	0.798	0.661	0.31	0.29
	Signifikanz	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p=0.85	p=0.1
Geburtsgewicht	Korrelation	0.569	0.810	0.649	-0.128	0.152
	Signifikanz	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p=0.44	p=0.35
pH bei Geburt Frühgeb.	Korrelation	0.27	0.134	0.062	0.099	0.234
	Signifikanz	p=0.897	p=0.514	p=0.764	p=0.629	p=0.25
pH bei Geburt Reifgeb.	Korrelation	0.024	-0.107	0.191	0.124	0.115
	Signifikanz	p=0.462	p=0.727	p=0.532	p=0.685	p=0.709
1-min Apgar	Korrelation	0.402	0.461	0.462	0.200	0.231
	Signifikanz	p=0.011	p=0.003	p=0.003	p=0.222	p=0.157
Tage unter Antibiose	Korrelation	-0.261	-0.226	0.017	-0.144	-0.130
	Signifikanz	p=0.197	p=0.268	p=0.935	p=0.484	p=0.525
Tage unter Beatmung	Korrelation	0.007	-0.285	-0.089	0.35	0.92
	Signifikanz	p=0.974	p=0.158	p=0.667	p=0.866	p=0.656
Anzahl an Apnoe-Episoden	Korrelation	-0.232	-0.324	0.19	-0.120	-0.109
	Signifikanz	p=0.254	p=0.107	p=0.925	p=0.558	p=0.597
Tage unter Hyperthermie	Korrelation	-0.323	-0.370	-0.134	-0.064	-0.101
	Signifikanz	p=0.108	p=0.063	p=0.514	p=0.757	p=0.625

Tabelle 11: Korrelation der HLA-DR-Expression an T1 mit klinischen Parametern. Angegeben wird der Korrelationskoeffizient nach Pearson, der p-Wert. p<0.05 wird als statistisch signifikant angesehen.

4.6.3 HLA-DR-Expression bei Neugeborenen mit akutem Atemnotsyndrom

Die Baseline-Werte können Tabelle 11 entnommen werden.

Bei n=7 Neugeborenen (alle aus der Frühgeborenenengruppe) wurde im Beobachtungszeitraum ein akutes Atemnotsyndrom (ANS) dokumentiert. In

dieser Gruppe war das Gestationsalter deutlich reduziert im Vergleich zu Neugeborenen ohne ANS ($p=0.005$). Weiterhin wies diese Gruppe ebenfalls ein signifikant reduziertes Geburtsgewicht auf ($p=0.05$), siehe Abbildungen 9A und B. Die Expression von HLA-DR auf $CD14^{++}CD16^{-}$ (klassischen) und $CD14^{+}CD16^{+}$ (Übergangs-) Monozyten fiel niedriger aus bei Patienten mit ANS im Vergleich zu Neugeborenen ohne ANS (für $CD14^{++}CD16^{-}$ Monozyten $p=0.03$ und für $CD14^{+}CD16^{+}$ Monozyten $p=0.04$), siehe Abbildung 9C. Auch in der Gruppe der $CD14^{+}CD16^{++}$ Monozyten zeigte sich dieser Trend (24665.7 ± 22007.1 mAb/cell vs. 52298.8 ± 40147.48 mAb/cell, mit $p > 0.05$ nicht signifikant).

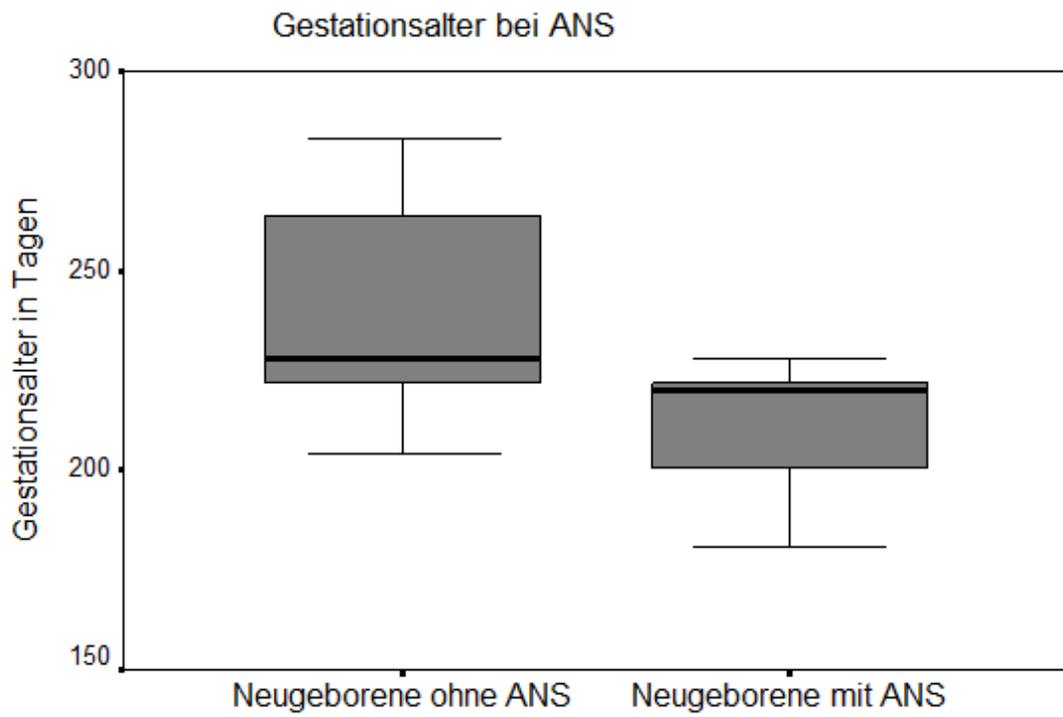
Dieser Zusammenhang fand sich nicht für die untersuchten Populationen der dendritischen Zellen (MDC und PDC, $p > 0.5$ für beide Vergleiche).

	Einheit	Frühgeborene mit Atemnotsyndrom	Neugeborene ohne Atemnotsyndrom	p-Wert zwischen den Gruppen
Gestationsalter	Tage	210.6 ± 17.1	241 ± 26	$p=0.005$
Geburtsgewicht	Gramm	1442.8 ± 407.4	2257.1 ± 1024.7	$p=0.047$
HLA-DR-Expression auf Monozyten: $CD14^{++}CD16^{-}$	mAb/cell	5285.3 ± 3128.3	16239.2 ± 12403.3	$p=0.027$
$CD14^{+}CD16^{+}$	mAb/cell	11986.7 ± 3255.5	54815.6 ± 51358.4	$p=0.035$
$CD14^{(+)}CD16^{++}$	mAb/cell	24665.7 ± 22007.1	52298.8 ± 40147.48	$p=0.088$
HLA-DR-Expression dendritischer Zellen: MDC	mAb/cell	26836.1 ± 17956.9	27768.9 ± 15094.7	$p=0.887$
PDC	mAb/cell	15611.1 ± 6103.5	17602 ± 7721.5	$p=0.528$

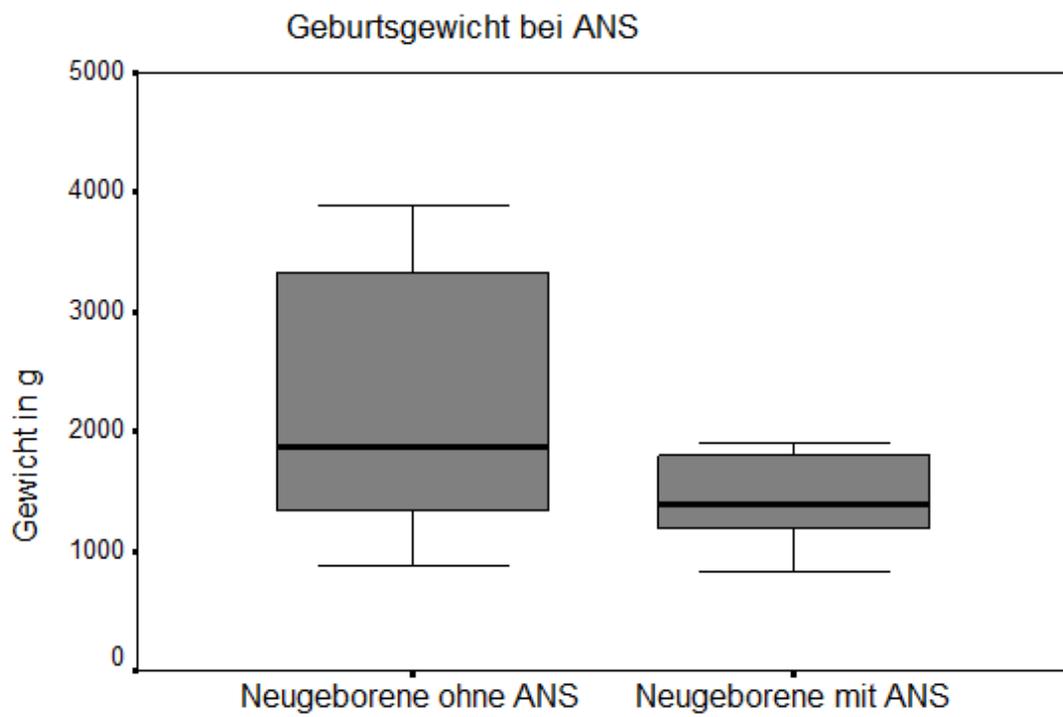
Tabelle 12: Gestationsalter, Geburtsgewicht und HLA-DR-Expression an T1 auf Monozyten und dendritischen Zellen für Neugeborene mit und ohne akutes Atemnotsyndrom. Angegeben werden Mittelwerte \pm Standardabweichung. Durchgeführt wurde der Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben. $p < 0.05$ wird als statistisch signifikant angesehen.

