

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. Michael Zemlin

**Objektivierung der fetalen Immunantwort durch die Serumkonzentrationen  
verschiedener Zytokine im fetalen Blut Frühgeborener aus Sri Lanka  
nach vorzeitigem Blasensprung in der Schwangerschaft**

***Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät***

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2024

vorgelegt von Anne Schreiber  
geb. am 06.05.1992 in Grünstadt

**Dekan der medizinischen Fakultät:** Prof. Dr. med. dent. M. Hannig

***Supervisoren:***

Dr. med. Thushari Gomes (*Betreuerin*)

Prof. Dr. med. Michael Zemlin (*Doktorvater*)

**1. Gutachter:** Prof. Dr. med. Michael Zemlin

**2. Gutachter:** Prof. Dr. rer. nat. Martina Sester

**Datum der Disputation:** 12.12.2024



# Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abkürzungsverzeichnis.....  | 6  |
| 1. Zusammenfassung .....  | 9  |
| 2. Einleitung .....   | 13 |
| 2.1 Frühgeburt.....   | 13 |
| 2.1.1 Besonderheiten in der Perinatalperiode.....   | 13 |
| 2.1.2 Neonatologische Komplikationen.....   | 14 |
| 2.1.3 Ursachen der Frühgeburtlichkeit sowie nachfolgender Komplikationen .....                                    | 16 |
| 2.2 Vorzeitiger Blasensprung .....  | 17 |
| 2.2.1 Ätiopathogenese und Komplikationen.....   | 17 |
| 2.2.2 Bakterielle Vaginose und ascendierende Infektionen.....   | 18 |
| 2.2.3 Amnioninfektionssyndrom und Fetal Inflammatory Response Syndrome.....                                       | 19 |
| 2.2.4 Neugeborenenensepsis.....   | 22 |
| 2.3 Zytokine .....  | 23 |
| 2.3.1 Funktion und Wirkweise.....   | 23 |
| 2.3.2 Zytokine in der Schwangerschaft.....  | 31 |
| 2.3.3 Zytokine im kindlichen Organismus .....   | 32 |
| 2.4 Einfluss ascendierender Infektionen auf Zytokinhaushalt, Schwangerschaftsverlauf und die Neonatalperiode..... | 34 |
| 2.5 Entwicklung der Fragestellung .....   | 36 |
| 3. Material und Methoden.....   | 38 |
| 3.1 Patientenauswahl und Gewinnung der Blutproben.....  | 38 |
| 3.2 Materialien .....   | 43 |
| 3.2.1 Lösungen, Puffer, Kits .....  | 43 |
| 3.2.2 Gerätschaften.....  | 43 |
| 3.3 Methoden.....   | 44 |
| 3.3.1 Konservierung der Blutproben .....  | 44 |
| 3.3.2 Proben- und Reagenzienvorbereitung .....  | 44 |

|  |     |
|--|-----|
| 3.3.3 Luminex-System.....  | 45  |
| 3.3.4 Messung der Zytokinkonzentration .....   | 46  |
| 3.3.5 Statistische Auswertung .....  | 47  |
| 4. Ergebnisse .....  | 49  |
| 4.1 Zytokinkonzentrationen im fetalen Nabelschnurblut nach PROM.....   | 49  |
| 4.1.1 IL-10.....   | 51  |
| 4.1.2 MCP-3.....   | 52  |
| 4.1.3 GM-CSF .....   | 53  |
| 4.1.4 IL-1 $\beta$ .....   | 54  |
| 4.1.5 Übrige Zytokine (G-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-12P40, IP-10, MCP-1, MIP- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )..... | 55  |
| 4.2 Zytokinexpression je nach Geburtsmodus.....  | 55  |
| 4.2.1 Kontrollkollektiv .....  | 56  |
| 5. Diskussion.....   | 59  |
| 5.1 Rolle verschiedener Zytokine bei Infektion/Inflammation, Frühgeburt und vorzeitigem Blasensprung.....                              | 59  |
| 5.2 Zusammenhang verschiedener Zytokine mit neonatologischen Komplikationen .....  | 70  |
| 5.3 Vergleichbarkeit der Zytokinkonzentrationen in Fruchtwasser und Nabelschnurblut ...  | 74  |
| 5.4 Interleukin-6 im Nabelschnurblut.....  | 75  |
| 5.5 Einfluss verschiedener maternaler, fetaler und äußerer Faktoren auf den Zytokinhaushalt.....                                       | 77  |
| 6. Interpretation und Ausblick .....   | 85  |
| 7. Anhang.....   | 88  |
| 7.1 Tabellenverzeichnis .....  | 88  |
| 7.2 Abbildungsverzeichnis .....  | 88  |
| 8. Literaturverzeichnis .....  | 90  |
| 9. Danksagung .....  | 100 |
| 10. Curriculum vitae .....   | 102 |

## Abkürzungsverzeichnis

|        |   |
|--------|---|
| AIS    | Amnioninfektionssyndrom                             |
| ANS    | Atemnotsyndrom                                      |
| BPD    | Bronchopulmonale Dysplasie                          |
| CCR2   | C-C chemokine receptor type 2                       |
| CD     | Cluster of differentiation                          |
| CRP    | C-reaktives Protein                                 |
| CS     | Cesarean section                                    |
| CSF-2R | Colony Stimulating Factor 2 Receptor                |
| CTG    | Cardiotocographie                                   |
| ELISA  | Enzyme-linked Immunosorbent Assay                   |
| EDTA   | Ethylendiamintetraacetat                            |
| FIRS   | Fetal inflammatory response syndrome                |
| GA     | Gestationsalter                                     |
| GBS    | Gruppe B Streptokokken                              |
| G-CSF  | Granulocyte colony-stimulating factor               |
| GDM    | Gestationsdiabetes mellitus                         |
| Ggf.   | Gegebenenfalls                                      |
| GM-CSF | Granulocyte-macrophage colony-stimulating<br>factor |
| HCA    | Histologische Chorioamnionitis                      |
| HIE    | Hypoxisch-ischämische Enzephalopathie               |
| ICU    | Intensive Care Unit                                 |
| IFN-   | Interferon-   |

|        |  |
|--------|--|
| IL-    | Interleukin-   |
| IL-1RA | Interleukin-1-Rezeptorantagonist                       |
| IL-6R  | Interleukin-6-Rezeptor                                 |
| IP-10  | Interferon-gamma induced protein 10                    |
| IUGR   | Intrauterine growth restriction                        |
| IVH    | Intraventrikuläre Hämorrhagie                          |
| JAK2   | Janus-Kinase 2   |
| MAP    | Mitogen-activated protein                              |
| MAPK   | Mitogen-activated protein-Kinase                       |
| MCP-   | Monocyte chemotactic protein                           |
| MIAC   | Microbial Invasion of the Amniotic Cavity              |
| MIP-   | Macrophage inflammatory protein-1                      |
| MMP    | Matrix-Metallopeptidasen                               |
| mRNA   | messenger Ribonucleic acid                             |
| NEK    | Nekrotisierende Enterokolitis                          |
| NLRP3  | NOD-like receptor family, pyrin domain containing<br>3 |
| PDGF   | Platelet-derived growth factor                         |
| PG     | Prostaglandin  |
| PIH    | Pregnancy-induced hypertension                         |
| PI3K   | Phosphoinositid-3-Kinasen                              |
| PTB    | Preterm birth  |
| PTL    | Preterm labour   |
| PVL    | Periventrikuläre Leukomalazie                          |
| PROM   | Premature rupture of membranes                         |

|        |  |
|--------|--|
| RANTES | Regulated on activation, normal T cell<br>expressed and secreted |
| SGA    | Small for gestational age  |
| SSW    | Schwangerschaftswoche  |
| STAT5  | Signal transducer and activator of<br>transcription 5            |
| SVD    | Spontaneous vaginal delivery                                     |
| TIMP   | Tissue Inhibitor of Metalloprotease                              |
| TNF-   | Tumornekrosefaktor-  |
| VEGF   | Vascular Endothelial Growth Factor                               |

# 1. Zusammenfassung

Trotz des medizinischen Fortschritts bleibt die Frühgeburt eine der Hauptursachen sowohl für die perinatale Morbidität als auch für die Mortalität und stellt somit immer noch ein bedeutendes und je nach Nation mehr oder weniger präsentenes soziales und wirtschaftliches Problem dar.

Die Frühgeburtenrate wird durch vaginale und ascendierende Infektionen deutlich erhöht, wobei der vorzeitige Blasensprung sowohl Ursache als auch Komplikation einer solchen Infektion sein kann. Den hierbei involvierten Zytokinen kommt eine zentrale Bedeutung bei der Genese der Frühgeburt zu. Doch nicht nur die Schwangerschaft, sondern auch die weitere Entwicklung des Neonaten kann durch ein entsprechendes Ungleichgewicht der Zytokine nachhaltig beeinträchtigt werden. Manche dieser Proteinzellregulatoren sind bereits Bestandteil diagnostischer Methoden und andere lassen weiterhin Aussicht auf einen Ansatz sowohl im Rahmen der Präventivdiagnostik als auch im therapeutischen Bereich.

Häufig haben in der Vergangenheit Untersuchungen des Fruchtwassers, jedoch weniger des fetalen Blutes im Sinne einer Objektivierung der fetalen Immunantwort stattgefunden. Genau diese kann jedoch in Anbetracht von Komplikationen in der Neonatalperiode durchaus von Bedeutung sein, insbesondere wenn der Geburt pathologische Prozesse, wie beispielsweise ein vorzeitiger Blasensprung vorausgegangen sind.

Um den postnatalen Verlauf sowohl besser einschätzen als auch gegebenenfalls positiv beeinflussen zu können, sind demnach weitere Untersuchungen der fetalen Immunantwort notwendig, weshalb im Rahmen dieser Arbeit eine ganze Reihe verschiedener pro- und antiinflammatorischer Zytokine im fetalen Nabelschnurblut Frühgeborener aus Sri Lanka mit vorzeitigem Blasensprung analysiert wurden. Hierzu gehören G-CSF, GM-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12P40, IFN- $\gamma$ , IP-10, MCP-1, MCP-3, MIP- $\alpha$  sowie TNF- $\alpha$ .

Das gesamte Kollektiv umschloss 129 Frühgeborene aus Sri Lanka, wovon 60 der PROM- und 69 der Kontrollgruppe zugeordnet werden konnten. Das Gestationsalter lag hierbei im Bereich von 28 bis 36 vollendeten Schwangerschaftswochen. Hinsichtlich des Geschlechts der Neonaten zeigte sich eine nahezu gleichmäßige Verteilung zwischen männlich und weiblich. Innerhalb der Kontrollgruppe haben 22 Frauen vaginal und 47 per Sectio entbunden.

Als Untersuchungsmedium wurde umgehend nach der Geburt Nabelschnurblut zur Analyse gewonnen, welche nach entsprechender Proben- und Reagenzienvorbereitung mithilfe der Luminex Multiplex Assay erfolgte. Die gemessenen Zytokinkonzentrationen wurden

anschließend auf einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem Vorhandensein eines vorzeitigen Blasensprungs in der Schwangerschaft untersucht.

Die vier Zytokine IL-10, GM-CSF, MCP-3 und IL-1 $\beta$  haben das Signifikanzniveau von 5% ( $p < 0,05$ ) in unterschiedlichem Maß unterschritten. Bei IL-10 konnte der deutlichste Unterschied zwischen den Kollektiven festgestellt werden ( $p = 0,003$ ), gefolgt von MCP-3 ( $p = 0,019$ ), GM-CSF ( $p = 0,023$ ) und IL-1 $\beta$  ( $p = 0,033$ ). Weiterhin hat man die jeweiligen Zytokinkonzentrationen als Maß der Immunantwort bei vaginaler Entbindung und Entbindung per Sectio, hinsichtlich des Gestationsalters bei Geburt sowie des Geschlechts der Neonaten betrachtet und auf statistisch signifikante Zusammenhänge untersucht. Lediglich bei Betrachtung des Geburtsmodus konnten signifikante Unterschiede festgestellt und die Nullhypothese bei MCP-1 ( $p = 0,037$ ) sowie IL-10 ( $p = 0,049$ ) abgelehnt werden.

