

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Patienten:

Das mittlere Gestationsalter aller Frühgeborenen betrug 30 (24 – 31) Schwangerschaftswochen, bei Reifgeborenen betrug das mittlere Gestationsalter 39 SSW (38 – 41) (Tab.1).

30 Kinder wurden spontan entbunden, 21 Kinder per Sectio. Bei der Datenanalyse ergaben sich keine Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Entbindungsmodi.

	Frühgeborene		Reifgeborene		Erwachsene
	n	GA (SSW)	n	GA (SSW)	n
CD14 Expression auf Monozyten und	10	30 - 31 (31)	10	38 - 41 (39)	12
auf PNG	10	30 - 31 (31)	10	38 - 41 (39)	12
CD11b auf PNG	10	27 - 31 (29)	15	38 - 41 (39)	17
CD11b nach Blockierung von CD14	3	FG1: 28 FG2: 29 FG3: 30	10	38 - 41 (39)	5
CD11b Expression nach CD14- unabh. Stimulation	4	29 - 31(30)	5	38 - 40 (39)	7

**Tabelle 1:** Anzahl (n) und Gestationsalter (GA) in SSW der Neugeborenen (FG=Frühgeborene; RG=Reifgeborene) und Erwachsenen (ER) getrennt für die einzelnen Experimente, in Klammern der Median.

## 5.2 Expressionsdichte des Membranrezeptors CD14

Um zu untersuchen, ob bei Frühgeborenen weniger CD14 als bei Reifgeborenen und Erwachsenen exprimiert wird, wurde die Expressionsdichte auf ruhenden und stimulierten Monozyten und PNG gemessen.

### 5.2.1 Vorversuche zur Stimulation der CD14 Expression auf Monozyten durch LPS

Bei Reifgeborenen und Erwachsenen wurden Vorversuche zur LPS Stimulation von Monozyten durchgeführt. Dosis-Wirkungsexperimente zeigten, dass bereits mit 2ng/ml LPS die maximale Expressionsdichte erreicht war und höhere LPS Dosen diese nicht mehr weiter steigern konnten (Tab. 2).

Vorversuche über den Einfluss der Inkubationszeit zeigten, dass nach einer 1 Stunde bereits eine maximale Stimulation erreicht war, die sich durch längere Inkubationsdauer nicht mehr steigern ließ (Tab. 3).

### CD14-Expression auf Monozyten

	nativ	0.2 ng/ml	2 ng/ml	20 ng/ml	200 ng/ml	2000 ng/ml
Reifgeborene	24,2	36,0	36,4	36,2	35,0	35,7
SD	±11,0	±17,6	±18,4	±17,6	±17,5	±18,0
Erwachsene	33,8	49,9	51,1	49,7	50,1	50,7
SD	±8,5	±12,3	±11,5	±12,5	±11,9	±11,2

**Tabelle 2:** Expression von CD14 auf Monozyten von Reifgeborenen (n=5) und Erwachsenen (n=7) nach Stimulation mit ansteigenden Konzentrationen von LPS. Expression ist angegeben als mittlere Fluoreszenz des Antikörpers anti-CD14 (LeuM3) und Standardabweichung