Abbildung 9

A



B



C

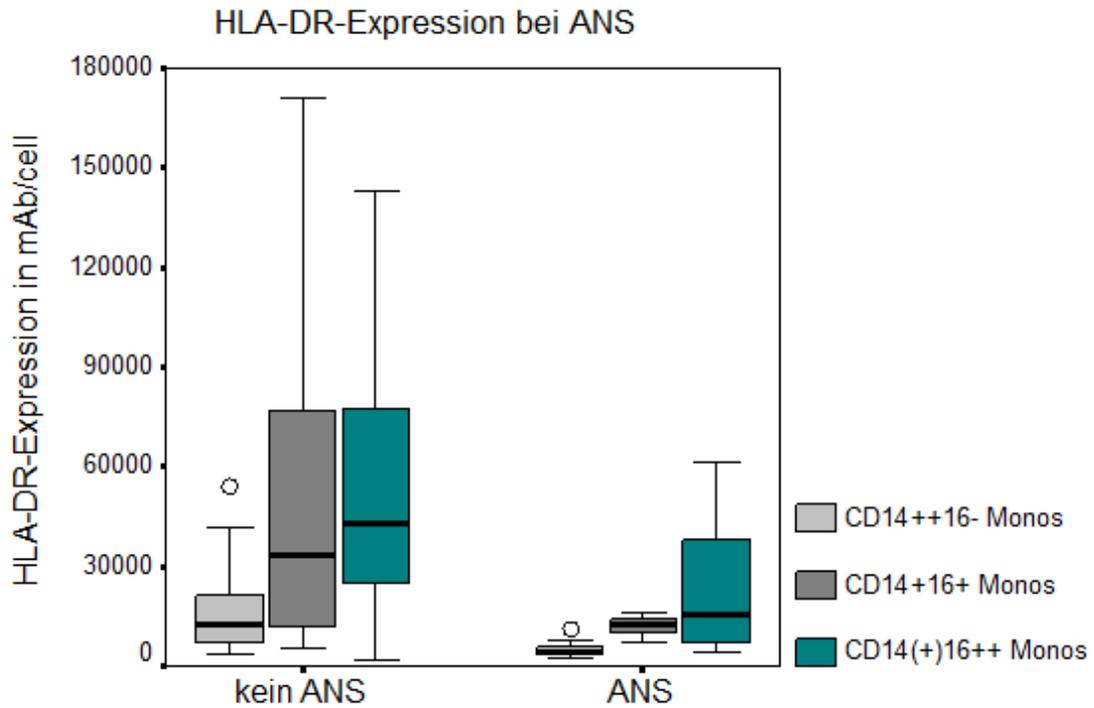


Abbildung 9 A-B: Gestationsalter (A) und Geburtsgewicht (B) bei Neugeborenen mit und ohne akutes Atemnotsyndrom (ANS). Auf der Ordinate (lineare Skalierung) wurde das Gestationsalter in Gesamttagen / das Geburtsgewicht in g für beide Gruppen, Neugeborene mit und ohne akutes Atemnotsyndrom (Abszisse), dargestellt. **C:** HLA-DR-Expression auf Monozyten bei Neugeborenen mit und ohne akutes Atemnotsyndrom zum Zeitpunkt T1 (baseline). Auf der Ordinate (lineare Skalierung) wurde die HLA-DR-Expressionsstärke der entsprechenden Subpopulation in mAb/cell für beide Gruppen, Neugeborene mit und ohne akutes Atemnotsyndrom (Abszisse), dargestellt. Für die Grafik verwendet wurde das arithmetische Mittel. Vertikale Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

5. Diskussion

Bekanntermaßen sind viele Funktionen des erworbenen Immunsystems Neugeborener noch nicht voll ausgereift (Strunk et al., 2011). Unter den Neugeborenen haben Frühgeborene die höchsten Infektionsraten von allen pädiatrischen Patienten und insbesondere bei den Säuglingen mit einem niedrigen Gestationsalter und /oder einem geringen Geburtsgewicht sind schwere Infektionen ernstzunehmende und oft lebensbedrohliche Komplikationen. Seit einiger Zeit ist bekannt, dass nicht nur organ-spezifische Komplikationen wie z.B. intrakranielle Blutungen oder bronchopulmonale Dysplasien zu den erhöhten Infektionsraten Frühgeborener beitragen, sondern auch eine Unreife der zellulären Immunität als Ausdruck der frühen Geburt vorzuliegen scheint. Beispielsweise erreichen Frühgeborene innerhalb ihres ersten Lebensjahres nach Impfungen erst deutlich später die gleiche Immunität wie Reifgeborene desselben postnatalen Alters (Kollmann et al., 2012). Dies legt eine schwerwiegende und anhaltende Immundefizienz Frühgeborener im Vergleich zu Reifgeborenen in der frühen Postnatalperiode nahe.

Interessanterweise wurden gerade zu diesem Thema in den letzten Jahren eine Reihe wissenschaftlicher Arbeiten publiziert. Die unverändert schlechte Prognose der nosokomialen Sepsis Frühgeborener trotz moderner intensivmedizinischer Therapie fordert die standardisierte Detektion prädiktiver Parameter einer vorliegenden temporären Immundefizienz für diese Patientengruppe. Doch auch für Reifgeborene existieren zahlreiche Daten, die eine im Vergleich zu Erwachsenen verminderte Immunkompetenz aufzeigen. Eine postnatale Unreife von Monozyten Neugeborener in der Differenzierung zu Makrophagen sowie die verminderte Sekretion von Zytokinen bewirkt eine unzureichende Aktivierung von Zellen der erworbenen Immunabwehr (Strunk et al., 2011).

Um die komplexe Pathophysiologie des innaten Immunsystems Neugeborener besser zu verstehen, untersuchten wir in einer prospektiven monozentrischen Beobachtungsstudie die HLA-DR-Expression verschiedener Subpopulationen von Monozyten und dendritischen Zellen bei Früh- und Reifgeborenen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gesunder Erwachsener und unter Berücksichtigung klinischer Verlaufsparemeter.

Es konnte gezeigt werden, dass neben erhöhten Zellzahlen von klassischen, CD14⁺⁺CD16⁻ und von Übergangs-, CD14⁺CD16⁺ Monozyten eine deutliche Reduktion der HLA-DR-Expression in diesen Zellpopulationen bei Neugeborenen (Früh- und Reifgeborenen) an T1 im Vergleich zu gesunden Erwachsenen vorliegt. Diese zu postulierende passagere funktionelle Unreife Neugeborener in der frühen Postnatalperiode fand sich signifikant deutlicher ausgeprägt in der Gruppe der Frühgeborenen. Auch bei den dendritischen Zellen zeigte sich eine erniedrigte HLA-DR-Expression.

Ferner konnten wir erstmalig demonstrieren, dass dieses Phänomen in der Population der pro-inflammatorischen, CD14⁽⁺⁾CD16⁺⁺, Monozyten nicht vorzuliegen scheint. Hier fanden sich ähnlich hohe HLA-DR-Expressionen bei Frühgeborenen und Erwachsenen, während sich in der Gruppe der Reifgeborenen sogar erhöhte Werte zeigten. Im Beobachtungszeitraum kam es weiterhin für alle untersuchten Monozyten-Zellpopulationen zu einem signifikanten Anstieg der HLA-DR-Expression bis hin zu vergleichbaren Werten bei Erwachsenen; vermutlicherweise als Ausdruck eines komplexen Reifungsprozesses des innate Immunsystems in der frühen Postnatalperiode.