Die hier erhobenen Daten unterstützen und ergänzen vorherige Publikationen, in denen die Zytokin-Muster im Serum bei prä-, peri- und postnatale Infektionen und bei nicht-infektiöse Inflammationen charakterisiert wurden, um sie diagnostisch zu nutzen und Hinweise auf das Langzeit-Outcome zu gewinnen.

## Summary

In spite of medical advances, preterm birth remains one of the major causes of both perinatal morbidity and mortality. Depending on the nation it still represents a more or less significant social and economic problem.

Caused by vaginal and ascending infections the rate of preterm births is significantly increased with premature rupture of membranes being both - a cause and a complication of such an infection. The involved cytokines play a central role in the genesis of preterm birth. However, not only the pregnancy but also the development of the neonate can be strongly affected by a corresponding imbalance of the cytokines. Some of these regulating proteins are already part of diagnostic methods. Others still offer the perspective to be of great value for preventive diagnostics as well as in the therapeutic area.

In the past there have been multiple examinations of the amniotic fluid but less of the fetal blood as an objectification of the fetal immune response. If pathological processes such as premature rupture of membranes preceded birth, exactly this might be of importance in consideration of complications in the neonatal period.

In order to be able to have a positive influence on the postnatal development further investigations of the fetal immune response are necessary. Therefore, we analyzed a whole series of different pro- and anti-inflammatory cytokines in the fetal umbilical cord blood of premature infants from Sri Lanka with premature rupture of membranes. These include G-CSF, GM-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12P40, IFN- $\gamma$ , IP-10, MCP-1, MCP-3, MIP- $\alpha$  and TNF- $\alpha$ .

The entire patient population included 129 preterm neonates from Sri Lanka of which 60 could be assigned to the PROM-group and 69 to the control group. The gestational age was in the range between 28 and 36 completed weeks of gestation and the neonate's sex was almost evenly divided into male and female. Within the control group 22 women gave birth vaginally and 47 by caesarean section.

Immediately after birth umbilical cord blood was collected as the test medium. After appropriate sample and reagent preparation the analysis was realized by using the Luminex Multiplex Assay. In the next step we tested the measured cytokine concentrations for a statistically significant coherence with the presence of premature rupture of membranes in pregnancy.

The four cytokines IL-10, GM-CSF, MCP-3 and IL-1 $\beta$  were found to be below the significance level of 5% ( $p < 0.05$ ) in varying dimensions. IL-10 showed the most significant difference ( $p = 0.003$ ) followed by MCP-3 ( $p = 0.019$ ), GM-CSF ( $p = 0.023$ ) and IL-1 $\beta$  ( $p = 0.033$ ). Moreover,

the cytokine concentrations were considered as a measure of the immune response in spontaneous vaginal delivery and delivery by caesarean section, regarding the gestational age at birth as well as the sex of the neonates and have also been tested for statistically significant coherences. The only significant differences could be detected by looking at the birth mode. In this case the null hypothesis for MCP-1 ( $p=0.037$ ) and IL-10 ( $p=0.049$ ) was rejected.

The data generated in this study support and complete previous publications in which the cytokine patterns in the serum in pre-, peri- and postnatal infections and in non-infectious inflammations were characterized in order to use them diagnostically as well as to receive information about the long-term outcome.

## **2. Einleitung**

### **2.1 Frühgeburt**

Die Frühgeburt (Preterm birth [PTB]) ist definiert als eine Geburt vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche (SSW) bzw. mit einem Gestationsalter (GA) von <259 Tagen, was ca. 7 % aller Geburten betrifft [35,55,73,81]. Davon haben ca. 1,5% der Kinder ein Geburtsgewicht von <1500 g bei einem GA von <32 SSW [55,98]. Man unterscheidet zwischen einem niedrigen Geburtsgewicht <2500 g (Low Birth Weight) und einem sehr niedrigen Geburtsgewicht <1500 g als Very Low Birth Weight bzw. <1000 g als Extremely Low Birth Weight bezeichnet [35,98].

Durch eine Reihe an Komplikationen, welche vermehrt bei Frühgeborenen auftreten und deren Häufigkeit sowie Schwere mit abnehmender Schwangerschaftsdauer zunehmen, unterscheiden sich sowohl die Morbiditäts-, als auch die Mortalitätsrate stark von denen Reifgeborener [35,81]. Auch heute noch ist Frühgeburtlichkeit die Hauptursache für die perinatale Mortalität [110]. Diese ist durch den medizinischen Fortschritt in den letzten Jahren und Jahrzehnten jedoch insgesamt deutlich gesunken [55]. In Deutschland liegt die Mortalität in der Perinatalperiode aktuell bei <0,5%, wobei es sich bei 2/3 der Fälle um Totgeburten handelt. Ab einem GA von 32 SSWs sinkt die Zahl der Komplikationen deutlich, sodass auch die Morbiditäts- und Mortalitätsraten geringer sind. [35] Zu beachten ist auch, dass trotz gleichem GA die Überlebenschancen bei Einzelgeburten sowie weiblichen Frühgeborenen höher liegen als bei Mehrlingen und männlichen Frühgeborenen [55].

#### **2.1.1 Besonderheiten in der Perinatalperiode**

Allgemein gesehen ist die Perinatalperiode der Lebenszeitraum mit der höchsten Vulnerabilität und daher auch unweigerlich mit einer erhöhten Mortalität vergesellschaftet [110].

Insbesondere Mangel-, Frühgeborene und dystrophe Reifgeborene neigen beispielsweise unter Geburt vermehrt zur fetalen Azidose und haben eine erhöhte Hypothermieeigung aufgrund des in reduzierter Form vorliegenden subkutanen braunen Fettgewebes. Weiterhin führt das Missverhältnis zwischen vorhandenem Energiespeicher und Energiebedarf zu einem 10-fach höheren Auftreten postnataler Hypoglykämien, welche regelmäßige Kontrollen sowie gegebenenfalls (ggf.) auch eine Therapie notwendig machen können.

Ebenfalls 10-mal häufiger ist das Vorkommen einer Polyzythämie, bedingt durch chronisch

intrauterine Hypoxien, die postnatal zu respiratorischen Störungen und zerebraler Minderperfusion mit Krampfanfällen führen können. [35]

Insgesamt sind perinatale entzündliche Erkrankungen sowie andere Komplikationen mit einem Ungleichgewicht von Zytokinen verbunden. Hierzu gehören unter anderem akute sowie chronische Lungenerkrankungen (Atemnotsyndrom [ANS], Bronchopulmonale Dysplasie [BPD]), Schäden der weißen Substanz (Periventrikuläre Leukomalazie [PVL]), aber auch Multiorganschäden sowie der Schock. [38]

## **2.1.2 Neonatologische Komplikationen**

### ***Atemnotsyndrom bzw. Respiratory Distress Syndrome***

Beim ANS liegt eine anatomisch unreife Lunge bei einem GA von meist <32.-34. SSW vor, die sich klinisch in einer Atemstörung äußert. Ursächlich ist ein Surfactant-Mangel, welcher erst ab der 36. SSW in ausreichenden Konzentrationen produziert wird. [35] Daher hat die Surfactant-Substitution einen entscheidenden Durchbruch in der kausalen Therapie erbracht und die Sterblichkeit Frühgeborener mit ANS nahezu halbiert. Zuvor war es die häufigste Todesursache in der Perinatalperiode. [55] Surfactant trägt als oberflächenaktive Substanz zur Stabilität des Alveolarsystems bei, indem es die Oberflächenspannung der Lungenbläschen reduziert und somit deren Kollapsneigung entgegenwirkt [35,98].

Die Häufigkeit des ANS liegt bei einem GA von <26. SSW bei über 80%. Die verminderte Produktion an Surfactant kann neben der Lungenunreife auch noch durch weitere Faktoren im Sinne intrauteriner Komplikationen oder postnataler Störungen der Homöostase hervorgerufen werden. Durch eine Entbindung per Kaiserschnitt (Cesarean section [CS]) wird dem Frühgeborenen die respiratorische Anpassung zusätzlich erschwert, da die fetale Lungenflüssigkeit in geringerem Umfang resorbiert wird und somit größere Volumina verbleiben, wodurch sich die Wirkung des Surfactants nicht in ausreichendem Maß entfalten kann. [35]

Durch die Störung des Gasaustauschs mit Hypoxie sowie respiratorischer Azidose kann es zur Entstehung einer pulmonalen Hypertonie kommen, was die pulmonale Situation weiter verschlechtert und in einem Circulus vitiosus mündet. Weiterhin kommt es zur Bildung hyaliner Membranen, hervorgerufen durch den vermehrten Übertritt eiweißreicher Bestandteile aus dem Serum in die Gasaustauschräume bei alveolokapillärem Leck. [35]

### ***Bronchopulmonale Dysplasie***

Die BPD wird auch als „Beatmungslunge“ bezeichnet, da sie regelhaft als Folge einer notwendigen Sauerstofftherapie nach ANS auftritt. Es handelt sich um eine chronische Erkrankung, welche bei 15% der Frühgeborenen mit einem GA von <32 SSW vorkommt. [35]

Auslösende Faktoren sind vor allem die Toxizität der erhöhten Sauerstoffzufuhr sowie das physikalische Trauma infolge einer maschinellen Beatmung. Infektionen und intrauterine Wachstumsretardierung (intrauterine growth restriction [IUGR]) begünstigen das Auftreten der BPD und der damit einhergehenden verminderten Alveolenbildung sowie die Rarefizierung des pulmonalen Gefäßbetts. [35] In der Frühphase zeigt sich eine Zytokin-gesteuerte Inflamationsreaktion mit einer Invasion von Entzündungszellen, welche zunächst ein interstitielles und alveoläres Ödem zur Folge hat [38,88,98]. Im Verlauf kommt es bei anhaltender Exposition gegenüber den verursachenden Noxen zur Lungenfibrose mit Lungenemphysem durch eine Störung der pulmonalen Gewebsreparatur. Dies äußert sich in einer gemischt obstruktiv-restriktiven Ventilationsstörung mit erniedrigtem Lungenvolumen, reduzierter Compliance, sowie einem erhöhten Atemwegswiderstand. Aufgrund des Missverhältnisses zwischen alveolärer Ventilation und Perfusion kommt es zur Ausbildung eines intrapulmonalen Rechts-Links-Shunts und damit zur Hypoxämie. Das Vollbild der Erkrankung beinhaltet zusätzlich eine pulmonale Hypertonie als Folge der Gefäßrarefizierung sowie der Hypertrophie der vaskulären Muskulatur. [98]

Nach einem prolongierten Sauerstoffbedarf in den ersten Lebenswochen äußert sich die BPD mit zunehmendem Lebensalter durch eine erhöhte Neigung zu bronchopulmonalen Infektionen, einer Rechtsherzbelastung als Folge der pulmonalen Hypertonie, sowie Gedeih- und Entwicklungsstörungen. Daher ist jede Sauerstofftherapie in der Neonatalperiode kritisch zu bewerten und deren Indikation regelmäßig zu reevaluieren. [35]

### ***Intraventrikuläre Hirnblutungen und Periventrikuläre Leukomalazie***

Verantwortlich für das vermehrte Auftreten von intraventrikulären Blutungen (Intraventrikuläre Hämorrhagie [IVH]) sowie der PVL bei Frühgeborenen sind die Unreife des Gewebes, eine erhöhte Kapillarfragilität sowie eine gestörte Autoregulation der zerebralen Durchblutung. Die Häufigkeit bei Neugeborenen mit Very Low Birth Weight liegt bei ca. 25%. [35]

Gering ausgeprägte Hämorrhagien verlaufen nicht selten symptomlos. Sind die Blutungen jedoch schwerwiegender, kann es vor allem durch Hypoxie, Hypo- sowie Hyperkapnie zu diversen kardiorespiratorischen und neurologischen Folgen kommen, welche zu bleibenden neurologischen Schädigungen führen oder gar letal enden können. [35]

### ***Nekrotisierende Enterokolitis***

Bei der Nekrotisierenden Enterokolitis (NEK) handelt es sich um eine transmurale nekrotisierende Entzündung der Darmwand, vor allem im terminalen Ileum und Colon, deren Pathogenese nicht abschließend geklärt ist. Bekannt ist jedoch, dass das Risiko durch Perfusionsstörungen signifikant ansteigt und ein früher enteraler Kostaufbau mit Muttermilch eher protektiv wirkt. [35]

Beim Frühgeborenen ist die NEK häufigste Ursache des akuten Abdomens und kann Ursache der neonatalen Sepsis sein. Die Folgen der NEK sind schwerwiegend und die Letalität liegt bei ca. 10-15%. Es kann bei schweren Verläufen zu bleibenden neurologischen Schäden sowie zum Kurzdarmsyndrom infolge ausgedehnter Nekrosen kommen. [35]

Pathognomonisch für dieses Krankheitsbild sind perlschnurartige Lufteinschlüsse in der Darmwand (Pneumatosis intestinalis) sowie der sonographische Nachweis von "fließenden" Gasblasen in den Portalvenen [35].