### CD14-Expression auf Monozyten

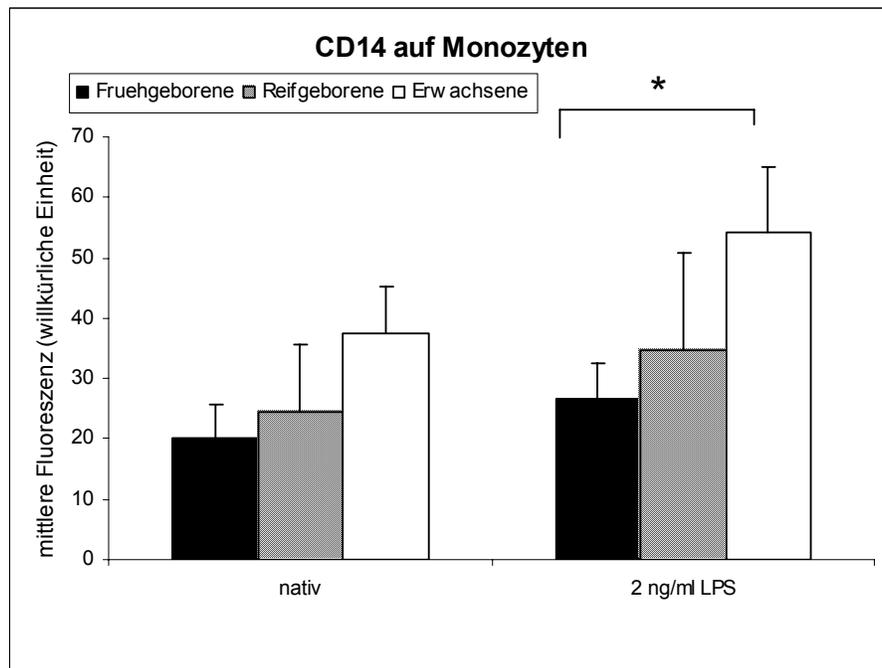
	1 Stunde	2 Stunden	4 Stunden
Reifgeborene	34,1 ±13	33,0 ±15	24,5 ±19
Erwachsene	45,8 ±10	44,0 ±13	31,6 ±25

**Tabelle 3:** Expression von CD14 auf Monozyten von Reifgeborenen (n=3) und Erwachsenen (n=3) nach Stimulation mit 2 ng/ml LPS und ansteigender Inkubationszeit. Die CD14-Expression ist angegeben als mittlere Fluoreszenz des Antikörpers anti-CD14 (LeuM3) und Standardabweichung. Nach 8 und 12 Stunden war es zu fortgeschrittener Lyse gekommen, dass die Messung keine Aussagekraft mehr hatte.

Aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche wurde die LPS Stimulation auf Monozyten mit 2 ng/ml LPS und einer Inkubationszeit von 1 Stunde durchgeführt

#### 5.2.2 Die CD14 Expression war auf ruhenden und stimulierten Monozyten Frühgeborener reduziert

Auf ruhenden, nativen Monozyten von Frühgeborenen war die CD14 Expression geringer als von Reifgeborenen und Erwachsenen ( Frühgeborene, n=10: 20,0 ± 5,7; Reifgeborene, n=10: 24,5 ±11,1; Erwachsene, n=12: 37,4 ± 7,78). Die Expressionszunahme nach Stimulation mit 2 ng/ml LPS war bei Frühgeborenen deutlich verringert (Frühgeborene, n=10: 26,6 ± 5,9; Reifgeborene, n=10: 34,8 ± 15,9; Erwachsene, n=12: 54,1 ± 11,0). (Abb. 6)



**Abb. 6:** Expression von CD14 auf Monozyten von Frühgeborenen (schwarze Balken, n= 10), Reifgeborenen (gestreifte Balken, n=10) und Erwachsenen (weiße Balken, n=12) nativ und nach Stimulation mit 2 ng/ml LPS über 1 Stunde. Die Expression ist angegeben als mittlere Fluoreszenz des Antikörpers anti-CD14 (LeuM3) und Standardabweichung, (\* p < 0,05).

### 5.2.3 Vorversuche zur Stimulation der CD14 Expression auf PNG durch LPS

Bei Reifgeborenen und Erwachsenen wurden Vorversuche zur LPS Stimulation von PNG durchgeführt. Dosis-Wirkungsexperimente zeigten, dass bereits mit 2ng/ml LPS die maximale Expressionsdichte erreicht war und höhere LPS Dosen diese nicht mehr weiter steigern konnten (Tab. 4).

Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde war bereits eine maximale Stimulation erreicht, die sich durch längere Inkubationsdauer nicht mehr steigern ließ (Tab. 5)

**CD14-Expression auf PNG**

	nativ	0,2 ng/ml	2 ng/ml	20 ng/ml	200 ng/ml	2000 ng/ml
Reifgeborene	0,42 ± 0,21	0,57 ± 0,41	0,59 ± 0,43	0,57 ± 0,40	0,55 ± 0,37	0,55 ± 0,38
Erwachsene	0,42 ± 0,07	0,54 ± 0,06	0,57 ± 0,06	0,57 ± 0,10	0,58 ± 0,10	0,56 ± 0,10

**Tabelle 4:** Expression von CD14 auf PNG von Reifgeborenen (n = 10) und Erwachsenen (n = 12) nach Stimulation mit ansteigenden Konzentrationen LPS. Expression ist angegeben als mittlere Fluoreszenz des Antikörpers anti-CD14 (LeuM3) und Standardabweichung.

**CD14-Expression auf PNG**

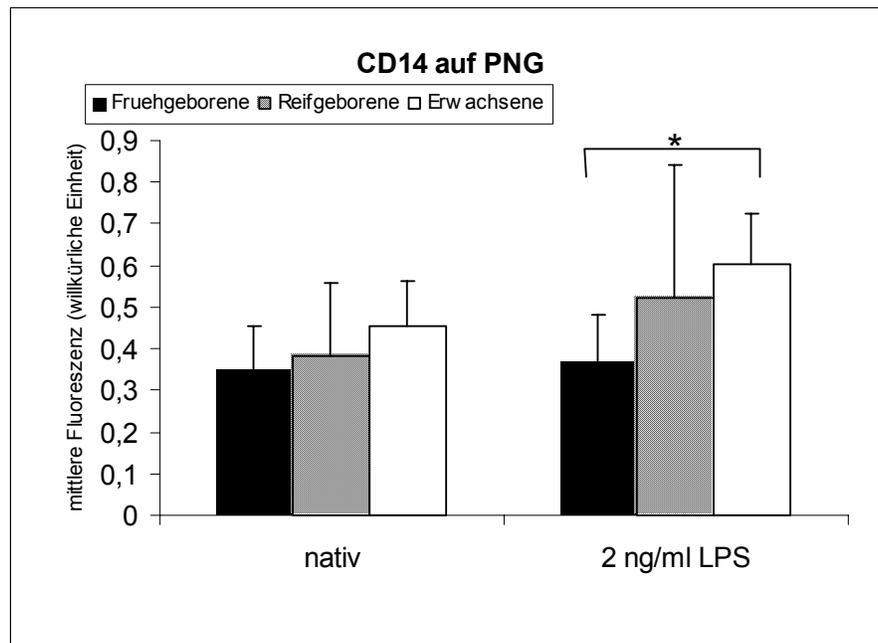
	1 Stunde	2 Stunden	4 Stunden
Reifgeborene	0,51 ± 0,32	0,58 ± 0,40	0,41 ± 0,39
Erwachsene	0,56 ± 0,05	0,60 ± 0,11	0,45 ± 0,35

**Tabelle 5:** Expression von CD14 auf PNG Reifgeborener (n = 3) und Erwachsener (n=3) nach Stimulation mit 2 ng/ml LPS. Expression ist angegeben als mittlere Fluoreszenz des Antikörpers anti-CD14 (LeuM3) und Standardabweichung.

Aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche wurde die LPS Stimulation auf PNG mit 2 ng/ml LPS und einer Inkubationszeit von 1 Stunde durchgeführt.