Folgend werden die Ergebnisse der vorliegenden Studie einzeln diskutiert.

5.1 Erhöhte Anzahl von zirkulierenden Leukozyten und Monozyten-Subpopulationen bei Neugeborenen

Monozyten gehören zu den wichtigsten Antigen-präsentierenden Zellen (APC). Durch die effiziente Präsentation pathogener Antigene über MHC-Klasse-II-Moleküle aktivieren sie Zellen der erworbenen Immunabwehr und bilden somit eine Brücke zwischen dem innate und dem erworbenen Immunsystem.

Passend zu vorliegenden Arbeiten um Caron, Belderbos und Pérez zeigte sich auch in unserer Studie an Zeitpunkt T1 sowohl die Anzahl an zirkulierenden Leukozyten als auch die Anzahl an peripheren Monozyten Neugeborener im Vergleich zu gesunden adulten Probanden (Kontrollgruppe) erhöht (Caron et al., 2010, Belderbos et al., 2009, Pérez et al., 2010). Ein Phänomen, welches zumindest anteilig durch den in engem zeitlichen Zusammenhang stehenden stressigen Mechanismus der Geburt erklärt werden könnte. Entgegen vorliegender Daten fanden sich diesbezüglich in der vorliegenden Untersuchung

keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Frühgeborenen und Reifgeborenen (Kovarik et al., 1998, Adkins et al., 2004, Velilla et al., 2006, Gladstone et al., 1990, Hallwirth et al., 2004).

Monozyten sind keine homogene Zellpopulation und lassen sich nach internationalem Konsensus im Wesentlichen in drei Subpopulationen unterteilen (Ziegler-Heitbrock, 2010). Anhand ihrer Expression der Oberflächenmarker CD14 und CD16 wird unterschieden zwischen den klassischen, CD14⁺⁺CD16⁻, den Übergangs-, CD14⁺CD16⁺ und den pro-inflammatorischen, CD14⁽⁺⁾CD16⁺⁺ Monozyten. Pro-inflammatorische Monozyten sind durch eine höhere Expression von HLA-DR und eine erhöhte Zytokinsynthese-Kapazität im Vergleich zu klassischen Monozyten gekennzeichnet. Eine deutliche Frequenzzunahme konnte in vorherigen Studien bei septischen adulten Patienten nachgewiesen werden (Poehlmann et al., 2009).

In der Differenzierung und Untersuchung der unterschiedlichen Subpopulationen von Monozyten konnten wir beobachten, dass die Frequenz der klassischen, CD14⁺⁺CD16 Monozyten und der Übergangs-, CD14⁺CD16⁺ Monozyten bei allen Neugeborenen (Frühgeborene und Reifgeborene) im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht war. Interessanterweise zeigte sich diese Beobachtung bei den pro-inflammatorischen Monozyten in der Gruppe der Frühgeborenen nicht, wohingegen bei Reifgeborenen in dieser Population ebenfalls erhöhte Zellzahlen vorlagen. Wenngleich wir zum jetzigen Zeitpunkt nicht in der Lage sind, den genauen Mechanismus dahinter zu erklären, könnte die im Vergleich reduzierte Anzahl der pro-inflammatorischen Monozyten eine zusätzliche Fehlfunktion der Immunkompetenz und somit einen weiteren Faktor für die veränderte Immunabwehr in dieser Kohorte darstellen.

5.2 Frequenzen myeloider und plasmazytoider dendritischer Zellen

Dendritische Zellen sind die potentesten Antigen-präsentierenden Zellen und charakteristischerweise effektive Induktoren der T-Zell-vermittelten Immunantwort (Hunt et al., 1994). In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass ein Ungleichgewicht in der Verteilung myeloider und plasmazytoider Zellreihen mitverantwortlich für die Unreife der erworbenen Immunität Neugeborener ist (Darmochwal-Kolarz et al., 2003).

In der vorliegenden Studie fanden wir zum ersten Untersuchungszeitpunkt, gemäß T1 zwischen der 72. – 96. Lebensstunde, keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl myeloider und plasmazytoider Zellen für Früh- und Reifgeborene, wohingegen in der Kontrollgruppe gesunder Erwachsener eine deutlich höhere Frequenz an myeloiden dendritischen Zellen im Vergleich zu plasmazytoiden Zellen vorlag. Die zu diesem Inhalt vorliegende Literatur liefert kontroverse Ergebnisse. Während die Arbeitsgruppe um Darmochwal-Kolarz unreife Zellen der myeloiden Reihe als vorherrschende Population dendritischer Zellen in Nabelschnurblut benennt und ein erhöhtes Zahlenverhältnis von MDC:PDC im Vergleich zu dendritischen Zellen im peripheren Blut gesunder Erwachsener beobachtet hat (4:1 vs. 2:1), konnten Borrás et al. zeigen, dass Zellen vom plasmazytoiden Phänotyp die Mehrheit dendritischer Zellen in Nabelschnurblut darstellen und das MDC:PDC-Zahlenverhältnis entgegengesetzt zu dem von dendritischen Zellen im peripheren Blut gesunder Erwachsener ist (1:3 vs. 3:1), (Darmochwal-Kolarz et al., 2003, Borrás et al., 2001).

In der vorliegenden Studie fanden wir analog zu Ergebnissen von Schibler et al. und De Wit et al. vergleichbare Frequenzen von PDC in allen untersuchten Gruppen (Frühgeborene, Reifgeborene, Erwachsene). Auch in diesem Aspekt gewannen Darmochwal-Kolarz et al. andere Ergebnisse; ähnliche Zellzahlen zeigten sich hier für myeloide dendritische Zellen bei Reifgeborenen und Erwachsenen, während die Frequenzen plasmazytoider dendritischer Zellen bei Reifgeborenen niedriger als bei Erwachsenen waren. Schibler et al. konnten analog zu Darmochwal-Kolarz et al. sogar höhere Frequenzen myeloider dendritischer Zellen in Nabelschnurblut gesunder Neugeborener im Vergleich zu Erwachsenen beobachten (Schibler et al., 2002, De Wit et al., 2004, Darmochwal-Kolarz et al. 2003).

Die diesbezüglich diskrepanten, teils sogar gegensätzlichen Beobachtungen könnten einerseits durch die Wahl unterschiedlicher Methoden in der Selektion der untersuchten Zellpopulationen bedingt sein. Weiterhin ist anzumerken, dass die absoluten Zellzahlen dendritischer Zellen in peripherem Blut insbesondere bei Neugeborenen sehr gering ist (siehe Tabelle 8), was die Validität statistischer Aussagen stark einschränkt. Zusammenfassend können wir aus den von uns erhobenen Daten über die Verteilung dendritischer Zellen bei Früh- und Reifgeborenen keine allgemeingültigen Aussagen treffen.

5.3 HLA-DR-Expression auf Monozyten an T1

Da eine wirkungsvolle Immunabwehr gegen pathogene Strukturen von einer effektiven Antigen-Präsentation (und damit verbundenen Aktivierung der adaptiven Immunabwehr) abhängig ist, untersuchten wir in der vorliegenden Studie die zelluläre Immunfunktion anhand der Oberflächenexpression des MHC-Klasse II – Moleküls HLA-DR auf Monozyten und dendritischen Zellen in den einzelnen Studiengruppen. Für septische adulte Patienten ist die monozytäre HLA-DR-Expression seit einiger Zeit als Surrogatmarker einer Immundepression bzw. als Ausdruck einer temporär vorliegenden global eingeschränkten Funktionalität, bereits etabliert worden (Döcke et al., 2005).