### **2.1.3 Ursachen der Frühgeburtlichkeit sowie nachfolgender Komplikationen**

Zu den Ursachen einer PTB gehören die vorzeitige Wehentätigkeit (Preterm labour [PTL]), der vorzeitige Blasensprung (Premature rupture of membranes [PROM]), ascendierende Infektionen, Mehrlingsschwangerschaften, die akute Plazentalösung sowie mütterliche Pathologien und Risikofaktoren [55,94,98]. Letztere beinhalten unter anderem Fehlbildungen des Uterus, eine hypoxisch-ischämische Beeinträchtigung der uteroplazentaren Einheit, das Alter der Mutter, Mangel- und Fehlernährung, ungünstige Lebensbedingungen, vorangegangene PTBs oder Aborte sowie chronischer Stress [94]. Insgesamt wird die Frühgeburtenrate durch vaginale und zervikale Infektionen um den Faktor 2,1 erhöht [53].

Da sich hierbei ein Zusammenspiel verschiedener Mediatoren wie Zytokine, Prostaglandine und Hormone, insbesondere das Oxytocin, ereignet, ist die PTB aus biochemischer sowie klinischer Sicht als multifaktorielles Geschehen anzusehen. Je nach auslösender Ursache können unterschiedliche Symptome auftreten. Gemeinsam ist jedoch meist eine eintretende subjektive bzw. objektive Wehentätigkeit, welche sich durch Schmerzen, intrauterine Kontraktionen und/oder einer direkten Aufzeichnung in der Kardiotokographie (Cardiotocographie [CTG]) äußert. In Ausnahmefällen kann es auch zur stillen Zervixöffnung ohne das Auftreten klinischer Symptome kommen, was vor allem bei schweren zervikalen Infektionen auftritt. [53]

Der PROM stellt mit einem Anteil von 30-40% aller PTBs einen wichtigen Risikofaktor für eine nachfolgende PTB in der Schwangerschaft dar [15]. Durch die Möglichkeit der Keimaszension und der damit verbundenen Inflammationsreaktion kommt den hierbei involvierten Zytokinen eine zentrale Bedeutung bei der Genese der PTB zu [88].

Bei mehr als 50% der sehr unreifen Frühgeborenen ist in der Vorgeschichte ein AIS aufgetreten. In verschiedenen Studien sowie experimentellen Untersuchungen ist ein Zusammenhang zwischen mütterlichem AIS und dem Auftreten von neonatologischen Komplikationen, insbesondere der BPD, Hirnblutungen bzw. PVL aufgefallen. Es wird vermutet, dass die durch die Entzündungsreaktion hervorgerufene Zytokinexposition des Fetus zu einem sogenannten "first hit" führt. Dies beschreibt eine inflammatorische Reaktion der frühkindlichen Lunge sowie eine erste Schädigung der unreifen vaskulären Endothelstrukturen. Auf diesem Weg kann auch die zerebrale Durchblutung nachhaltig beeinträchtigt werden. [36,98]

Darüber hinaus haben Studien gezeigt, dass auch eine Korrelation zwischen dem GA und der Konzentration von Chemokinen in der Muttermilch vorhanden zu sein scheint. So wurden bei Müttern Frühgeborener weniger Chemokine in der Muttermilch nachgewiesen als bei Müttern Reifgeborener.

Dies lässt insbesondere in Hinblick auf die erhöhte Infektanfälligkeit Frühgeborener einen kausalen Zusammenhang vermuten. [88]

## **2.2 Vorzeitiger Blasensprung**

Definiert ist der PROM als Fruchtwasserabgang durch die Zervix vor Beginn der Eröffnungswehen [15,100]. Bei etwa 1/5 aller Schwangerschaften tritt im Verlauf ein PROM auf [15].

### **2.2.1 Ätiopathogenese und Komplikationen**

In den meisten Fällen wird dieser durch eine Keimaszension von Erregern der Vaginalflora mit nachfolgender Infektion am unteren Eipol hervorgerufen. Bakterienbestandteile wie Phospholipasen und Lipopolysaccharide oder bakterielle Toxine führen zu einer Induktion immunologischer Prozesse des fetomaternalen Kompartiments. [9,15,28,100] Hierdurch kommt es zur Aktivierung der Arachidonsäurekaskade mit Freisetzung von Prostaglandinen. Prostaglandin (PG) E<sub>2</sub>- und F<sub>2α</sub> können nachfolgend zum Aufweichen der Eihäute führen und somit frühzeitige Wehen induzieren. Auf zellulärer Ebene erfolgt zudem die Prostaglandin-abhängige Migration neutrophiler Granulozyten in die Zervix. [9,15]

Neben einer Keimaszension können auch ein Hydramnion, eine Mehrlingsschwangerschaft oder die Querlage des Kindes durch vermehrten Druck und damit einer erhöhten Spannung der Fruchtblasenwand zur deren Ruptur führen [15,100]. Nicht zuletzt sind auch die Zervixinsuffizienz und die PTL ohne vorangegangene Infektion mögliche Auslöser [100].

Sowohl mögliche Ursache als auch Komplikation bei PROM sind ascendierende Infektionen mit Entwicklung eines AIS und folgender Schädigung des Fetus. Zudem kann es zum Auftreten einer PTB sowie zu intrauterinen Komplikationen, wie beispielsweise dem Vorfall von Teilen der Nabelschnur bzw. der kompletten Nabelschnur kommen. [15]

### **2.2.2 Bakterielle Vaginose und ascendierende Infektionen**

Mit einer Häufigkeit von 10-20% ist die bakterielle Vaginose weit verbreitet und das Vorliegen sollte daher möglichst vor einer eingetretenen Schwangerschaft verifiziert werden. Mögliche Folgen der bakteriellen Vaginose sind ascendierende Infektionen, welche durch eine Veränderung der Zytokinkonzentrationen das Risiko eines PROM oder einer PTL und damit einer möglicherweise folgenden PTB deutlich erhöhen. [15,88]

Streptokokken der Gruppe B (GBS) gehören zu den häufigsten Verursachern schwerwiegender Infektionen beim Neonaten [11,15]. Bei 5-30% aller Frauen liegt eine Besiedlung des Genitaltrakts durch sexuelle Übertragung oder Schmierinfektion aus dem eigenen Gastrointestinaltrakt vor. Die Möglichkeit der Mutter-Kind-Übertragung ist sowohl unmittelbar vor, während oder nach der Geburt gegeben. [15] Obwohl ein großer Anteil der Schwangeren in Deutschland mit GBS besiedelt und etwa die Hälfte der Kinder nach Geburt kolonisiert sind, erkrankt davon nur ein relativ kleiner Teil. Natürlich spielen hierbei auch andere Faktoren wie die Dichte der Besiedlung sowie die Höhe des mütterlichen Antikörpertiters eine Rolle. [11]

Weiterhin ist ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der genitalen Besiedlung mit GBS und einem PROM, Frühgeburtlichkeit sowie Fieber unter Geburt zu vermuten. Ausgerechnet diese Art der Infektion führt in den meisten Fällen beim Erwachsenen nicht zu Symptomen, sodass diese oft unerkannt bleibt. Für das Kind ist das Risiko einer vitalen Gefährdung jedoch enorm, da GBS neben dem Bakterium *Escherichia coli* die häufigsten Verursacher einer neonatalen Sepsis oder Meningitis sind. [11,15] Hierbei unterscheidet man eine Early-Onset- von einer Late-Onset-Sepsis. Insgesamt machen Reifgeborene die deutliche Mehrzahl der Sepsis-Fälle mit ca. 80% aus, allerdings ist Frühgeburtlichkeit mit einem höheren Risiko für die frühe Form der Sepsis assoziiert. Die Infektion erfolgt häufig bereits intrauterin. Bei ca. 66% zeigen sich erste Symptome innerhalb der ersten 20 Lebensstunden. Das Letalitätsrisiko Frühgeborener liegt hierbei ein Vielfaches über dem reifgeborener Kinder. Umso entscheidender ist die

frühzeitige Identifikation der maternalen Infektion sowie die Durchführung einer entsprechenden intrapartalen prophylaktischen Antibiose. Bei unbekanntem mütterlichem GBS-Status sollte nur bei Vorliegen von Risikofaktoren eine Prophylaxe erfolgen. [15] Mithilfe antibiotischer Prophylaxemaßnahmen nach rektovaginalem Screening bzw. Evaluation der mütterlichen Risikofaktoren konnte Studien zufolge in den USA die Häufigkeit der Early-Onset-Sepsis um etwa 2/3 reduziert werden. Die GBS-assoziierte PTB sowie die Spätsepsis konnten hierdurch jedoch nicht verhindert werden. [11]

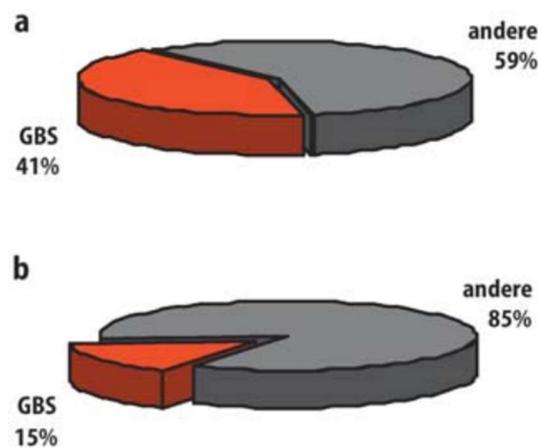


Abbildung 1: Anteil von GBS, a - an der neonatalen Early-Onset-Sepsis, b - an der neonatalen Late-Onset-Sepsis (Berner, 2003)

### 2.2.3 Amnioninfektionssyndrom und Fetal Inflammatory Response Syndrome

Die bakterielle Infektion des Fruchtwassers, der Eihäute, der Plazenta sowie des Feten wird als Chorioamnionitis oder auch Amnioninfektionssyndrom (AIS) bezeichnet [15]. Hierbei handelt es sich primär um eine klinische Diagnose. Bei ca. 3 % aller Geburten finden sich Zeichen eines AIS bei der Mutter und/oder beim neugeborenen Kind. [100]

Ein PROM ist hierfür zwar eine durchaus häufige Ursache, jedoch keinesfalls eine notwendige Voraussetzung. Die Aszension von Keimen aus der Zervix kann auch ohne eine zuvor stattgehabte Ruptur der Fruchtblase zu einer Infektion führen. Manipulationen am Zervikalkanal, wie beispielsweise vaginale sonographische Untersuchungen und Milieuveränderungen in der Scheide begünstigen aufsteigende Infektionen. [53] Der Schweregrad ist unter anderem von der Art und Menge der Keime sowie von der Immunantwort der Mutter abhängig [9,15]. Neben einer Aszension können darüber hinaus auch andere Mechanismen ursächlich für eine Invasion von Keimen sein, wie beispielsweise

die transplazentare Übertragung durch hämatogene Streuung, eine retrograde Aussaat von Mikroorganismen aus der Peritonealhöhle über die Eileiter sowie eine akzidentelle bzw. iatrogene Inokulation durch invasive Untersuchungen (Amniozentese, Chorionzottenbiopsie, Fetalblutentnahme) [9,53]. Da eine transzervikale Aszension dennoch die Hauptursache darstellt, handelt es sich bei den Erregern fetomaternaler Infektionen überwiegend um in der Vaginalflora vorkommende Bakterien wie Streptokokken, Staphylokokken, Enterokokken und gramnegative Stäbchen [9,15,53].