#### 5.2.4 Die CD14 Expression war auf ruhenden und stimulierten PNG Frühgeborener reduziert.

Die CD14-Expression auf PNG betrug nur etwa 1/10 der CD14-Expression auf Monozyten. Auf ruhenden PNG von Frühgeborenen war die CD14 Expression geringer als von Reifgeborenen und Erwachsenen (Frühgeborene, n=10:  $0,35 \pm 0,10$ ; Reifgeborene, n=10:  $0,38 \pm 0,17$ ; Erwachsene, n=12:  $0,45 \pm 0,10$ ). Die Expression nach Stimulation mit 2ng/ml LPS war bei Frühgeborenen reduziert (Frühgeborene, n=10:  $0,41 \pm 0,13$ ; Reifgeborene, n=10:  $0,5 \pm 0,32$ ; Erwachsene, n=12:  $0,58 \pm 0,12$ ). (Abb.7)



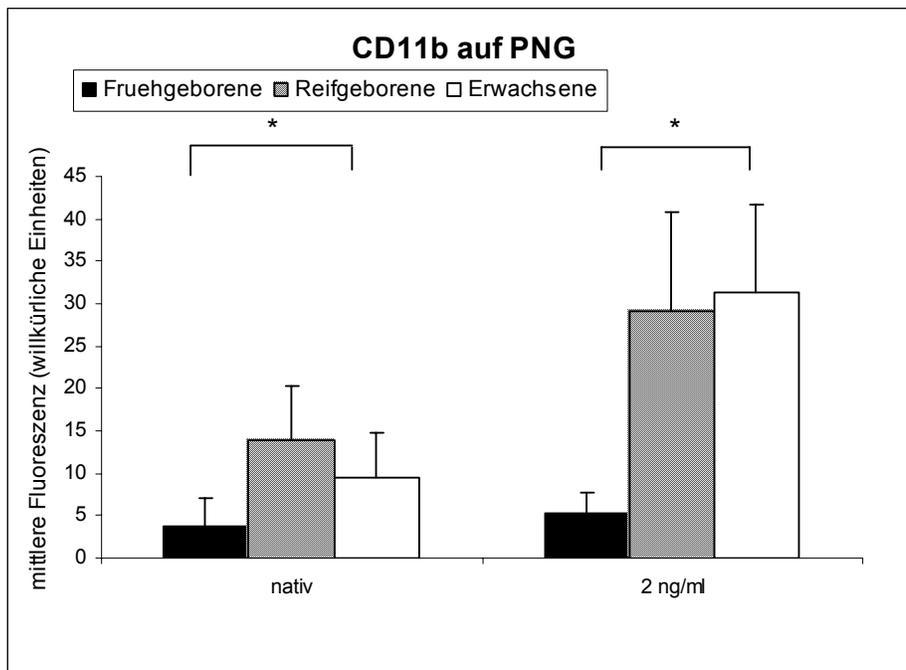
**Abb. 7:** Expression von CD14 auf PNG Frühgeborener (schwarze Balken, n=10), Reifgeborener (gestreifte Balken, n=10) und Erwachsener (weiße Balken, n=12) nativ und nach Stimulation mit 2 ng/ml LPS über 1 Stunde. Expression ist angegeben als mittlere Fluoreszenz des Antikörpers anti-CD14 (LeuM3) und Standardabweichung; (\* p < 0,05).

### 5.3 Die Expressionsdichte des Membranrezeptors CD11b.

Als zweiten wichtigen Rezeptor in der angeborenen Immunreaktion auf LPS wurde CD11b auf PNG untersucht.

#### 5.3.1 Die CD11b Expression war auf ruhenden und stimulierten PNG Frühgeborener reduziert.

Auf ruhenden PNG von Frühgeborenen war die CD11b Expression geringer als von Reifgeborenen. (Frühgeborene, n=10:  $3,8 \pm 3,4$ ; Reifgeborene, n=15:  $13,8 \pm 6,6$ ; Erwachsene, n=17:  $9,5 \pm 5,2$ ). Die Expressionszunahme nach Stimulation mit 2ng/ml LPS war bei Frühgeborenen reduziert (Frühgeborene, n=10:  $5,3 \pm 2,3$ ; Reifgeborene, n=15:  $29,1 \pm 11,8$ ; Erwachsene, n=17:  $31,3 \pm 10,4$ ). (Abb. 8)



**Abb. 8:** Expression von CD11b auf PNG Frühgeborener (schwarzer Balken, n = 10), Reifgeborenen (gestreifter Balken, n = 15) und Erwachsenen (weißer Balken, n = 17) nativ und nach Stimulation mit 2 ng/ml LPS über 1 Stunde. Expression ist angegeben als mittlere Fluoreszenz des Antikörpers anti-CD11b (Leu15) und Standardabweichung; (\* p < 0,05).