Die klinische Relevanz der Expression von HLA-DR auf klassischen, CD14-positiven- Monozyten ist gut belegt. Dagegen ist die Stellung der anderen ebenfalls stark HLA-DR-exprimierenden Monozyten-Subpopulationen und der dendritischen Zellen insbesondere für Neugeborene bisher kaum untersucht (Sohlberg et al., 2011). Zur Quantifizierung der HLA-DR-Expression erfolgten an den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten durchflusszytometrische Messungen. Prinzipiell können zwei verschiedene Techniken für die Bestimmung der monozytären HLA-DR-Expression herangezogen werden: Die Bestimmung der Frequenz HLA-DR-positiver Monozyten sowie die quantitative Messung der Antigendichte anhand der sogenannten QuantiBRITE-Methode. Letztere wurde in der vorliegenden Studie angewandt und bietet den Vorteil einer hohen Standardisierung und besseren Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Laboren (Döcke et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, wie in früheren Studien bereits für gesunde Erwachsene demonstriert (Poehlmann et al., 2009), auch bei Früh- und Reifgeborenen eine höhere HLA-DR-Expression in der Population der pro-inflammatorischen, CD14⁽⁺⁾CD16⁺⁺ Monozyten im Vergleich zu klassischen, CD14⁺⁺CD16⁻, Monozyten. Diese Beobachtung liegt nicht in Übereinstimmung mit Daten aus der Forschergruppe um Sohlberg; hier wurde eine erhöhte Expression von HLA-DR in der Population der pro-inflammatorischen, CD14⁽⁺⁾CD16⁺⁺, Monozyten nur für Erwachsene, nicht aber für Neugeborene beschrieben (Sohlberg et al., 2011).

Im Gruppenvergleich konnten wir eine deutliche Reduktion der HLA-DR-Expression auf klassischen, CD14⁺⁺CD16⁻, und Übergangs-, CD14⁺CD16⁺, Monozyten bei Neugeborenen (Früh- und Reifgeborene) an T1 im Vergleich zu gesunden Erwachsenen (Kontrollgruppe) beobachten. Interessanterweise zeigte sich für beide Zellpopulationen bei Frühgeborenen im Vergleich zu Reifgeborenen eine signifikant niedrigere HLA-DR-Expression.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer Reihe publizierter Arbeiten (Azizia et al., 2012, Birle et al., 2003, Förster-Waldl et al., 2005, Hallwirth et al., 2004, Kanakoudi et al., 2001); in diesen Studien wurde dargelegt, dass Frühgeborene zum Zeitpunkt der Geburt eine verminderte monozytäre Expression von Klasse-II-MHC-Molekülen im Vergleich zu gesunden Reifgeborenen und Erwachsenen aufweisen. Dieser Trend hatte sich besonders ausgeprägt in der Gruppe der Neugeborenen mit einem Gestationsalter <30.0 SSW gezeigt (Pérez et al., 2010). So wiesen VLBWI in ihrer ersten Lebenswoche eine derartig niedrige monozytäre HLA-DR-Expression auf, dass die Werte bei Erwachsenen einer definierten Immundepression bis hin zur Immunparalyse entsprechen würden (Palojärvi A, Petäjä J et al., 2013), was auf eine funktionale Deaktivierung der entsprechenden Zellpopulationen hindeuten und unter dem Hintergrund der deutlich erhöhten Frequenzen dieser Zellpopulationen im Vergleich zu Erwachsenen eine kompensatorische Erhöhung der zirkulierenden Zellzahlen nach sich ziehen könnte.

Interessanterweise konnten wir analog zu den zu Erwachsenen vergleichbaren Zellzahlen, in der Population der pro-inflammatorischen Monozyten ähnlich hohe HLA-DR-Expressionen bei Frühgeborenen und Erwachsenen beobachten. In der Gruppe der Reifgeborenen zeigte sich die HLA-DR-Expression für diese Subpopulation sogar erhöht.

Mit der vorliegenden Studie konnten wir somit - nach dem Kenntnisstand der Autorin erstmalig - demonstrieren, dass die Annahme einer verminderten monozytären HLA-DR-Expression bei Früh- und Reifgeborenen im Vergleich zu Erwachsenen für die Population der pro-inflammatorischen, CD14⁽⁺⁾CD16⁺⁺, Monozyten nicht zutrifft. Diese Beobachtung könnte bedeuten, dass eine funktionelle Deaktivierung bei Monozyten Neugeborener überwiegend nur bei den klassischen Monozyten und nicht in der Subpopulation der pro-inflammatorischen Monozyten auftritt.

5.4 HLA-DR-Expression an T1 bei dendritischen Zellen

Die antigen-präsentierende Potenz dendritischer Zellen korreliert im Wesentlichen mit ihrer hohen Expression von Klasse-I- und insbesondere von Klasse-II-MHC-Molekülen (Hunt et al., 1994). Manche Autoren sprechen dabei von einer Reifung dendritischer Zellen nach Aktivierung (Vega-Ramos et al., 2012, Li et al., 2012, Huang et al., 2007).

Schon frühere Studien postulierten eine funktionelle Unreife dendritischer Zellen Neugeborener (Gold et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu DC Erwachsener dendritische Zellen aus Nabelschnurblut schwächere Stimulatoren der T-Zell induzierten Antwort auf Mitogene und der sogenannten „mixed leucocyte reaction“ sind (MLR: in vitro Methode zur funktionellen Untersuchung der Proliferation und Differenzierung von CD4- zu CD8-T-Lymphozyten) und dies zumindest teilweise durch eine verminderte Expression von HLA-DR bedingt wird. Die Arbeitsgruppe um Hunt beobachtete, dass die HLA-DR-Expression dendritischer Zellen aus Nabelschnur-Blut signifikant niedriger ist als die von DC Erwachsener (Hunt et al, 1994).

Analog zur monozytären Deaktivierung überwiegend von klassischen und Übergangs- Monozyten, fanden auch wir in der vorliegenden Untersuchung sowohl für myeloide als auch für plasmazytoide dendritische Zellen verminderte HLA-DR-Expressionen an T1 bei Früh- und Reifgeborenen im Vergleich zur Kontrollgruppe (gesunde Erwachsene). Vergleichend war dieser Effekt bei den dendritischen Zellen weniger ausgeprägt als bei den Monozyten.

Eine weitere Manifestation ihrer Unreife könnte eine verminderte Immunantwort neonataler dendritischer Zellen auf pathogene Stimuli über Toll-like Rezeptoren sein. Beispielsweise können PDC über eine TLR-9 vermittelte Aktivierung durch Agonisten wie CPG-DNA hohe Konzentrationen an INF-alpha produzieren, allogene T-Zellen stimulieren und diese direkt auf neue Antigene prägen (Gold et al., 1994).

In der Untersuchung gereinigter dendritischer Zellen konnten unter anderem Gold et al. zeigen, dass PDC aus Nabelschnurblut zwar nicht unerhebliche aber statistisch signifikant niedrigere Konzentrationen an INF-alpha als PDC Erwachsener produzierten und dieser Effekt bis über den vierten postnatalen Tag hinaus bestand (Gold et al., 2006, De Wit et al., 2004) Weiterhin reichte eine

alleinige Stimulation durch IL-3 bei PDC Neugeborener nicht aus, eine ähnliche Expressionen der co-stimulatorischen Oberflächenantigene CD80 und CD86 zu induzieren (De Wit et al., 2004).

Die funktionelle Untersuchung von Monozyten und dendritischen Zellen anhand ihrer Zytokinproduktion war ebenfalls Inhalt der vorliegenden Studie, wird jedoch in einer gesonderten Arbeit betrachtet. Ausblickend zeigte sich auch in unseren Untersuchungen eine herabgesetzte Funktionalität gemessen an der Zytokinsekretionskapazität Antigen-präsentierender Zellen bei in vitro Stimulation (Daten nicht gezeigt).

5.5 Ansteigendes HLA-DR bei Monozyten und dendritischen Zellen im Beobachtungszeitraum

In den Arbeitsgruppen um Palojärvi und Azizia wurde interessanterweise beobachtet, dass es innerhalb der ersten drei Lebenstage bzw. bis zur 48.Lebensstunde bei den meisten Frühgeborenen zu einem signifikanten Abfall der monozytären HLA-DR-Expression bis hin zu einem durchschnittlichen Nadir von ca. 57% mit unvollständigem Wiederanstieg bis zum 7.Lebenstag kommt (Palojärvi A, Petäjä J et al., 2013, Azizia et al., 2013). Die durch uns zwischen der 72. und 96. Lebensstunde (T1) erhobenen Ergebnisse fallen somit in diese postulierte vulnerable Phase, was neben einer primär verminderten Immunkompetenz Frühgeborener auch ein Grund für die niedrige monozytäre HLA-DR-Expression an T1 bei Frühgeborenen sein könnte. So zeigten sich in der vorliegenden Untersuchung im Vergleich zu T1 für alle Zellpopulationen an Zeitpunkt T2 (96.-120. Lebensstunde) ansteigende HLA-DR-Expressionen. Beobachtet wurde weiterhin durch andere Arbeitsgruppen, dass das zusätzliche Auftreten einer Sepsis zu einem ausgeprägteren Abfall der HLA-DR-Expression innerhalb der ersten Lebenstage führt (Azizia et al., 2012). Auch eine antenatale Steroidgabe zur Lungenreifeinduktion ist nach Studienlage ebenfalls begünstigend für eine postnatale passagere Immundepression, wobei sich der Zeitpunkt der Verabreichung entscheidend zeigte. Je näher Steroide am Geburtstermin gegeben wurden, desto ausgeprägter und längerfristiger war die Immunschwäche mit niedrigerer HLA-DR-Expression am siebten Lebenstag im Vergleich zu Säuglingen ohne antenatale Steroidgabe (Palojärvi A, Andersson S

et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden keine Informationen über die Verabreichung einer Lungenreifeinduktion dokumentiert; sodass Aussagen über den möglichen Einfluss einer antenatalen Glukokortikoidtherapie auf die von uns gewonnenen Daten nicht möglich sind.