Es kann sowohl zu lebensbedrohlichen Komplikationen bei der Mutter als auch beim Fetus bzw. beim Neugeborenen kommen. Mütterlicherseits sind hierbei vor allem schwere Allgemeininfektionen mit septischem Schock sowie eine Sekundärheilung von Scheiden-Damm-Verletzungen zu befürchten. [15,53] Typische Symptome sind ein beidseitiger Schmerz im unteren Uterinsegment, was bei fortgeschrittener Infektion in Form eines Uteruskantenschmerz auftritt, sowie eine gesteigerte uterine Aktivität mit Wehen oder schmerzfreien Kontraktionen. Meist ist im Serum der Mütter ein erhöhtes C-reaktives Protein (CRP) nachzuweisen. Ein vorhandener Uteruskantenschmerz sowie eine Erhöhung der Körpertemperatur sprechen für eine bereits fortgeschrittene Infektion. [53]

Komplikationen für das noch ungeborene Kind sind vor allem plazentare Versorgungsstörungen und die Induktion von Wehen mit folgender PTB, was sich typischerweise in einer Erhöhung der basalen Herzfrequenz, teilweise verbunden mit einem Oszillationsverlust, äußert. Darüber hinaus können postnatal durch eine intrauterine Infektion verursachte Pyodermien, Pneumonie, Otitis media, Meningitis oder sogar Zeichen einer Sepsis mit Tachykardie, Atemstörungen und Zyanose auftreten. Eine durch ein fortgeschrittenes AIS ausgelöste systemische Entzündungsreaktion beim Fetus wird als „fetal inflammatory response syndrome“ (FIRS) bezeichnet und ist in der Regel auf die Aktivierung der angeborenen Immunabwehr zurückzuführen. Histopathologische Hinweise sind das Vorliegen einer Funisitis bzw. Omphalovaskulitis. Nachzuweisen ist das FIRS außerdem durch Erhöhungen von CRP und Interleukinen, wie dem Interleukin (IL)-6 im Nabelschnurblut. [36,51] Sowohl die Mortalität als auch die Morbidität des Neugeborenen sind nach fortgeschrittener intrauteriner Infektion vergleichsweise signifikant erhöht. Das Vorhandensein eines FIRS birgt zudem ein großes Risiko für Langzeitfolgen, wie beispielweise der BPD oder neurologischen Entwicklungsstörungen. [15,36,51,53]

Bei unsicherer Diagnose kann eine diagnostische Amniozentese durchgeführt werden sowie die Bestimmung der IL-6- und -8-Konzentration erfolgen. Beide Interleukine sind bei intrauterinen Infektionen deutlich erhöht und somit sensitive Marker. Unabhängig vom aktuellen GA des Kindes sollte bei nachgewiesener mütterlicher Infektion immer eine Entbindung erfolgen. [53]

Bereits vor Jahren wurden der ascendieren Infektion folgende Stadien zugeordnet:

**Stadium 1:** Überhandnehmen fakultativer bzw. Auftreten pathologischer Keime in Vagina und/oder Zervix, was sich im Rahmen einer bakteriellen Vaginose manifestieren kann.

**Stadium 2:** Beginnende Besiedlung der Dezidua über das Uteruskavum als Zugangsweg

**Stadium 3:** Lokal begrenzte Deziduitis mit nachfolgender Chorionitis bei weiterer Ausbreitung der Infektion. Eine Invasion fetaler Gefäße kann zur Choriovaskulitis, eine Invasion des Amnions zur Amnionitis bzw. intraamnialen Infektion führen.

**Stadium 4:** Invasion des Fetus durch die Mikroorganismen über natürliche Eintrittspforten.

[9]

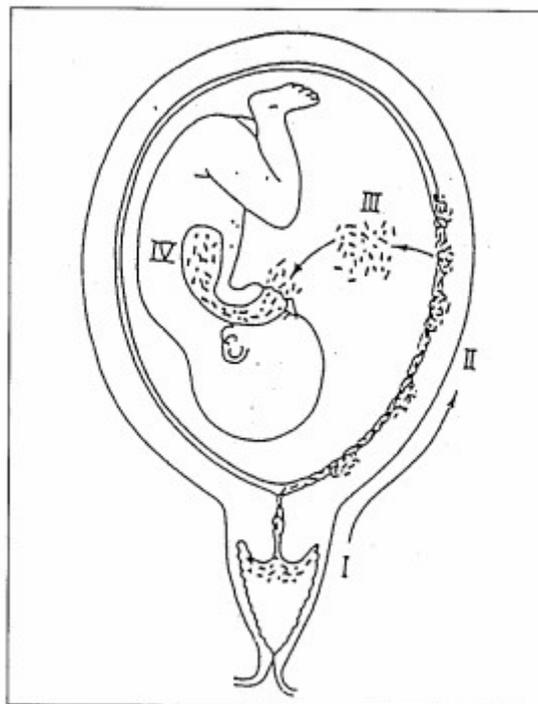


Abbildung 2: Stadien der intrauterinen Infektion durch Keimaszension  
(Baumann et al. 1996)

## 2.2.4 Neugeborenenensepsis

Bei der Neugeborenenensepsis unterscheidet man zwischen dem Early-Onset- (Beginn innerhalb der ersten 72 Lebensstunden) und dem Late-Onset-Type (Beginn nach vollendeten 72 Lebensstunden) mit jeweils charakteristischem Erregerspektrum [35].

Die Early-Onset-Sepsis ist meist Resultat geburtshilflicher Komplikationen, wie dem PROM oder eines Amnioninfektionssyndroms der Mutter, aus deren Rektovaginaltrakt die Erreger auch entstammen [35,97]. Bei Symptomatik nach den ersten 72 Lebensstunden handelt es sich meistens um Infektionen aus dem endogenen Erregerreservoir bzw. um Keime aus der Umgebungsflora des Neugeborenen. Nicht selten führt eine Katheterinfektion zur neonatalen Sepsis. [35]

| Frühsepsis < 72 h  | Spätsepsis > 72 h   |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>■ <math>\beta</math>-hämolisierende Streptokokken der Gruppe B +++</li> <li>■ Escherichia coli ++</li> <li>■ Staphylococcus aureus +</li> <li>■ Klebsiellen +</li> <li>■ Enterokokken +</li> <li>■ Streptokokken anderer Gruppen +</li> <li>■ Listeria monocytogenes +</li> <li>■ Anaerobier, wie Bacteroides fragilis +</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ koagulasenegative Staphylokokken +++ (Staphylococcus haemolyticus und epidermidis)</li> <li>■ Escherichia coli ++</li> <li>■ Enterobacter spp. ++</li> <li>■ Serratia spp. +</li> <li>■ Klebsiella spp. ++</li> <li>■ Pseudomonas aeruginosa +</li> <li>■ Staphylococcus aureus +</li> <li>■ DD: Candida spp., Herpes simplex Typ 1 und 2, Enteroviren, humane Parechoviren +</li> </ul> |
| +++ sehr häufig, ++ häufig, + selten   |   |

Abbildung 3: Erregerspektrum Early- / Late-Onset-Sepsis (Duale Reihe Pädiatrie. Gortner L, Meyer S, 5. vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2018.)

Durch Bakteriämie oder lokale Ausbreitung kommt es nachfolgend zur Infektion weiterer Organsysteme und schließlich zur Sepsis. Da der Nestschutz durch diaplazentar übertragene Immunglobuline nur ein reduziertes Spektrum aufweist, ist eine Opsonierung von Erregern als Grundlage für eine folgende Phagozytose nicht in vollem Ausmaß möglich. Durch die erregerinduzierte Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wird eine entsprechende Immunreaktion ausgelöst, die man als systemische Entzündungsreaktion bezeichnet. Hierbei kommt es unter anderem zu Permeabilitätsstörungen der Kapillaren mit Exsudation von Eiweißen ins Gewebe oder die Alveolen der Lunge, Blutdruckabfall usw. Sowohl erhöhte Zytokinspiegel als auch klinische Symptome einer systemischen Entzündungsreaktion können jedoch auch durch andere Vorfälle, wie beispielsweise ein Geburtstrauma, ausgelöst werden. Somit ist deren Auftreten als sehr unspezifisch zu werten und daher nicht beweisend für das Vorliegen einer Infektion. [35]

Typischerweise manifestiert sich die neonatale Sepsis klinisch durch Trinkschwäche, muskuläre Hypotonie und respiratorische Symptome wie Tachydyspnoe, Stöhnen, Zeichen vermehrter Atemarbeit. Zudem lässt sich häufig ein grau-blasses, teilweise marmoriertes Hautkolorit beobachten, als Zeichen einer Veränderung der Hautperfusion mit pathologischer Rekapillarierungszeit  $>2$  s. [35,74] In der Spätphase kann es außerdem zu Ikterus, Lebervergrößerung, Thrombozytopenie sowie zur disseminierten intravasalen Gerinnung mit Verbrauchskoagulopathie kommen. Bei ausbleibender Therapie sowie progredienter Infektion mündet diese in das Vollbild der Sepsis mit Schocksymptomatik, marmoriertem Hautkolorit und metabolischer Azidose. [35]

Vor allem in der Frühphase ist die Diagnosestellung anhand der Klinik teilweise deutlich erschwert, da typische Symptome durchaus fehlen können. Von umso größerer Bedeutung ist es, dass bereits dem geringsten Verdacht durch eine entsprechende Diagnostik nachgegangen und ggf. eine antibiotische Therapie eingeleitet wird. Hierbei erfolgt neben der Bestimmung von Laborparametern wie Blutbild, Differenzialblutbild, CRP mittlerweile auch regelhaft eine IL-6-Bestimmung. [74] Dies liegt unter anderem daran, dass es bereits 24 bis 48 Stunden vor dem Auftreten klinischer Symptome zu einem Anstieg von IL-6 kommt, welcher dem CRP-Anstieg deutlich vorausgeht [14,67]. Laut verschiedener Studien eignet sich IL-6 daher sowohl als prädiktiver Parameter sowie als Indikator für die frühe Diagnose einer Sepsis [22,67,85].