#### **5.4 Die CD14-vermittelte Hochregulation der CD11b Expression**

Um die Abhängigkeit der CD11b Hochregulation von CD14 zu untersuchen, wurde CD14 mit einem anti-CD14 Antikörper (MY4), der die LPS Bindungsstelle besetzt, blockiert.

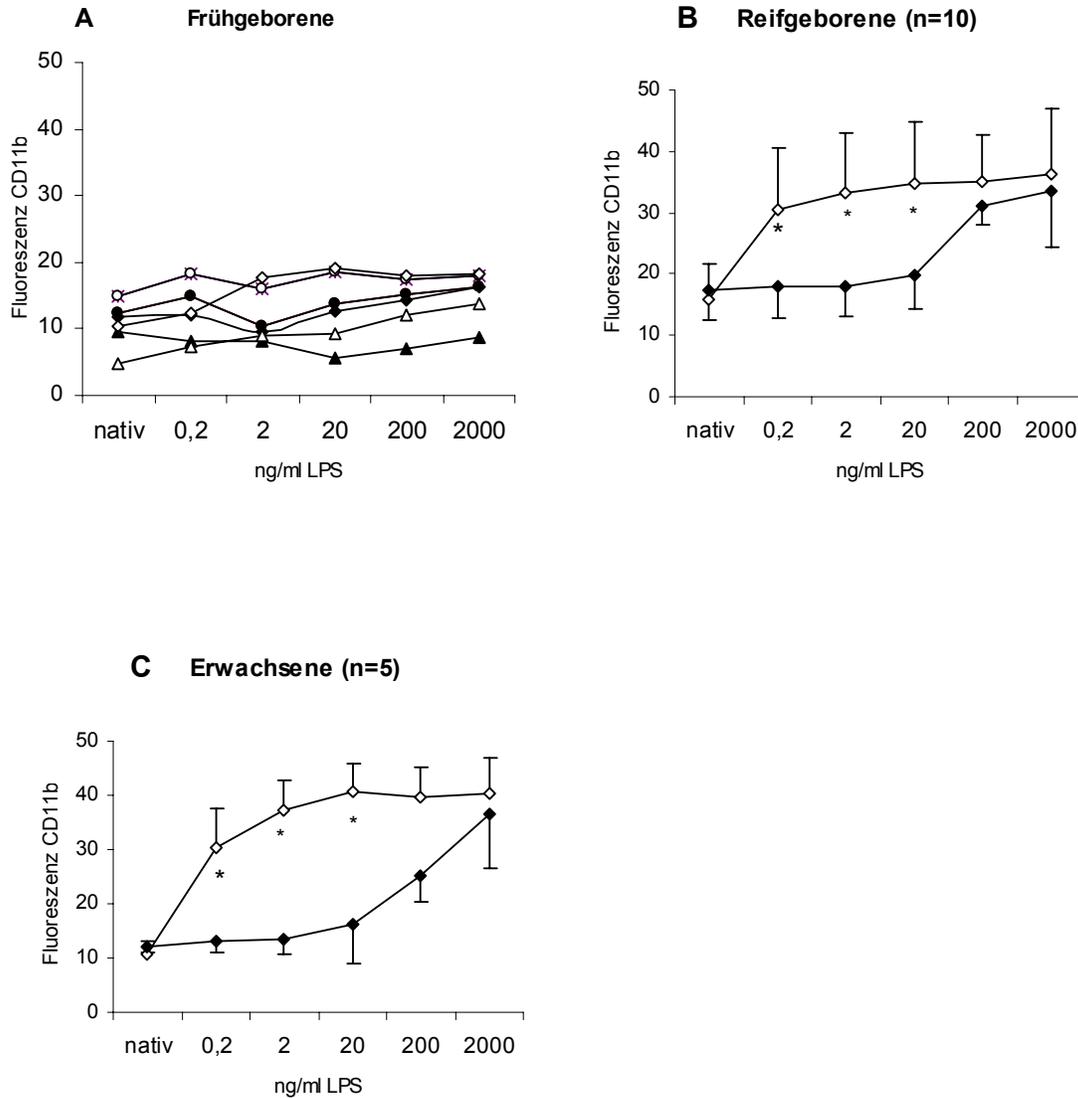
Sowohl die CD11b Hochregulierung bei Erwachsenen (n=5), als auch die bei Reifgeborenen (n=10) ließ sich durch die Blockierung von CD14 bei einer LPS Konzentration bis 20 ng/ml vollständig verhindern. Bei einer höheren Stimulationskonzentration von 200 ng/ml und 2000ng/ml LPS stieg die CD11b Expression an. Bei Frühgeborenen (n=3) gab es keinen signifikanten Unterschied aufgrund der bereits geringen Stimulierbarkeit ohne Blockierung. Ein Vergleich zwischen den Nativwerten mit und ohne Blockierung schloss eine Stimulation durch den anti-CD14 Antikörper aus (Abb. 9 bis 11).