Im Verlauf des gesamten Untersuchungszeitraums konnten wir für alle Zellpopulationen der Monozyten einen signifikanten Anstieg der HLA-DR-Expression an T5 von >45% dokumentieren. Analog lagen die Konzentrationen der HLA-DR-Expression an T1 bei weniger als 55% der Werte an T5 für alle Monozyten-Populationen. Diese Beobachtung liegt in Übereinstimmung mit der publizierten Arbeit von Palojärvi, 2012. Ferner glichen sich die Konzentrationen an T4 / T5 denen gesunder adulter Probanden an. Grundsätzlich ist somit eine längerfristige postnatale altersabhängige Reifung des innate Immunsystems Neugeborener zu postulieren. Die prä- und postnatale Exposition gegenüber Keimen aus dem Umgebungsmileu könnte diesen Reifungsprozess beschleunigen, möglicherweise über den Mechanismus einer früheren Aktivierung des angeborenen Immunsystems (Levy, 2007).

Interessanterweise fand sich in der Population der dendritischen Zellen lediglich bei den MDC der Trend eines Anstiegs der HLA-DR-Expression über die beobachtete Zeit (nicht signifikant). In der Population der PDC zeigte sich bei Frühgeborenen eine nahezu unveränderte HLA-DR-Expression während des gesamten Beobachtungszeitraumes.

5.6 Die Korrelation der HLA-DR-Expression mit klinischen Parametern

Inwiefern die durch uns beobachteten immunologischen Veränderungen auch mit klinischen Parametern korrelieren, die typischerweise mit einem unreifen Immunsystem assoziiert sind, soll im Folgenden dargestellt werden.

Das Risiko Frühgeborener, eine schwere Infektion oder Sepsis zu entwickeln, ist bekanntermaßen umgekehrt proportional zum Gestationsalter und zum Geburtsgewicht (Tissières et al. 2012, Pisani et al., 2012, Strunk et al., 2011). Somit stellte sich die Frage, ob auch die Expression von HLA-DR auf Monozyten und dendritischen Zellen, als globalem Marker der Immunkompetenz, mit einem geringen Gestationsalter und einem niedrigen Geburtsgewicht assoziiert ist. Wir konnten in der vorliegenden Studie für beide Aspekte eine klare Korrelation

zeigen. Sowohl ein geringes Gestationsalter als auch ein niedriges Geburtsgewicht waren an T1 klar assoziiert mit einer verminderten HLA-DR-Expression auf allen untersuchten Zellpopulationen von Monozyten (klassischen, Übergangs- und pro-inflammatorischen Monozyten). Schon die Arbeitsgruppe um Palojärvi konnte zeigen, dass bei VLBWI eine verminderte monozytäre HLA-DR-Expression mit dem Gestationsalter korreliert (Palojärvi A, Petäjä J et al., 2013). In unserer Untersuchung zeigten Säuglinge mit ANS im Durchschnitt ein niedrigeres Gestationsalter und ein geringeres Geburtsgewicht als Neugeborene ohne pulmonale Komplikationen. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der aktuellen Literatur (Palojärvi A, Petäjä J et al., 2013, Serrano et al., 2013). Weiterhin fanden sich in publizierten Studien bei VLBWI, die ein akutes Atemnotsyndrom (ANS) entwickelten, niedrigere monozytäre HLA-DR-Konzentrationen in Nabelschnurblut als bei VLBWI ohne pulmonale Komplikationen. Im Nadir um den 3. Lebenstag hatten sich verminderte Konzentrationen der monozytären HLA-DR-Expression und somit ein ausgeprägterer Abfall innerhalb der ersten Lebensstage im Vergleich zu Kindern ohne ANS gezeigt (Palojärvi A, Petäjä J et al., 2013). Ebenso im Verlauf der ersten Lebenswoche blieb die monozytäre HLA-DR-Expression niedriger als bei Kindern ohne ANS. Auch in unserer Arbeit fiel die Expression von HLA-DR auf klassischen und Übergangsmoноzyten bei Patienten mit ANS geringer aus im Vergleich zu Neugeborenen ohne ANS. Die Bestimmung der monozytären Expression von HLA-DR könnte somit als prognostischer Marker einer pränatalen Disposition zu Infektionen und anderen Komplikationen dienen (Azizia et al. 2012). Dieser Zusammenhang zeigte sich nicht für die untersuchten Populationen der dendritischen Zellen.

Entgegen dem in der Literatur beschriebenen häufigen Auftreten einer late-onset Sepsis bei VLBWI mit einer Inzidenz von ca. 30 Prozent (Bersani et al., 2012), entwickelten in der vorliegenden Studie lediglich zwei Frühgeborene eine nosokomiale Sepsis. Aufgrund dieser niedrigen Fallzahl wäre eine vergleichende Analyse bezüglich einer möglichen verminderten HLA-DR-Expression bei diesen Neugeborenen statistisch nicht relevant, weshalb darauf verzichtet wurde.

In früheren Arbeiten fand sich weiterhin hinsichtlich einer postnatalen Antibiotikagabe ein Zusammenhang zwischen Höhe der HLA-DR-Expression und Dauer der antiinfektiven Therapie. Frühgeborene, die postnatal eine Antibiose über

mehr als 10 Tage benötigten, wiesen eine signifikant verminderte HLA-DR-Expression in Nabelschnurblut auf verglichen mit Frühgeborenen, welche eine kürzere oder keine Antibiose erhielten (Azizia et al., 2012). In der vorliegenden Studie erhielt mit insgesamt n=16 Patienten bzw. ca. 36% der untersuchten Neugeborenen ein nicht sehr geringer Prozentsatz eine Antibiose mit einer durchschnittlichen Dauer von 1.9 ± 4.5 Tage. Ein statistischer Zusammenhang zwischen HLA-DR-Expression und der Verabreichung und Dauer einer antiinfektiven Therapie (Tage unter Antibiose) fand sich in unseren Untersuchungen nicht. Kein Studienproband erhielt eine Antibiose über den 7. Lebenstag hinaus; möglicherweise kommt es erst bei längerfristiger antibiotischer Therapie zu der durch Azizia et al. beschriebenen Immundepression.

Wir fanden keinen statistischen Zusammenhang zwischen der HLA-DR-Expression auf allen untersuchten Zellpopulationen und klinischen Parametern wie Nabelschnur-pH-Wert, Tage unter mechanischer Ventilation, Anzahl an Apnoe-Episoden, Entwicklung einer Hyperthermie und niedrigen Apgar-Scores.

5.7 Zusammenfassung/Ausblick

Der Hauptgrund für eine ungünstige Prognose bei Frühgeborenen sind Komplikationen durch schwerwiegende Infektionen wie beispielsweise die neonatale Sepsis mit einer Mortalitätsrate von mehr als einer Millionen Tote pro Jahr weltweit (Strunk et al., 2011). Mehrere publizierte Arbeiten postulieren eine passagere Immundepression Neu-, insbesondere Frühgeborener, wenngleich der genaue Pathomechanismus noch nicht in ausreichendem Umfang geklärt werden konnte.

Unter anderem ist die Unreife des innatens Immunsystems bedingt durch eine verminderte Anzahl und unzureichende Funktion von neutrophilen Granulozyten und Natürlichen Killerzellen, eine herabgesetzte Produktion von Zytokinen durch Monozyten sowie erniedrigte Konzentrationen von Wachstumsfaktoren (Growth Factor), des Komplementsystems und von Akute Phase Proteinen (Darmochwal-Kolarz et al., 2003).