## **2.3 Zytokine**

### **2.3.1 Funktion und Wirkweise**

„Zytokine“ ist ein Überbegriff für eine ganze Gruppe von Proteinzellregulatoren, welche anhand der biologischen Funktionen und der Natur ihrer Rezeptoren in Wachstumsfaktoren, Interleukine, Interferone und Chemokine untergliedert werden können. Die verschiedenen Unterklassen teilen eine gewisse Anzahl gemeinsamer Merkmale, wozu unter anderem ein niedriges Molekulargewicht sowie eine häufig vorliegende Glykosylierung gehört. [7,42]

Sie werden von einer Vielzahl verschiedener Zellen im Körper produziert und vermitteln einerseits physiologische Reaktionen, sind jedoch genauso an pathophysiologischen Vorgängen und der Entstehung verschiedener Erkrankungen beteiligt. Genau aus diesem Grund haben die Zytokine auch ein außerordentliches therapeutisches Potential. [7]

Zytokine spielen vor allem bei immunologischen sowie Entzündungsreaktionen eine zentrale Rolle. Hierbei werden sowohl Dauer als auch Intensität gesteuert. In der Regel erfolgt die Ausschüttung nicht kontinuierlich, sondern lediglich vorübergehend und angepasst an den dadurch gesteuerten Pathomechanismus. Sie werden nach einem auslösenden Reiz mit sehr geringer Latenz von den entsprechenden Zellen synthetisiert und vor allem lokal über parakrine oder autokrine Sekretionsmechanismen freigesetzt. Das Wirkspektrum befindet sich im Bereich pikomolekularer Konzentrationen. Lediglich nach hoher Ausschüttung kann es auch zu einer systemischen Wirkung kommen. [7,42]

Innerhalb der Zytokine findet man viele sich überlappende Wirkmechanismen, wobei eine Zellantwort auf das vorhandene Zytokin von dessen lokaler Konzentration, dem Zelltyp selbst und den gleichzeitig vorhandenen Einflüssen anderer zellregulatorischer Moleküle abhängig ist [7].

Zudem werden den Zytokinen pleiotrope Eigenschaften zugeschrieben, was bedeutet, dass Zytokine der gleichen Art unterschiedliche Antworten an ihren Zielzellen auslösen können. Andererseits ist es aber auch möglich, dass unterschiedliche Zytokine an den Zielzellen gleiches bewirken, wobei man von Redundanz spricht. [42] Somit kann sich die Interaktion additiv, synergistisch oder antagonistisch auf die Zellfunktion auswirken [7]. Die Wirkung entfaltet sich durch Bindung an Oberflächenrezeptoren der Zielzellen, welche für jedes Zytokin bzw. jede Zytokingruppe spezifisch und hochaffin sind. Hiernach wird eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt, was sowohl zur Differenzierung, Proliferation, Migration, aber auch zur Apoptose der Zellen führen kann. [7,42]

| Zytokinklasse                                   | Eigenschaften  | Funktion  |
|---|--|---|
| <b>Interleukine (IL)</b>                        | Familie mit über 20 verschiedenen Proteinen, deren Wirkungen mit Ausnahme von IL-1 (TNF-ähnlicher Rezeptor, s. u.) und IL-8 (s. u.) durch Rezeptoren mit assoziierten Tyrosinkinasen vermittelt werden | <ul style="list-style-type: none"> <li>regulieren die Kommunikation zwischen Zellen der Immunantwort (Proliferation, Differenzierung, Aktivierung, z. B. stimulieren IL-12 und IL-4 die Differenzierung zu T<sub>H</sub>1- bzw. T<sub>H</sub>2-Zellen)</li> <li>regulieren die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen</li> <li>einige IL (z. B. IL-1, IL-6) lösen Entzündungsreaktionen aus; IL-1 induziert Fieber</li> </ul>   |
| <b>Interferone (IF)</b>                         | Familie strukturell sehr ähnlicher Proteine, Signaltransduktion über Rezeptoren mit assoziierten Tyrosinkinasen  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Typ-I-Interferone (z. B. IFN-<math>\alpha</math>, IFN-<math>\beta</math>): wirken antiviral, hemmen die Zellproliferation, induzieren MHC-Klasse-I-Proteine auf allen somatischen Zellen und stimulieren so die Zellyse durch zytotoxische T-Zellen</li> <li>Typ-II-Interferon (IFN-<math>\gamma</math>):<br/>Haupteffekt: Aktivierung von Makrophagen („respiratory burst“), Neutrophilen und NK-Zellen, weitere Effekte: zusammen mit Typ-I-Interferon antiviral wirksam; induziert MHC-Klasse I- und -Klasse-II-Proteine, unterstützt Differenzierung zu T<sub>H</sub>1-Zellen, hemmt Differenzierung zu T<sub>H</sub>2-Zellen</li> </ul> |
| <b>Chemokine und Interleukin-8</b>              | große Familie chemotaktisch wirkender Zytokine, Signaltransduktion über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren  | rekrutieren Leukozyten zum Infektionsherd, regulieren die Wanderung von Leukozyten aus dem Blut zum Entzündungsherd und das Auswandern von Immunzellen in periphere Lymphorgane   |
| <b>TNF (Tumor Necrosis Factor)-Superfamilie</b> | Familie mit ca. 20 verschiedenen Proteinen, Signaltransduktion über TNF-Rezeptoren Typ 1 und Typ 2 → Aktivierung der Transkription via AP-1 und NF- $\kappa$ B oder Apoptose                           | Sie regulieren <ul style="list-style-type: none"> <li>das Überleben bzw. die Apoptose von Zellen,</li> <li>die Entwicklung und Homöostase von Lymphgewebe, neuronalen und ektodermalen Geweben,</li> <li>die Immunantwort.</li> </ul>   |
| Beispiele:<br>■ TNF $\alpha$                    |  | Mediator akuter Entzündungsreaktionen: aktiviert Monozyten und Neutrophile und rekrutiert sie zum Infektionsherd, stimuliert die Chemokinproduktion durch Endothelzellen und Makrophagen,<br><i>höhere Dosen:</i> Auslösung von Fieber,<br><i>toxische Dosen</i> bei massiven Entzündungen: septischer Schock, stimuliert einige Zelltypen zur Apoptose   |

Abbildung 4: Einteilung Zytokine (Duale Reihe Biochemie)

### **Interleukin-10**

IL-10 ist ein in hohem Maße antiinflammatorisch wirksames Zytokin, welches eine bedeutende Rolle bei der Regulation und Begrenzung der Immunantwort spielt. Durch IL-10 kann die normale Gewebemöostase aufrechterhalten werden, indem es eine überschießende Immunreaktion des Wirts auf Krankheitserreger verhindert. [69,92,101] So können für den Wirt schädliche systemische Stoffwechsel- sowie hämodynamische Störungen verhindert und damit Gewebeschäden begrenzt werden [92,101].

Eine fehlerhafte oder ungenügende Expression kann daher die Entzündungsreaktion auf Erreger pathologisch verstärken und ggf. auch zu einer chronischen Infektion führen [70,101]. Durch seine entzündungshemmenden Eigenschaften ist die Dysregulation von IL-10 aber auch mit einem erhöhten Risiko der Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise entzündlichen Darmerkrankungen verbunden [92,101].

Als Hauptquellen von IL-10 werden T-Helferzellen, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen beschrieben, wobei unzählige Immuneffektorzelltypen in bestimmten Situationen ebenfalls IL-10 produzieren können. Außerdem sind auch Nicht-Immuneffektorzellen im Kontext von Infektionen oder Gewebeschäden sowie Tumorzellen zur Synthese von IL-10 befähigt. [69,92,101]

Seine Wirkung entfaltet IL-10 über seinen heterodimeren IL-10-Rezeptor, der sich auf der Membran von fast allen hämatopoetischen Zellen befindet. Als Zielzellen sind jedoch insbesondere Monozyten und Makrophagen bekannt. Am Ende der Signalkaskade kommt es zur Hemmung der Ausschüttung von Entzündungsmediatoren sowie einer Down-Regulation von Phagozytose und Antigenpräsentation. [69,92,101]

Darüber hinaus vermag IL-10 direkt oder indirekt eine Vielzahl von Zelltypen bzw. deren Wachstum und Differenzierung zu unterdrücken, allergische Reaktionen zu hemmen und die Funktion regulatorischer T-Zellen zu verbessern [69,101]. Diese Effekte werden u.a. durch Freisetzung antiinflammatorischer Moleküle wie IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1-ra), löslicher TNF- $\alpha$ -Rezeptor oder IL-27 vermittelt [101].

Die entzündungshemmenden Effekte von IL-10 können allerdings auch durch Pathogene genutzt werden, indem diese Analoga synthetisieren, welche über Bindung des IL-10-Rezeptors eine Abwehrreaktion des Wirts verhindern bzw. abschwächen [101]. Durch diese Hochregulation von IL-10 wird ein optimales Umfeld für die Ausbreitung einer Infektion geschaffen [60,78,101].

Häufig ist nicht eindeutig zu identifizieren, ob eine hohe Erregerlast Folge oder Ursache erhöhter IL-10-Konzentrationen ist. Insgesamt zeigt die Summe der Ergebnisse jedoch, dass die Immunantwort des Wirts auf einen Krankheitserreger einer feinen Koordination bedarf, unter welcher zunächst inflammatorische Vorgänge zur Beseitigung des Erregers induziert werden und anschließend die Entzündungsreaktion durch antiinflammatorische Prozesse begrenzt wird. [101]

Ein weiterer, jedoch eher konträrer Mechanismus ist die Förderung der Aktivierung und Proliferation einiger Immunzellreihen, zu welchen Natürliche Killerzellen, CD-8-positive zytotoxische T-Zellen, Mastzellen und B-Zellen gehören [101].

Das therapeutische Potential von rekombinantem IL-10 hat sich bei verschiedenen immunologischen und infektiologischen Erkrankungen als nur begrenzt wirksam gezeigt. Den Krankheitsverlauf scheinbar günstig beeinflussende Effekte konnten vor allem unter mittleren Dosierungen hervorgerufen werden, höhere Dosen haben eher zu einer Hochregulation immunologischer Vorgänge geführt. [60,76,78,101]

Dahingegen haben andere Studien ergeben, dass durch Störung der IL-10-Genexpression oder IL-10-Signalübertragung über seinen Rezeptor durch AK-Blockade viele intrazelluläre Infektionen besser beherrschbar sind und in ihrer Dauer eingeschränkt werden können. Eine Unterbindung der IL-10-Funktion führt zu einem verbesserten Überleben nach Infektion und hat eine verstärkte adaptive Immunabwehr zur Folge.

Auf der anderen Seite kann eine längere Abwesenheit bzw. ein Mangel von IL-10 auch dazu führen, dass sich Infektionen ungehindert ausbreiten und chronifizieren bzw. zum septischen Schock führen können. [101]

### ***Monocyte Chemotactic Protein-1 und -3***

MCP-1 und -3 gehören zur Gruppe der Monocyte chemotactic proteins (MCPs). Diese stellt eine Subklasse der CC-Chemokine dar, deren kodierende Gene sich auf Chromosom 17 befinden. [10,116] Ihre chemotaktische Wirkung entfalten die beiden MCPs gegenüber einer Vielzahl von Entzündungszellen und vermögen diese zu aktivieren [10]. Insbesondere wirken sie stark chemotaktisch auf Monozyten, jedoch auch auf Eosinophile sowie auf Basophile [86,116]. Die Aminosäurezusammensetzung von MCP-3 gleicht mit 71% der von MCP-1. Beide können für eine Aktivierung von Basophilen, Monozyten und T-Zellen sorgen, wobei MCP-3 zusätzlich die Aktivierung Eosinophiler zu induzieren vermag. [10]

Die Synthese von MCPs kann auf unterschiedlichen Wegen stimuliert werden, wie beispielsweise durch proinflammatorische Zytokine, aber auch durch bakterielle oder virale Reize. Zu diesen Zytokinen gehören IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-1 und TNF. [116]

Es ist bereits bekannt, dass MCP-3 mit verschiedenen CC-Chemokinrezeptoren interagiert. Diese werden unter anderem von Leukozyten-Subpopulationen exprimiert und können sowohl selektiv als auch gleichzeitig auf deren Oberfläche vorliegen. [10] Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass viele Chemokinrezeptoren auch von Mastzellen und Basophilen

exprimiert werden. Hierüber ist MCP-3 in der Lage die Freisetzung von Histamin aus Basophilen sowie die Leukotrien-C4-Produktion zu induzieren.