#### **5.5 CD14 unabhängige Stimulation**

Die Frage, ob die verminderte CD11b Expression und Stimulierbarkeit bei Frühgeborenen die Folge der reduzierten CD14 Expression war, wurde versucht zu klären, indem die Zellen aller drei Altersgruppen mit unterschiedlichen Substanzen stimuliert wurden, die unabhängig von CD14 auf verschiedenen Ebenen der Signaltransduktion eingreifen.

##### **5.5.1 Vorversuche zu CD14 unabhängigen Stimulanzen**

Bei Erwachsenen wurden Vorversuche zu den CD14 unabhängigen Stimulanzen durchgeführt. Die entsprechenden Stimulationskonzentrationen wurde der Literatur entnommen. Zusätzlich wurden orientierende Konzentrationskinetiken durchgeführt, die die Werte der Literatur bestätigten (Tab.6)



**Abb. 9 – 11:** Expression von CD11b auf PML von 3 Frühgeborenen (angegeben sind CD11b Expression jedes Einzelnen; ▲=FG1 28 SSW; ◆=FG2 29 SSW; ●=FG3 30 SSW), Reifgeborenen (n=10) und Erwachsenen (n=5) ohne vorherige Blockierung (offene Symbole) und mit Blockierung durch anti-CD14 Antikörper (My4, gefüllte Symbole) nach Stimulation mit den angegebenen Konzentrationen LPS. Für die Reifgeborenen und Erwachsenen ist die Expression angegeben als Mittelwert der mittleren Fluoreszenz des Antikörpers anti-CD11b (Leu15); \* p<0,05.

**CD11b-Expression**

	Konzentration	mittlere Fluoreszenz	
		Erwachsener 1	Erwachsener 2
<b>PMA ng/ml</b>	1.000	20,1	39,5
	100	69,3	81,7
	10	20,4	30,2
<b>FMLP nMol</b>	100	8,9	12,9
	10	29,5	33,9
<b>TNF ng/ml</b>	100	24,7	27,5
	10	23,9	28,9
<b>nativ</b>		6,8	11