Die Identifizierung weiterer immunologischer Parameter zur Vorhersagbarkeit eines erhöhten Infektionsrisikos dieser Hochrisiko-Gruppe Neugeborener ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Stellvertretend für die Gesamtpopulation Antigen-präsentierender Zellen untersuchten wir mittels Durchflusszytometrie die verschiedenen Subpopulationen von Monozyten und dendritischen Zellen nach ihrem Expressionsmuster von HLA-DR in der frühen Postnatalperiode.

Anhand der durch uns erhobenen Daten gehen wir zusammenfassend davon aus, dass die verminderte HLA-DR-Expression auf klassischen $CD14^{++}CD16^{-}$ und auf Übergangsmoноzyten $CD14^{+}CD16^{+}$ (nicht jedoch auf pro-inflammatorischen $CD14^{(+)CD16^{++}}$ Monozyten) sowie auf dendritischen Zellen (MDC und PDC) bei Früh- und Reifgeborenen einen Zustand immunologischer Unreife in diesen Populationen darstellt. Diese Unreife korreliert mit Gestationsalter und Geburtsgewicht; je niedriger das Gestationsalter und je geringer das Geburtsgewicht sind, desto niedriger fällt die monozytäre HLA-DR-Expression aus. Die beschriebene passagere Immundepression ist demzufolge besonders ausgeprägt bei Frühgeborenen, vor allem in der Gruppe der VLBWI, im Vergleich zu Reifgeborenen. Unsere Ergebnisse lassen die Annahme zu, dass die Mindereexpression von HLA-DR auf Monozyten und dendritischen Zellen zumindest in Teilaspekten mitverantwortlich ist für die deutlich erhöhten Infektionsraten von Frühgeborenen gegenüber Reifgeborenen. Bei akutem Atemnotsyndrom aber auch vermutlich bei neonataler Sepsis und anderen Infektionen könnte die funktionelle Beeinträchtigung der Monozyten und dendritischen Zellen die verminderte antimikrobielle Immunabwehr mitbedingen. Abschließend konnten wir mit der vorliegenden Studie eine hochgradige und anhaltende Verminderung der HLA-DR-Expression als einen möglichen Faktor für eine vorliegende Funktionsbeeinträchtigung zirkulierender klassischer und Übergangs-, nicht aber pro-inflammatorischer Monozyten demonstrieren. Weiterhin ist auch in den Populationen dendritischer Zellen bei Neugeborenen eine Funktionsbeeinträchtigung in der frühen Postnatalperiode anzunehmen. Um weitere Rückschlüsse über die zugrundeliegenden Pathomechanismen der verminderten Expression von Klasse-II-MHC-Molekülen auf Antigen-präsentierenden Zellen ziehen zu können, hätte der Umfang unserer Arbeit deutlich erweitert werden müssen .

Durch die in unserer Studie ebenfalls untersuchte Zytokinsekretionskapazität von Monozyten und dendritischen Zellen mittels in vitro Stimulation sollte auch auf die Funktionalität Antigen-präsentierender Zellen von Neugeborenen eingegangen

werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind Inhalt einer anderen bisher nicht veröffentlichten Arbeit, lassen aber ausblickend die Annahme zu, dass auch die verminderte Zytokinsekretionskapazität von Monozyten und dendritischen Zellen eine entscheidende Rolle im komplexen Pathomechanismus der postnatalen Immundepression Neugeborener spielt.

Um die individuelle Rolle der verschiedenen Populationen Antigen-präsentierender Zellen im Zustand der Immunsuppression bei neonatalen Infektionen besser zu verstehen, sind weitere Studien erforderlich.

Trotz intensiver medizinischer Versorgung ist die Prognose bei ernsthaften Infektionen Frühgeborener nach wie vor nicht befriedigend. Inwiefern die Wiederherstellung der Funktion von APCs durch beispielsweise immunmodulatorische Therapien Komplikationen durch Infektionen bei Neugeborenen vorbeugen bzw. das Outcome verbessern können, sollte in weiteren Studien beleuchtet werden.

5.8 Limitationen der vorliegenden Arbeit

Selbstkritisch bleibt anzumerken, dass die Bewertung der Allgemeingültigkeit unserer Beobachtungen durch eine Reihe von Faktoren limitiert ist. Die im Hinblick auf klinische Fragestellungen insgesamt sehr niedrige Fallzahl an Studienprobanden in den einzelnen Gruppen (n gesamt =45) ergab sich aus der monozentrischen Probandenrekrutierung der Studie aufgrund einer initial fälschlich zu hoch eingeschätzten Probandenanzahl. Aus der dadurch mitbedingten geringen Häufigkeit an Komplikationen wie einer Late-onset Sepsis (n=2) und einem akuten Atemnotsyndrom (n=7) lassen sich weiterhin kaum Schlussfolgerungen über einen möglichen Unterschied in der Immunkompetenz von Neugeborenen mit Infektionen im Vergleich zu Neugeborenen ohne infektiöse Komplikationen ziehen. Weiterhin wäre zu überlegen, ob ein früherer Untersuchungszeitpunkt für Neugeborene vor der 72.Lebensstunde zusätzliche Informationen geliefert hätte insbesondere in dem Kontext des unter anderem durch Azizia et al beschriebenen Abfalls der monozytären HLA-DR-Expression innerhalb der ersten wenigen Lebenstage.

Aufgrund des speziellen Probandenkollektivs standen uns lediglich geringe Blutvolumina zur Verfügung, sodass nur eine begrenzte Anzahl immunologischer

Diskussion

Parameter in unsere Untersuchung einbezogen werden konnten und im Falle fehlerhafter Messungen und/ oder verpasster Untersuchungszeitpunkte keine erneuten Untersuchungen möglich waren.

Gerade in Bezug auf die zu dendritischen Zellen gewonnenen Daten muss die geringe absolute Zellzahl im Vollblut erwähnt werden, welche die Aussagekraft der erhobenen Daten stark einschränkt. In zukünftigen Studien könnten gereinigte bzw. vorher isolierte mononukleäre Zellen (PBMC) verwendet werden, wobei auch hier die niedrigen zur Verfügung stehenden Blutvolumina Neugeborener limitierend sein dürften.

Gemäß der vorliegenden Literatur sollte in zukünftigen Studien der mögliche Einfluss einer antenatalen Steroidtherapie sowohl in Bezug auf die monozytäre HLA-DR-Expression als auch das Auftreten eines akuten Atemnotsyndroms bei Frühgeborenen berücksichtigt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(7):553-64.
2. Azizia M, Lloyd J, Allen M, Klein N, Peebles D. Immune status in very preterm neonates. *Pediatrics*. 2012;129(4):e967-74.
3. Belderbos ME, van Bleek GM, Levy O, Blanken MO, Houben ML, Schuijff L, Kimpen JL, Bont L. Skewed pattern of Toll-like receptor 4-mediated cytokine production in human neonatal blood: Low LPS-induced IL-12p70 and high IL-10 persist throughout the first month of life. *Clin Immunol*. 2009;133(2):228-37.
4. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L. The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol*. 2002;168(7):3536-42.
5. Bersani I, Speer CP. Nosocomial sepsis in neonatal intensive care: inevitable or preventable? *Z Geburtshilfe Neonatol*. 2012;216(4):186-90.
6. Birle A, Nebe CT, Gessler P. Age-related low expression of HLA-DR molecules on monocytes of term and preterm with and without signs of infection. *J Perinatol*. 2003;23(4):294-9.
7. Borrás FE, Matthews NC, Lowdell MW, Navarrete CV. Identification of both myeloid CD11c⁺ and lymphoid CD11c⁻ dendritic cell subsets in cord blood. *Br J Haematol*. 2001;113(4):925-31.
8. Bose CL, Laughon MM, Allred EN, O'Shea TM, Van Marter LJ, Ehrenkranz RA, Fichorova RN, Leviton A, ELGAN Study Investigators. Systemic inflammation associated with mechanical ventilation among extremely preterm infants. *Cytokine*. 2013;61(1):315-22.
9. Caron E, La Pine TR, Augustine NH, Martins TB, Hill HR. Multiplex analysis of toll-like receptor-stimulated neonatal cytokine response. *Neonatology*. 2010;97(3):266-73.
10. Christensen RD, Anstall HB, Rothstein G. Review: deficiencies in the neutrophil system of newborn infants, and the use of leukocyte transfusions in the treatment of neonatal sepsis. *J Clin Apher*. 1982;1(1):33-41.
11. Darmochwal-Kolarz D, Rolinski J, Buczkowski J, Tabarkiewicz J, Leszczynska-Gorzela B, Zych I, Oleszczuk J. CD1c⁺ immature myeloid dendritic cells are predominant in cord blood of healthy neonates. *Immunol Lett*. 2004;91(1):71-4.
12. Dasari P, Zola H, Nicholson IC. Expression of Toll-Like receptors by neonatal leukocytes. *Pediatr Allergy Immunol*. 2011;22(2):221-8.
13. De Wit D, Olislagers V, Goriely S, Vermeulen F, Wagner H, Goldman M, Willems F. Blood plasmacytoid dendritic cells responses to CpG oligodeoxynucleotides are impaired in human newborns. *Blood*. 2004;103(3):1030-2.
14. Döcke WD, Höflich C, Davis KA, Röttgers K, Meisel C, Kiefer P, Weber SU, Hedwig-Geissing M, Kreuzfelder E, Tschentscher P, Nebe T, Engel A, Monneret G, Spittler A, Schmolke K, Reinke P, Volk HD, Kunz D. Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. *Clin Chem*. 2005;51(12):2341-7.