MCP-1, welches lediglich an den C-C chemokine receptor type 2 (CCR2) bindet, kann ebenfalls einen starken Stimulus zur Exozytose setzen. Es hat eine zehnmal höhere Affinität zum CCR2 als MCP-3 und kann die Histaminfreisetzung aus Basophilen stark stimulieren. [86]

Bei mikrobieller Invasion ist die Rekrutierung von Entzündungszellen ein ausschlaggebender Mechanismus der angeborenen Immunabwehr. So vermittelt der Chemokinrezeptor CCR2 beispielsweise die Rekrutierung von Monozyten zum Ort der Inflammation aus dem Knochenmark. Dieser Rezeptor und die damit verbundene Reaktion kann durch die beiden CC-Chemokine MCP-1 und MCP-3 induziert werden.

In einem Mausmodell konnte die Rolle von MCP-1 und -3 in der Abwehr von Mikroorganismen verdeutlicht werden. Hierbei war es MCP-3-defizienten Mäusen beispielsweise nicht möglich, Bakterien effizient aus der Milz zu entfernen. Gleichzeitig ließen sich signifikant weniger Monozyten im Blutkreislauf und der Milz, dafür jedoch erhöhte Zahlen im Knochenmark nachweisen, was für eine verminderte Monozytenrekrutierung spricht. [50]

Darüber hinaus sind CC-Chemokine auch bekannt als Mediatoren verschiedener pathologischer Zustände. Hierzu gehören unter anderem allergische Reaktionen, chronische Entzündung, Atherosklerose sowie Tumoren.

Daher stellt die Rezeptorblockade dieser Zytokin-Subklasse möglicherweise einen therapeutischen Ansatz im Bereich dieser Erkrankungen dar. [10]

### ***Granulocyte macrophage colony-stimulating factor***

Wie sein Name bereits vermuten lässt, vermag der Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) unter anderem die Proliferation sowie die Reifung myeloischer Vorläuferzellen zu Granulozyten und Monozyten beziehungsweise deren Differenzierung zu Makrophagen effektiv zu stimulieren [32,109].

Wenn auch vornehmlich bekannt als Wachstumsfaktor der Hämatopoese, kommt GM-CSF jedoch zudem eine tragende Rolle bei der Regulierung reifer myeloischer Zellen sowohl im Rahmen der Homöostase als auch bei Entzündungsreaktionen zu [40,84,106]. Hierbei werden Aktivierung, Differenzierung, Mobilisierung, aber auch das Überleben der Zellen maßgeblich beeinflusst [32,106].

Im Rahmen der Immunantwort kann GM-CSF die Antigenpräsentation sowie Phagozytose-Eigenschaften verbessern und hat Einfluss auf die Chemotaxis und Adhäsion von Leukozyten [65].

Die Freisetzung von GM-CSF erfolgt hauptsächlich durch aktivierte Leukozyten, jedoch sind auch Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen, dendritische Zellen, Gewebszellen sowie maligne Zellen dazu in der Lage [32,39,84,106,115].

Vor allem unter im Körper ablaufenden Entzündungsreaktionen können die eigentlich niedrigen Grundzirkulationswerte von GM-CSF schnell ansteigen [96,106]. Allgemein gesehen variiert die Freisetzung von Kolonie-stimulierenden Faktoren je nach Gewebe sowie auslösendem Stimulus jedoch sehr stark [96].

Zur Induktion der Expression kommt es vor allem durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23 und TNF- $\alpha$ . Eine Suppression dieser wird wiederum durch IL-4, IL-10 sowie IFN- $\gamma$  in unterschiedlichem Ausmaß hervorgerufen. [29,32,48,64,80,93,106]

Colony Stimulating Factor 2 Receptor (CSF-2R) ist der aus zwei Untereinheiten bestehende GM-CSF-Rezeptor. Die „a-Untereinheit“ stellt den ligandenbindenden Anteil, die „b-Untereinheit“ die Signalübertragungseinheit dar. Nach Bindung werden mehrere Signalwege unter anderem über JAK2/STAT5, MAPK, PI3K in Gang gesetzt. [82,106]

Mehrere Arbeiten legen die Vermutung nahe, dass eine persistierende GM-CSF-Produktion im Sinne einer positiven Rückkopplung über eine Zytokin-Schleife eine zentrale Rolle bei Autoimmunerkrankungen bzw. chronischen Entzündungen spielt. Diese Vermutung wird unterstützt durch Ergebnisse in Mausmodellen, bei welchen ein GM-CSF-Mangel den Organismus vor der Entstehung multipler Autoimmunkrankheiten bewahrt hat.

Darüber hinaus hat die in vivo-Verabreichung eines GM-CSF-Antikörpers im frühen Krankheitsstadium autoimmun-assoziierte Entzündungen stark eindämmen bzw. die Entwicklung der Erkrankung verhindern können [23,66,106].

Die Therapie mit monoklonalem GM-CSF-Antikörper hat im Rahmen klinischer Studien an Patienten mit Rheumatoider Arthritis auch eine deutliche Verbesserung ohne das Auftreten signifikanter Nebenwirkungen gezeigt, sodass sich hier ein therapeutisches Potential vermuten lässt [23,103,106].

### ***Interleukin-1 $\beta$***

IL-1 ist ein Protein mit regulatorischer Funktion auf verschiedene Zellen und Gewebe. Es vermag, je nach auslösendem Reiz (z.B. Autoimmunerkrankung, Infektion), eine spezifische Antwort in den entsprechenden Zellen bzw. Organsystemen zu generieren wie beispielsweise die Proliferation von Lymphozyten oder Fieberinduktion im Organismus.

Vor allem bei der rheumatoiden Arthritis, dem septischen Schock, der Niereninsuffizienz, Abstoßungsreaktionen nach Transplantation sowie Fieber als unspezifisches Symptom konnte im Blutkreislauf zirkulierendes IL-1 festgestellt werden. Eine zentrale Rolle im Rahmen verschiedener Entzündungsreaktionen zeigt auch der Nachweis von hohen IL-1-Konzentrationen bei Arthritiden in der Synovialflüssigkeit sowie bei bakteriellen Meningitiden im Liquor. [30]

Für IL-1 existieren zwei miteinander verwandte Gene, von welchen das IL1A-Gen für IL-1 $\alpha$  und das IL1B-Gen für IL-1 $\beta$  codiert. Ganz im Gegensatz zu IL-1 $\alpha$  wird IL-1 $\beta$  in Zellen gesunder Menschen nicht exprimiert und es sind eine Reihe intrazellulärer Prozesse notwendig, bevor es seine inflammatorische Wirkung entfaltet.

Zur Synthese von IL-1 $\beta$  scheinen nur ein paar wenige Zellen befähigt, zu welchen vor allem Monozyten sowie Gewebsmakrophagen und dendritische Zellen gehören.

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Synthese ist die Transkription, welche einerseits durch einen mikrobiellen Reiz, jedoch auch durch andere Zytokine wie IL-18, IL-1 $\alpha$ , TNF und sogar durch IL-1 $\beta$  selbst induziert werden kann. Diese Selbstinduktion scheint auch maßgeblicher Teil des Mechanismus bei der Autoinflammation zu sein.

IL-1 $\beta$  wird zunächst als inaktiver Vorläufer synthetisiert und muss durch intrazelluläre Spaltung durch eine Cysteinprotease, die Caspase 1, in seine biologisch aktive Form überführt werden. [26]

Es wurden zwei verschiedene IL-1-Rezeptoren auf den Zielzellen identifiziert. Der Typ-I-Rezeptor ist auf der Plasmamembran von T-Zellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen und Chondrozyten, der Typ-II-Rezeptor auf B-Zellen, Neutrophilen, Monozyten und Knochenmarkszellen nachweisbar. [30]

Das NLRP3-Inflammasom ist ein Regulator der IL-1 $\beta$ -Synthese. Die Tatsache, dass dieses durch die Anreicherung verschiedener metabolischer Substrate, unter anderem Cholesterin, Glucose, Ceramid, Mononatriumurat, aktiviert werden kann, legt einen Zusammenhang von metabolischem Stress und einer IL-1 $\beta$ -vermittelten inflammatorischen Reaktion nahe. Dies wiederum lässt ein großes therapeutisches Potential hinsichtlich der Blockade von IL-1 bei Erkrankungen wie der Koronaren Herzkrankheit, Diabetes mellitus oder Gicht vermuten. [25,49]

Mithilfe maligner Monozytenzelllinien konnte ein Interleukin-1-hemmender Faktor (IL-1-ra) extrahiert werden, welcher sich im Bindungsverhalten an T-Zellen als kompetitiv mit IL-1 erwies. Bereits in vitro konnten in vielen Untersuchungsansätzen verschiedenste antiinflammatorische Wirkungen des rekombinanten IL-1-ra gezeigt werden. [30]

In manchen Bereichen der Medizin ist die IL-1-Blockade aktuell bereits ein Ansatzpunkt von Therapien autoinflammatorischer Erkrankungen. Hierzu gehören vor allem Erkrankungen des rheumatoiden Formenkreises wie kristallinduzierte Arthropathien oder Morbus Still. [25] Es wurden mittlerweile verschiedene IL-1-Blocker mit unterschiedlichen Wirkweisen zugelassen; unter anderem der IL-1-ra Anakinra, welcher den IL-1-Rezeptor blockiert und dadurch die Aktivität von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  heruntersetzt, weiterhin Rilonacept, ein löslicher „Täuschungsrezeptor“ sowie Canakinumab, ein neutralisierender monoklonaler Antikörper gegen Interleukin-1 $\beta$ . [26]

Mit der Einführung des rekombinanten IL-1-ra als Therapeutikum eröffneten sich ganz neue Möglichkeiten in der Intervention vieler Erkrankungen [110].

### **2.3.2 Zytokine in der Schwangerschaft**

Zytokine sind als Teil eines sensiblen Gleichgewichts an verschiedensten Vorgängen in der gesamten Schwangerschaft beteiligt [88,110].

So konnten Studien beispielsweise ihren regulierenden Einfluss auf die Reifung des Gebärmutterhalses im Sinne einer Modulation dessen mechanischer Eigenschaften aufzeigen. Hierzu zählen, neben einer massiven Verstärkung der lokalen Prostaglandinproduktion, die Änderung des Glycosaminoglycan-Musters innerhalb der zervikalen extrazellulären Matrix sowie eine Verringerung des Kollagengehaltes durch eine IL-1-abhängige Kollagenasen-Produktion. Darüber hinaus ist eine chemotaktische Wirkung sowohl von IL-8 als auch MIP-1 $\alpha$  beschrieben, welche eine Invasion von Leukozyten in das zervikale Stroma mit anschließender Freisetzung verschiedener proteolytischer Enzyme wie Elastasen, Kollagenasen, Gelatinasen, bewirken kann. Die genannten Mechanismen führen zu einem Aufweichen der Zervix sowie zu einer Verringerung der Zugfestigkeit der fetalen Membranen, was einen Bruch dieser nach sich ziehen kann. [17,28,110]

Im Jahr 2015 wurde eine Arbeit über den Einfluss von Gestagenen auf die Vorgänge der Membranschwächung veröffentlicht. Diese beschäftigte sich insbesondere mit den Thrombin- und TNF-induzierten Schwächungen der fetalen Membranen durch erhöhte GM-CSF-Konzentrationen. Die GM-CSF-vermittelte Reduktion der Bruchfestigkeit konnte jedoch durch eine Vorbehandlung mit Progesteron und den von Progesteron abgeleiteten Derivaten inhibiert werden. [56] Diese Beobachtung wird durch die Arbeit von Nold et al. 2021 untermauert, welche anhand eines Mausmodells aufzeigen konnte, dass GM-CSF das Verhältnis von Matrix-Metallopeptidasen (MMPs) und deren Inhibitoren (Tissue Inhibitor of Metalloprotease [TIMP]) signifikant verändert. Die Zunahme von Metallopeptidasen, verbunden mit einer gleichzeitigen Abnahme der Inhibitoren, führt zu einer Schwächung der Amnionmembranen und kann somit einen PROM und darüber hinaus eine PTB nach sich ziehen. [75]