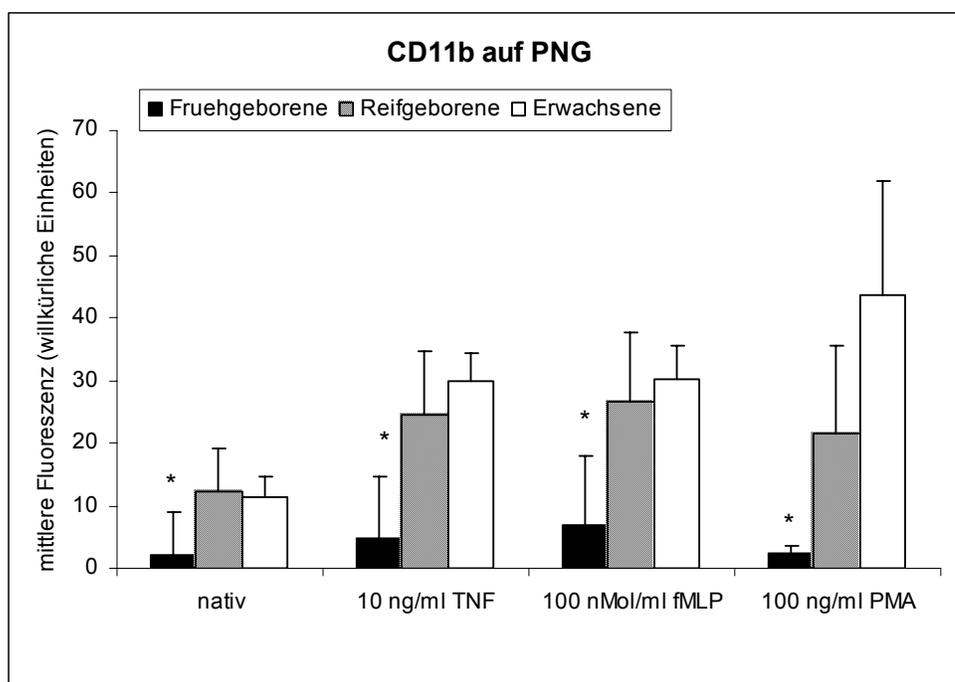
**Tabelle 6:** Vorversuch zur CD14 unabhängigen Stimulation. Expression von CD11b auf PNG von 2 Erwachsenen nativ und nach Stimulation mit PMA, FMLP und TNF $\alpha$  in den angegebenen Konzentrationen über 1 Stunde. Expression ist angegeben als mittlere Fluoreszenz des Antikörpers anti-CD11b (Leu15).

### **5.5.2 Die CD11b Expression nach Stimulation mit TNF $\alpha$ und FMLP war auf PNG Frühgeborener reduziert.**

Die Stimulation mit 10ng/ml TNF $\alpha$  und 100 nMol/ml FMLP erbrachte für Reifgeborene und Erwachsene vergleichbare Ergebnisse. Beide Altersgruppen zeigten eine Zunahme in der CD11b Expression gegenüber der Kontrollgruppe ohne Stimulation. Die PNG von Frühgeborenen reagierten auf die Stimulation nur reduziert (Erwachsene, n=7; Kontrolle:  $11,3 \pm 3,3$ ; TNF:  $29,8 \pm 4,6$ ; FMLP  $30,3 \pm 5,4$ ; Reifgeborene, n=5; Kontrolle:  $12,4 \pm 6,8$ ; TNF:  $24,6 \pm 10,1$ ; FMLP:  $26,7 \pm 11,0$ ; Frühgeborene, n=4: Kontrolle:  $2,2 \pm 1,3$ ; TNF:  $4,6 \pm 2,5$ ; FMLP:  $7,3 \pm 4,7$ ). (Abb. 12)

### 5.5.3 Die CD11b Expression nach Stimulation mit PMA war auf PNG von Reifgeborenen und Frühgeborenen reduziert.

Die Stimulation mit 100 ng/ml PMA erbrachte für alle drei Altersgruppen unterschiedliche Ergebnisse. Reifgeborene exprimierten weniger CD11b als Erwachsene, Frühgeborene exprimierten weniger als Reifgeborene (Frühgeborene, n=4:  $2,4 \pm 1,3$ ; Reifgeborene, n=5:  $21,6 \pm 13,9$ ; Erwachsene, n=7:  $43,8 \pm 18,2$ ). (Abb. 12)



**Abb. 12:** Expression von CD11b auf PNG Frühgeborener (schwarze Balken, n=4), Reifgeborener (gestreifte Balken, n=5) und Erwachsener (weiße Balken, n=7) nach Stimulation mit den angegebenen Substanzen über 1 Stunde. Expression ist angegeben als mittlere Fluoreszenz des Antikörpers anti-CD11b (Leu15) und Standardabweichung; (\* p < 0,05 FG im Vergleich zu RG und ER).