15. Drews MB, Ludwig AC, Leititis JU, Daschner FD. Low birth weight and nosocomial infection of neonates in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect.* 1995;30(1):65-72.
16. Faivre V, Lukaszewicz AC, Alves A, Charron D, Payen D, Haziot A. Human monocytes differentiate into dendritic cells subsets that induce anergic and regulatory T cells in sepsis. *PLoS One.* 2012;7(10):e47209.
17. Fan Y, Yu J-L. Umbilical blood biomarkers for predicting early-onset neonatal sepsis. *World J Pediatr.* 2012;8(2):101-8.
18. Flier, A, Krediet TG. Innate immunity: toll-like receptors and some more. A brief history, basic organization and relevance for the human newborn. *Neonatology.* 2007;92(3):145-57.
19. Förster-Waldl, E, Sadeghi, K, Tamanl D, Gerhold B, Hallwirth U, Rohrmeister K, Hayde M, Prusa AR, Herkner K, Boltz-Nitulescu G, Pollak A, Spittler A. Monocyte toll-like receptor 4 expression and LPS-induced cytokine production increase during gestational aging. *Pediatr Res.* 2005;58(1):121-4.
20. Gastmeier P, Hentschel J, de Veer I, Obladen M, Rüden H. Device-associated nosocomial infection surveillance in neonatal intensive care using specified criteria for neonates. *J Hosp Infect.* 1998;38(1):51-60.
21. Genel F, Atlihan F, Ozsu E, Ozbek, E. Monocyte HLA-DR Expression as predictor of poor outcome in neonates with late onset neonatal sepsis. *J Infect.* 2010;60(3):224-8.
22. Gentile LF, Nacionales DC, Lopez MC, Vanzant E, Cuenca A, Cuenca AG, Ungaro R, Szpila BE, Larson S, Joseph A, Moore FA, Leeuwenburgh C, Baker HV, Moldawer LL, Efron PA. Protective immunity and defects in the neonatal and elderly immune response to sepsis. *J Immunol.* 2014;192(7):3156-65.
23. Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(6):392-404.
24. Gladstone IM, Ehrenkranz RA, Edberg SC, Baltimore RS. A ten-year review of neonatal sepsis and comparison with the previous fifty-year experience. *Pediatr Infect Dis J.* 1990;9(11):819-25.
25. Gold MC, Donnelly E, Cook MS, Leclair CM, Lewinsohn DA. Purified neonatal plasmacytoid dendritic cells overcome intrinsic maturation defect with TLR agonist stimulation. *Pediatr Res.* 2006;60(1):34-7.
26. Gortner L, Tutdibi E. Respiratory disorders in preterm and term neonates – an update on diagnostics and therapy. *Z Geburtshilfe Neonatol.* 2011;215(4):145-51.
27. Guisset O, Dilhuydy MS, Thiébaud R, Lefèvre J, Camou F, Sarrat A, Gabinski C, Moreau JF, Blanco P. Decrease in circulating dendritic cells predicts fatal outcome in septic shock. *Intensive Care Med.* 2007;33(1):148-52.
28. Hallwirth U, Pomberger U, Pollak A, Roth E, Spitter A. Monocyte switch in neonates: high phagocytic capacity and low HLA-DR expression in VLBWI are inverted during gestational aging. *Pediatr Allergy Immunol.* 2004;15(6):513-6.
29. Hallwirth U, Pomberger U, Zaknun D, Szepfalusi Z, Horcher E, Pollak A, Roth E, Spittler A. Monocyte phagocytosis as a reliable parameter for predicting early-onset sepsis in very low birthweight infants. *Early Hum Dev.* 2002;67(1-2):1-9.

30. Haque KN. Definitions of bloodstream infection in the newborn. *Pediatr Crit Care Med.* 2005;6(3 Suppl):S45-9.
31. Hentschel J, de Veer I, Gastmeier P, Rüden H, Obladen M. Neonatal nosocomial infection surveillance: incidences by site and a cluster of necrotizing enterocolitis. *Infection.* 1999;27(4-5):234-8.
32. Höflich C, Döcke WD, Meisel C, Volk HD. Regulatory immunodeficiency and monocyte deactivation assessment based on HLA-DR expression. *Clin Appl Immunol Rev.* 2002;2(6):337-44.
33. Holloway JA, Thornton CA, Diaper ND, Howe DT, Warner JO. Phenotypic analysis of circulating dendritic cells during the second half of human gestation. *Pediatr Allergy Immunol.* 2009;20(2):119-25.
34. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(12):862-74.
35. Huang X, Venet F, Chung CS, Lomas-Neira J, Ayala A. Changes in dendritic cell function in the immune response to sepsis. Cell- & tissue-based therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2007;7(7):929-38.
36. Hunt DW, Huppertz HI, Jiang HJ, Petty RE. Studies of human cord blood dendritic cells: evidence for functional immaturity. *Blood.* 1994;84(12):4333-43.
37. Hynninen M, Pettilä V, Takkunen O, Orko R, Jansson SE, Kuusela P, Renkonen R, Valtonen M. Predictive value of monocyte histocompatibility leukocyte antigen-DR expression and plasma interleukin-4 and -10 levels in critically ill patients with sepsis. *Shock.* 2003;20(1):1-4.
38. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2004;5(10):987-95.
39. Kanakoudi-Tsakalidou F, Debonera F, Drossou-Agakidou V, Sarafidis K, Tzimouli V, Taparkou A, Kremenopoulos G. Flow cytometric measurement of HLA-DR expression on circulating monocytes in healthy and sick neonates using monocyte negative selection. *Clin Exp Immunol.* 2001;123(3):402-7.
40. Kollmann TR, Levy O, Montgomery RR, Goriely S. Innate immune function by Toll-like receptors: distinct responses in newborns and the elderly. *Immunity.* 2012;37(5):771-83.
41. Kovarik J, Siegrist CA. Immunity in early life. *Immunol Today.* 1998;19(4):150-2.
42. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanism and clinical correlates. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(5):379-90.
43. Levy O, Zarembek KA, Roy RM, Cywes C, Godowski PJ, Wessels MR. Selective impairment of TLR-mediated innate immunity in human newborns: neonatal blood plasma reduces monocyte TNF-alpha induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharide, and imiquimod, but preserves the response to R-848. *J Immunol.* 2004;173(7):4627-34.
44. Li DY, Gu C, Min J, Chu ZH, Ou QJ. Maturation induction of human peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells. *Exp Ther Med.* 2012;4(1):131-4.
45. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2001;1(2):135-45.
46. Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H, Reinke P, Volk HD.

- Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180(7):640-8.
47. Meisel C, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(10):775-86.
 48. Monneret G, Finck ME, Venet F, Debard AL, Bohé J, Bienvenu J, Lepape A. The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol Lett.* 2004;95(2):193-8.
 49. Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohé J, Venet F, Debard AL, Thizy H, Bienvenu J, Gueyffier F, Vanhems P. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med.* 2006;32(8):1175-83.
 50. Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention beim Robert Koch-Institut. Empfehlung zur Prävention nosokomialer Infektionen bei neonatologischen Intensivpflegepatienten mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz.* 2007;50:1265-303.
 51. Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen am Institut für Hygiene und Umweltmedizin, Charité-Universitätsmedizin Berlin. Protokoll: Surveillance nosokomialer Infektionen bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht <1.500g. *Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System, Neo-KISS.* 2009. www.nrz-hygiene.de.
 52. Palojärvi A, Andersson S, Turpeinen U, Janér C, Petäjä J. Antenatal betamethasone associated with transient immunodepression in very low birth weight infants. *Neonatology* 2013;104(4):275-82.
 53. Palojärvi A, Petäjä J, Siitonen S, Janér C, Andersson S. Low monocyte HLA-DR expression as an indicator of immunodepression in very low birth weight infants. *Pediatr Research.* 2013;73(4 Pt 1):469-75.
 54. Pérez, A, Bellón, JM, Gurbindo MD, Munoz-Fernandez MA. Impairment of stimulation ability of very-preterm neonatal monocytes in response to lipopolysaccharide. *Human Immunol.* 2010;71(2):151-7.
 55. Pickler R, Brown L, McGrath J, Lyon D, Rattican D, Cheng CY, Howland L, Jallo N. Integrated review of cytokines in maternal, cord, and newborn blood: part II – associations with early infection and increased risk of neurologic damage in preterm infants. *Biol Res Nurs.* 2010;11(4):377-86.
 56. Pisani V, Bizzarri B, Cardi V, Pedicino R, Natale F, Stolfi I, Castronovo A, De Curtis M. Early onset sepsis in very low birth weight newborns infants. *J of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine.* 2012;25 Suppl 3:21-5.
 57. Poehlmann H, Schefold JC, Zuckermann-Becker H, Volk HD, Meisel C. Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Crit Care.* 2009;13(4):R119.
 58. Riccardi F, Della Porta MG, Rovati B, Casazza A, Radolovich D, De Amici M, Danova M, Langer M. Flow cytometric analysis of peripheral blood dendritic cells in patients with severe sepsis. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2011; 80(1):14-21.

59. Romejko-Wolniewicz E, Oleszczuk L, Zareba-Szczudlik J, Czajkowski K. Dosage regimen of antenatal steroids prior to preterm delivery and effects on maternal and neonatal outcomes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2013;26(3):237-41.
60. Schefold JC, Hasper D, Volk HD, Reinke P. Consider delayed immunosuppression into the concept of sepsis. *Crit Care Med.* 2008;36(11):3118.
61. Schefold JC, von Haehling S, Corsepilus M, Pohle C, Kruschke P, Zuckermann H, Volk HD, Reinke P. A novel selective extracorporeal intervention in sepsis: immunoadsorption of endotoxin, interleukin 6, and complement-activating product 5a. *Shock.* 2007;28(4):418-25.
62. Schibler KR, Georgelas A, Rigaa A. Developmental biology of the dendritic cell system. *Acta Paediatr Suppl.* 2002;91(438):9-16.
63. Gázquez Serrano IM, Arroyos Plana A, Díaz Morales O, Herráiz Perea C, Holgueras Bragado A. Antenatal corticosteroid therapy and late preterm infant morbidity and mortality. *An Paediatr.* 2014;81(6):374-82.
64. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(3):151-61.
65. Sohlberg E, Saghafian-Hedengren S, Bremme K, Sverremark-Ekström E. Cord blood monocyte subsets are similar to adult and show potent peptidoglycan-stimulated cytokine responses. *Immunology.* 2011 May;133(1):41-50.
66. Sotiriades A, Makrydimas G, Papatheodorou S, Ioannidis JPA. Corticosteroids for preventing neonatal respiratory morbidity after elective caesarean section at term. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009;(4):CD006614.
67. Stoll BJ, Hansen N. Infections in VLBW infants: studies from the NICHD Neonatal Research Network. *Sem Perinat.* 2003;27(4):293-301.
68. Strohmeyer JC, Blume C, Meisel C, Doecke WD, Hummel M, Hoeflich C, Thiele K, Unbehaun A, Hetzer R, Volk HD. Standardized immune monitoring for the prediction of infections after cardiopulmonary bypass surgery in risk patients. *Cytometry B Clin Cytom.* 2003;53(1):54-62.
69. Strunk T, Currie A, Richmond P, Simmer K, Burgner D. Innate immunity in human newborn infants: prematurity means more than immaturity. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011;24(1):25-31.
70. Tissieres P, Ochoda A, Irene Dunn-Siegrist, Drifte G, Morales M, Pfister R, Berner M, Pugin J. Innate Immune Deficiency of Extremely Premature Neonates can be reversed by interferon- γ . *Plos One.* 2012;7(3):e32863.
71. Vega-Ramos J, Villadangos JA. Consequences of direct and indirect activation of dendritic cells on antigen presentation: Functional implications and clinical considerations. *Mol Immunol.* 2013;55(2):175-8.
72. Velilla PA, Rugeles MT, Chougnet CA. Defective antigen-presenting cell function in human neonates. *Clin Immunol.* 2006;121(3): 251-59.
73. Waßmuth R. Einführung in das HLA-System. *ecomed Medizin, Landsberg/Lech.* 2005; 2. aktualisierte und erweiterte Auflage.
74. Wilms FF, Vis JY, Pattinaja DAPM, Kuin RA, Stam MC, Reuvers JM, Mol BW. Relationship between the time interval from antenatal corticosteroid administration until preterm birth and the occurrence of respiratory morbidity. *Am J Obstet Gynecol.* 2011;205(1):49.e1-7.

Literaturverzeichnis

75. Yerkovich ST, Wikstrom ME, Suriyaarachchi D, Prescott SL, Upham JW, Holt PG. Postnatal development of monocyte cytokine responses to bacterial lipopolysaccharide. *Pediatr Res.* 2007 Nov;62(5):547-52.
76. Ziegler-Heitbroch L. Monocyte subsets in man and other species. *Cell Immunol.* 2014;289(1-2):135-9.

7. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jessy Linn Johanna Porz, geborene Däbritz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Vergleichende Untersuchung der Immunkompetenz Früh- und Reifgeborener anhand der HLA-DR-Expression von Monozyten und dendritischen Zellen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an der erfolgten Publikation

Frau Jessy Linn Johanna Porz, geborene Däbritz, hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation: Joerg C. Schefold, Linn Porz, Barbara Uebe, Holger Poehlmann, Stephan von Haehling, Andreas Jung, Nadine Unterwalder, Christian Meisel "Diminished HLA-DR expression on monocyte and dendritic cell subsets indicating impairment of cellular immunity in pre-term neonates: a prospective observational analysis", Journal of Perinatal Medicine, 2014, October 25 [Epub ahead of print].

Beitrag im Einzelnen: Betreuung der der Publikation zugrundeliegenden Studie als Doktorandin mit Erhebung sämtlicher klinischer Daten, Aufbereitung, Messung und Auswertung der gewonnenen Patientenproben, eigenständigem Erstellen der Datenbank, Teilaspekten der statischen Auswertung, Dokumentation des Studien-Follow-ups und Literaturrecherche.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

8. Lebenslauf

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

9. Publikation

Joerg C. Schefold, Linn Porz, Barbara Uebe, Holger Poehlmann, Stephan von Haehling, Andreas Jung, Nadine Unterwalder, Christian Meisel. "Diminished HLA-DR expression on monocyte and dendritic cell subsets indicating impairment of cellular immunity in pre-term neonates: a prospective observational analysis". **Journal of Perinatal Medicine**; 2014, October 25 [Epub ahead of print].

10. Danksagung

„Was lange währt, wird endlich gut.“ (Ovid).

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Hans-Dieter Volk für die Überlassung des Themas bedanken. Mein Dank gilt weiterhin im Besonderen meinem Arbeitsgruppenleiter, Herrn Dr. Christian Meisel, der durch seine stets kompetente Betreuung und seinen vertrauensvollen Rückhalt auch in schwierigen Phasen meiner Promotion über all die Jahre ganz wesentlich zum Erfolg meiner Arbeit beigetragen hat. Bei Herrn PD Jörg Christian Schefold bedanke ich mich für seine Unterstützung bei der Publikation meiner Arbeit.

Vor allem gilt meine uneingeschränkte Dankbarkeit meiner Familie, mit deren Unterstützung und bedingungslosem Vertrauen ich die nötige Ausdauer zur Fertigstellung meiner Arbeit aufbringen konnte. Insbesondere meinem Bruder, Dr. Henry Däbritz und meinem Mann, Dr. Dennis Porz danke ich einerseits für die stets konstruktiven Diskussionen, andererseits und in besonderem Maße aber auch für die fortdauernde emotionale Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Promotion.