Neben den geburtseinleitenden Vorgängen haben manche Zytokine auch Einfluss auf den Geburtsvorgang selbst. Laut Winkler et al. 1996 ist anzunehmen, dass IL-6 bei der muttermundswirksamen Wehentätigkeit eine tragende Rolle zukommt. Es liegt hierbei in erhöhten Konzentrationen vor, da es die Uteruskontraktilität direkt zu beeinflussen scheint. Zudem vermag es eine tragende Rolle bei der physiologischen Entwicklung der Plazenta zu spielen. [110]

In der Vergangenheit konnten bereits erste Studien Nabelschnurblut nutzen, um Zusammenhänge zwischen Pathologien in der Schwangerschaft und Veränderungen bestimmter Zytokine zu untersuchen. So ließ sich beispielsweise durch die Arbeit von Lindner et al. 2013 ein Zusammenhang zwischen SGA-Neonaten (small for gestational age) und den Konzentrationen von IL-8, IL-12p40 und G-CSF im venösen Nabelschnurblut aufzeigen, welche somit als ursächlich für eine IUGR sowie eine entsprechend erhöhte Morbidität und Mortalität in Betracht zu ziehen sind. [63]

Bekanntlich können auch immunologische Reaktionen auf Alloantigene des Fetus zu Pathologien in der Schwangerschaft führen, sodass eine Begrenzung dieser Immunantworten von großer Bedeutung für einen unkomplizierten Verlauf ist. IL-10 ist in der Lage mithilfe unterschiedlicher Mechanismen, eine Art Toleranz gegenüber den genannten Antigenen zu fördern und somit Ereignisse wie eine PTB ggf. zu vermeiden. Neben dem Auftreten einer PTL mit ggf. folgender PTB wird auch davon ausgegangen, dass die IL-10-Konzentration mit dem Auftreten anderer Komplikationen korreliert. [68]

Zusätzlich zu den teilweise antagonistisch wirkenden Zytokinen, wurden in verschiedenen Untersuchungen jedoch auch Rezeptorantagonisten (z.B. IL1-ra) in Fruchtwasser-Proben nachgewiesen, welche ebenso zu einem Gleichgewicht und damit zu einem unkomplizierten Schwangerschaftsverlauf beitragen [88,110].

### **2.3.3 Zytokine im kindlichen Organismus**

Zytokine erreichen den kindlichen Organismus in der Schwangerschaft einerseits über Plazenta und Nabelschnur, wobei der Effekt der hämatogen vorhandenen Entzündungsmediatoren auf den Feten von der Höhe ihrer Konzentration abhängt. Andererseits jedoch auch durch fetale Schluck- und Atembewegungen, wodurch die im Fruchtwasser befindlichen Zytokine in den Gastrointestinaltrakt sowie in die Lunge gelangen. [88]

Perinatale entzündliche Erkrankungen und Komplikationen wie Schäden der weißen Substanz (PVL), akute sowie chronische Lungenerkrankungen (ANS, BPD), aber auch

Multiorganschäden sowie der Schock sind mit einem Ungleichgewicht von Zytokinen verbunden [38]. So kann beispielsweise eine unzureichende Zytokinausschüttung in der fetalen, noch unreifen Lunge nachfolgend für ein schweres ANS und ein anhaltendes fetales Kreislaufsyndrom sorgen. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass IL-1 analog zu Glucocorticoiden durch Bindung an intrapulmonale Rezeptoren die Surfactantbildung zu beschleunigen und somit die Lungenreife zu unterstützen vermag. Andererseits sorgen Zytokine für eine Invasion proinflammatorischer Zellen in das pulmonale Gewebe, was eine Prädisposition für die spätere Entwicklung einer BPD darstellt. [28,38,88]

Die fetale Blut-Hirn-Schranke kann ungehindert von Zytokinen überwunden werden, wobei auch eine intrathekale Synthese und eine Bindung an dort vorhandene Rezeptoren stattfinden kann. Es wird vermutet, dass durch vermehrte Zytokinausschüttung eine Fragilitäts-erhöhung der kapillären Endstrombahn im fetalen Plexus choroideus bewirkt wird und es dadurch sowohl zu Blutungen als auch einer PVL kommen kann. [24,88] So wurde beispielsweise 2006 eine Studie veröffentlicht, welche sich mit verschiedenen Zytokinen als Vorhersagefaktor für das Outcome nach stattgehabter Hypoxisch-ischämischer Enzephalopathie (HIE) beschäftigt. IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  waren im Liquor der Probanden der Experimentalgruppe signifikant erhöht, jedoch erbrachte IL-1 $\beta$  das aussagekräftigste Ergebnis. Die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen zeigten sowohl die höchste Korrelation mit dem Schweregrad der HIE, als auch den höchsten Liquor-Serum-Quotienten. Darüber hinaus konnte IL-1 $\beta$  als prädiktiver Faktor für auffällige neurologische Befunde mit einer Sensitivität von 88% und einer Spezifität von 80% herausgefiltert werden. [2]

In einer großen Studie zur neonatalen Sepsis eignete sich TNF- $\alpha$  im Nabelschnurblut als bester prädiktiver Parameter für das Auftreten innerhalb der ersten 48 Lebensstunden. Für die Diagnose der Neugeborenen-sepsis zeigten sich wiederum IL-6 und der Rezeptorantagonist IL-1-ra als sensitivste Parameter. Weiterhin konnte eine Korrelation zwischen der IL-6-Konzentration im Nabelschnurblut und typischen Komplikationen der Neonatalperiode, wie beispielsweise der Sepsis, der NEK sowie intrazerebralen Blutungen, aufgezeigt werden. [88,107] Im Rahmen der neonatalen Immunantwort gilt IL-6 bereits seit Jahren als sensitiver Parameter für die Detektion bakterieller Infektionen beim Neonaten [18,74]. Jüngere Studien belegen auch seine Funktion als prädiktiven Faktor für eine Early-Onset-Sepsis, insbesondere auch nach PROM, sodass dies in Bezug auf die neonatale Morbidität von großer Bedeutung ist [22,67,85].

Laut Buonocore et al. 1995 spielt auch der Geburtsmechanismus eine entscheidende Rolle hinsichtlich des Vorhandenseins bzw. der Höhe verschiedener Zytokinkonzentrationen im Nabelschnurblut und dadurch auch im neonatalen Kreislauf. Den Untersuchungen zufolge

hatte die natürliche vaginale Entbindung höhere Plasmaspiegel von IL1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  sowie höhere (O<sub>2</sub>-)Level zur Folge.

Dies verdeutlicht noch einmal die Rolle der Wehen in der Immunabwehr des Neugeborenen. [19]

## 2.4 Einfluss aszendierender Infektionen auf Zytokinhaushalt, Schwangerschaftsverlauf und die Neonatalperiode

Vor allem bei Vorliegen aszendierender Infektionen kommt den hierbei involvierten Zytokinen eine zentrale Bedeutung bei der Genese der PTB zu. Doch nicht nur die Schwangerschaft, sondern auch die weitere Entwicklung des Neonaten kann hierdurch nachhaltig beeinträchtigt werden. Die oben genannten Komplikationen bei Frühgeburtlichkeit können einerseits einem geringen GA bei Geburt geschuldet, jedoch biochemisch auch auf ein Zytokinungleichgewicht zurückzuführen sein. [28,88]

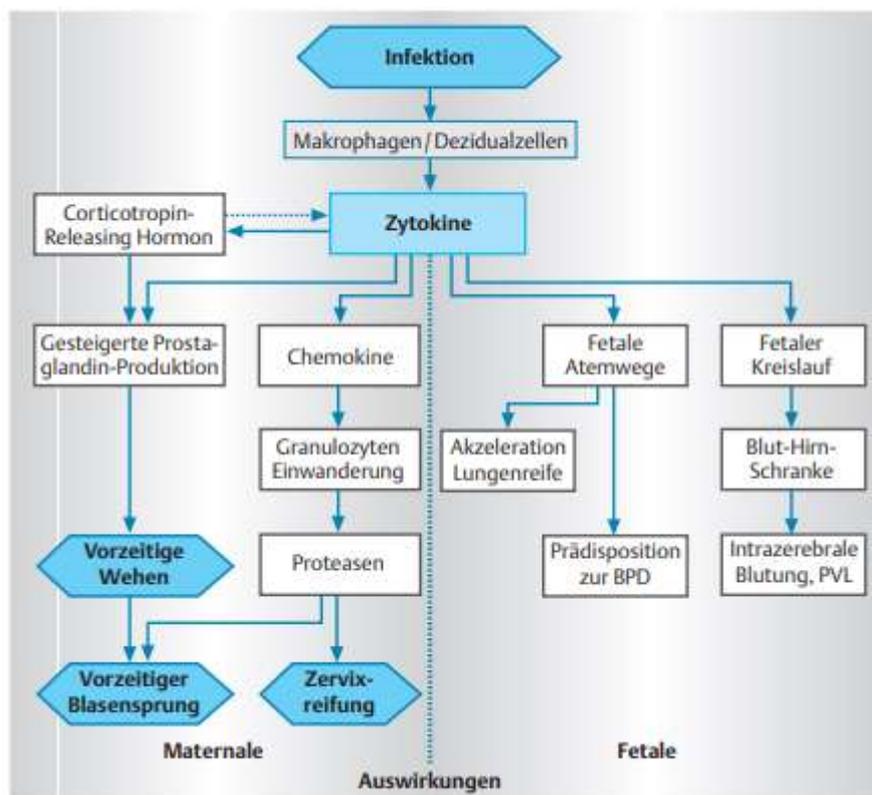


Abbildung 5: Maternale und fetale Auswirkungen bei intrauterinen Infektionen (Reimer et al. 2000)

In der Vergangenheit konnte bereits vielfach nachgewiesen werden, dass eine infektionsbedingte Freisetzung proinflammatorischer Entzündungsmediatoren zu einer PTL führt [28,88]. Durch bakterielle Antigene aktivierte Immunzellen in den Membranen von

Dezidua, Plazenta und Fetus sezernieren dort eine Vielzahl von Immun- und Entzündungsmediatoren. Neben TNF- $\alpha$  und IL-1, welche bevorzugt von aktivierten Makrophagen ausgeschüttet werden, konnte eine Reihe weiterer Zytokine, unter anderem IL-6, IL-8, IL-10 und G-CSF in intrauterinen Geweben sowie im Fruchtwasser identifiziert werden. Dezidua-, jedoch auch in geringerem Ausmaß Amnion- und Chorionzellen, sind zur Synthese von IL-10 befähigt, welche vor allem bei infektiös bedingten Wehen anzusteigen scheint. Bei Wehentätigkeit am Termin hingegen scheinen die IL-10-Konzentrationen eher abzufallen. [28] Die perinatale Synthese der Prostaglandine durch intrauterine Gewebe kann durch Zytokine also sowohl hoch-, als auch herunterreguliert werden, wobei proinflammatorische Zytokine eine vermehrte und antiinflammatorische Zytokine eine verminderte Ausschüttung bewirken. So haben verschiedene Studien gezeigt, dass IL-1 $\beta$  die PGE<sub>2</sub>-Freisetzung deutlich zu erhöhen vermag. IL-10 hingegen konnte eine Inhibition sowohl der Prostaglandin- E<sub>2</sub>- in intakten fetalen Membranen, als auch eine Inhibition der IL-1 $\beta$ -Synthese bewirken. [16,17,28,110]