## **5.6 Die Serumkonzentration von löslichen Faktoren.**

Neben den membranösen Faktoren wurden auch lösliche Faktoren der PNG Aktivierung untersucht. IL-8 als gut untersuchten und sensitiven Stimulationsparameter und PML-Elastase als PNG spezifisches Sekretionsprodukt.

### **5.6.1 PML- Elastase Konzentration war bei Frühgeborenen niedriger.**

Innerhalb einer Stunde nach Stimulation wird PML-Elastase von PNG sezerniert <sup>48</sup>. Die Serumkonzentration von PML-Elastase war bei Frühgeborenen niedriger als bei Reifgeborenen und Erwachsenen (Frühgeborene, n=8: <30ng/ml; Reifgeborene, n=8: 31,2 ng/ml  $\pm$ 10,1 ng/ml; Erwachsene, n=7: 41,3 ng/ml  $\pm$ 22,7 ng/ml). Nach Stimulation mit 2 ng/ml LPS kam es zu einem deutlichen Konzentrationsanstieg bei Erwachsenen, bei Reifgeborenen war dies etwas vermindert. Zu keinem nachweisbaren Konzentrationsanstieg kam es bei Frühgeborenen (Frühgeborene: <30 ng/ml; Reifgeborene: 63,9 ng/ml  $\pm$ 49,1 ng/ml; Erwachsene: 83,2 ng/ml  $\pm$ 20,1 ng/ml) (Tab. 7).

### **5.6.2 IL-8 Konzentration war nach Stimulation bei Frühgeborenen niedriger.**

Die IL-8-Serumkonzentration war bei allen drei Altersgruppen unterhalb der Nachweisgrenze des ELISA (<0,02 ng/ml). Nach Stimulation mit 2 ng/ml LPS nahm sie in allen drei Altersgruppen zu. Dabei war die IL-8 Konzentration bei Frühgeborenen niedriger als bei Reifgeborenen und Erwachsenen (Frühgeborene, n=8: 0,25  $\pm$  0,19; Reifgeborene, n=14: 0,72  $\pm$  0,41; Erwachsene, n=9: 0,46  $\pm$  0,2) (Tab. 8).

LPS (ng/ml)	PML Elastase (ng/ml)		
	Frühgeborene n = 5	Reifgeborene n = 5	Erwachsene n = 5
0	< 30	31,3 ± 9,8	38,9 ± 22,7
2	< 30*	75,1 ± 49,1	80,5 ± 20,1

**Tabelle 7:** Konzentration von PML Elastase im Vollblut von Frühgeborenen, Reifgeborenen und Erwachsenen mit und ohne Stimulation von 2 ng/ml LPS über 1 Stunde. Konzentration ist angegeben in ng/ml, die untere Nachweisgrenze des ELISA war 30 ng/ml. Die Werte sind als Median mit dem Bereich angegeben; (\* p < 0,05 Frühgeborene verglichen mit Reifgeborenen und Erwachsenen).

LPS (ng/ml)	IL-8 (ng/ml)		
	Frühgeborene n = 8	Reifgeborene n = 14	Erwachsene n = 9
0	< 0,02	< 0,02	< 0,02
2	0,3 ± 0,2	0,7 ± 0,4	0,5 ± 0,2

**Tabelle 8:** Konzentration von IL-8 im Vollblut von Frühgeborenen, Reifgeborenen und Erwachsenen mit und ohne Stimulation von 2 ng/ml LPS über 1 Stunde. Konzentration ist angegeben in ng/ml, die untere Nachweisgrenze des ELISA war 0,02 ng/ml. Die Werte sind als Median mit dem Bereich angegeben.