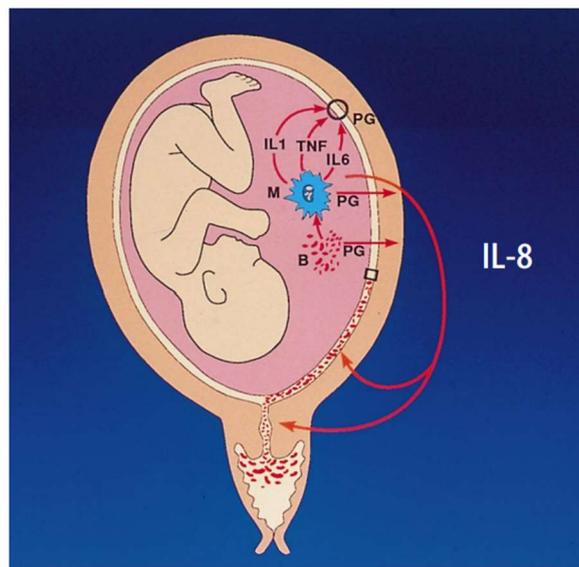


Abbildung 6: Immunologische Vorgänge bei vorzeitiger Wehentätigkeit (Springer Verlag 2010; Egarter, Friese)

Nach stattgehabter mikrobieller Invasion der Amnionhöhle (Microbial Invasion of the Amniotic Cavity [MIAC]) kann diese im Verlauf zu einer Infektion maternaler und fetaler Kompartimente führen, was sich ebenfalls durch veränderte Entzündungsmediatoren objektivieren lässt. In Rahmen einer Untersuchung aus dem Jahr 2007 eigneten sich die Konzentrationen mehrerer Zytokine (IL6, IL-8, IL-18, MCP-1, MCP-3) im Fruchtwasser bei PTL und PROM zur Vorhersage einer histologischen Chorioamnionitis (HCA). [45] Weiterhin konnten sowohl ältere als auch jüngere Studien einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Chorioamnionitis sowie einer vaskulären Ausdehnung dieser mit der Entwicklung eines Infektionssyndroms der Mutter und einer nachfolgenden neonatalen Entzündungsreaktion

bzw. Sepsis aufzeigen. Es wurde unter anderem auf einen signifikanten Zusammenhang zwischen CRP im mütterlichen Blut und Höhe der Zytokinkonzentrationen im Fruchtwasser aufmerksam gemacht. Hier erwiesen sich IL-1 $\beta$  als der geeignetste Vorhersagefaktor für eine vaskuläre Ausdehnung der Chorioamnionitis und TNF- $\alpha$  für die Entwicklung einer schweren Neugeboreneninfektion. [8,52,88] Darüber hinaus wurde durch Cayabyab et al. 2003 ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein einer HCA und dem Nachweis von IL-1 $\beta$  im Trachealspirat hergestellt. Auch ergab sich eine Korrelation mit der Gesamtzellzahl, der Granulozyten- und Makrophagenanzahl sowie dem Vorhandensein von IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  im Trachealspirat. Hinsichtlich des neonatalen Outcome stellte sich heraus, dass Frühgeborene, welche initial IL-1 $\beta$ -positives Sekret aufwiesen, eine längere assistierte Beatmung, häufiger die Notwendigkeit einer Sauerstoffapplikation sowie eine insgesamt längere Therapiedauer benötigten. [20]

Da ein PROM entweder als Komplikation oder Ursache eng mit aufsteigenden Infektionen verknüpft ist, wurde auch dieser hinsichtlich resultierender Komplikationen Mittelpunkt vieler Nachforschungen [15].

Sowohl bei MIAC als auch bei HCA bzw. intraamniotischer Inflammation nach PROM konnten höhere IL-6-Spiegel im Nabelschnurblut der Neonaten detektiert werden.

In einer Arbeit aus dem Jahr 2018 wurde zudem das neonatale Outcome nach MIAC und intraamniotischer Inflammation anhand des Vorhandenseins eines FIRS und der damit verbundenen Raten des Auftretens einer Early-Onset Sepsis sowie einer IVH I° und II° untersucht. Den Ergebnissen zufolge hat die Höhe der IL-6-Konzentrationen im Nabelschnurblut mit den FIRS-Raten korreliert. Außerdem standen die genannten neonatalen Komplikationen und somit auch die neonatale Morbidität im Zusammenhang mit dem Auftreten eines FIRS. [52,72,85]

## **2.5 Entwicklung der Fragestellung**

Der Zusammenhang zwischen einem PROM, intrauterinen Infektionen und einer damit verbundenen PTB wurde in der Vergangenheit mehrfach belegt. Im Rahmen dieser Prozesse sind Zytokine als Mediatoren des Immunsystems zentraler Schlüssel- und Regulationspunkt der damit verbundenen Vorgänge.

Die PTB stellt trotz des medizinischen Fortschritts immer noch ein bedeutendes und je nach Nation auch mehr oder weniger präsent soziales und wirtschaftliches Problem dar, da mit dieser eine nicht zu missachtende Morbidität und Mortalität vergesellschaftet sind. [81] Bekanntlich sind Veränderungen des Zytokinhaushalts im Sinne eines Ungleichgewichts sowohl an der Genese der PTB als auch an den daraus resultierenden Komplikationen der

Neonatalperiode maßgeblich beteiligt und haben somit in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen [28,88]. Manche Zytokine sind bereits Bestandteil diagnostischer Methoden, andere lassen weiterhin Aussicht auf einen Ansatz sowohl im Rahmen der Präventivdiagnostik als auch im therapeutischen Bereich. So hat sich IL-6 bekanntlich als diagnostischer Parameter bei Infektionen bewährt. Laut verschiedener Studien eignet es sich jedoch zudem als prädiktiver Marker für die neonatale Sepsis sowie für die PTB. [22,58,67,85]

Bisher wurden zur Objektivierung der Vorgänge bei Frühgeburtlichkeit, vorherigem PROM oder intrauterinen Infektionsgeschehen zumeist Untersuchungen des Fruchtwassers herangezogen. Jüngere Studien haben sich zunehmend mit der Untersuchung von Nabelschnurblut, insbesondere im Hinblick auf das neonatale Outcome, beschäftigt. [59] Vor allem eine stattgehabte PTB mit Keimexposition kann schwerwiegende Komplikationen für den Neonaten nach sich ziehen, die es zu verhindern gilt.

Zur Etablierung präventiver Maßnahmen in der Medizin, ist die Identifikation prädiktiver und prognostischer Parameter notwendige Voraussetzung. Auch wenn solche Ansatzpunkte bereits teilweise erarbeitet wurden, werden der PROM und die häufig damit einhergehende PTB dennoch ein relevantes Thema bleiben. Daher sind weitere Erkenntnisse über die fetale Immunantwort im Rahmen ebensolcher pathologischen Prozesse wie dem PROM von umso größerer Bedeutung. Sie eröffnen die Möglichkeit den stattgehabten Schwangerschafts-, insbesondere aber auch den postnatalen Verlauf besser nachvollziehen und ggf. positiv beeinflussen zu können.

Die genannte Zielsetzung als Hintergrund, wurden im Rahmen dieser Arbeit eine ganze Reihe verschiedener pro- und antiinflammatorischer Zytokine im fetalen Nabelschnurblut Frühgeborener aus Sri Lanka mit PROM analysiert. Weiterhin ist eine Untersuchung der fetalen Immunantwort bei vaginaler Entbindung und Entbindung per CS hinsichtlich des GA's bei Geburt sowie des Geschlechts der Neonaten auf statistisch signifikante Zusammenhänge erfolgt. Gerade hinsichtlich des Geburtsmodus ist ein Zusammenhang mit unterschiedlichen Zytokinexpressionen naheliegend, da bekanntlich bei einer natürlichen Geburt verschiedene inflammatorische Reaktionen ablaufen, von welchen eine Vielzahl durch Zytokine vermittelt wird. Diesbezüglich liegen jedoch durch verschiedene Forschungsgruppen differente Ergebnisse vor, sodass hier ein großes Interesse bestand, weitere Nachforschungen anzustellen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Patientenauswahl und Gewinnung der Blutproben

Zum Patientenkollektiv gehören Neonaten von Müttern aus Sri Lanka, bei welchen es während der Schwangerschaft zum Auftreten eines PROM's kam und die Schwangerschaft durch eine PTB, das heißt vor Vollendung der 37. SSW, endete. Das GA lag hierbei im Bereich von 28+ bis 36+ SSWs.

Da das GA essentiell für die Definition einer PTB ist, wurde dieses mit Hilfe der Naegele-Regel, soweit möglich, nachvollzogen. Hierbei wird der erste Tag der letzten Menstruationsblutung als Ausgangspunkt zur Berechnung des Geburtstermins verwendet und hierüber auch das GA in Tagen und Wochen festgelegt. Die Formel lautet: Errechneter Geburtstermin = Erster Tag der letzten Regelblutung + 9 Monate + 7 Tage. Bei der erweiterten Naegele-Regel wird zusätzlich die individuelle Zykluslänge berücksichtigt und in die Formel miteinbezogen: Errechneter Geburtstermin = Erster Tag der letzten Regelblutung + 9 Monate + 7 Tage ± Abweichungen vom 28-Tage-Zyklus in Tagen. [15,34,100] Das GA wurde ebenfalls durch Ultraschallkontrollen und -messungen überprüft. Diskrepanzen zu dem errechneten GA von mehr als einer Woche wurden gemäß des Ultraschall-Befundes korrigiert. Außerdem wurden die Ergebnisse durch körperliche Untersuchungen der Neonaten nach Geburt bestätigt. [34]

In der PROM-Gruppe betrug das mittlere Lebensalter der Mütter 29,58 Jahre. Sowohl natürliche Geburten, als auch Entbindungen per CS sowie Mehrlingsschwangerschaften wurden in das Kollektiv aufgenommen. Ausgeschlossen wurden Frauen mit schwerwiegenden chronischen oder akuten Infektionen sowie mit einer Schwangerschaftshypertonie (Pregnancy induced hypertension [PIH]). Die Kontrollgruppe bildeten ebenfalls Frühgeborene aus Sri Lanka. Das mittlere Lebensalter der Frauen betrug 30,26 Jahre. Hierbei galten dieselben Ausschlusskriterien wie in der Experimentalgruppe.

Die Häufigkeit der postnatalen Aufnahme auf Intensivstation (Intensive care unit [ICU]) lag mit 61,9% in der Kontrollgruppe deutlich über dem Anteil intensivpflichtiger Neonaten der PROM-Gruppe (38,1%). Bei den postnatal erhobenen 5 Minuten-APGAR-Werten konnte im Mittel ein zu vernachlässigender Unterschied festgestellt werden. (PROM-Gruppe: 9,65, Kontrollgruppe: 9,74). Der APGAR-Wert dient bekanntlich der schnellen Einschätzung eines Neugeborenen nach Geburt bzw. der erneuten Beurteilung nach erfolgten Reanimationsmaßnahmen im Hinblick auf Zeichen einer hämodynamischen Beeinträchtigung. Dabei werden folgende Parameter miteinbezogen: Hautfarbe, Herzfrequenz, Reflexe, Muskeltonus und Atmung bzw. **A**ppearance, **P**uls, **G**rimace, **A**ctivity und **R**espiration. [61,98]

Nach der Geburt wurde umgehend die Nabelschnur an beiden Enden abgeklemmt, durchtrennt und das fetale Blut für die Proben aufgefangen.

Für die Genehmigung ist in Deutschland die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes vor Gewinnung der Blutproben über die Studie in Kenntnis gesetzt worden und hat dieser zugestimmt (No. SN 68/05, 24.05.2005). In Sri Lanka wurde das Ethical Review Committee der medizinischen Fakultät der Universität von Colombo bezüglich des Vorhabens kontaktiert und hat dieses ebenfalls genehmigt (No. EC/04/094, 10.02.2005). Zudem ist durch das dortige Gesundheitsministerium (Ministry of Health Care, Nutrition and Uva Wellassa Development) (No. DDG(MS)01/2004), 11.01.2005) sowie durch den Direktor der Partnerinstitution Castle Street Hospital for Women (CSHW) (Colombo 08, Sri Lanka) die Erlaubnis erteilt worden. [34]

## Übersicht Probandenkollektive

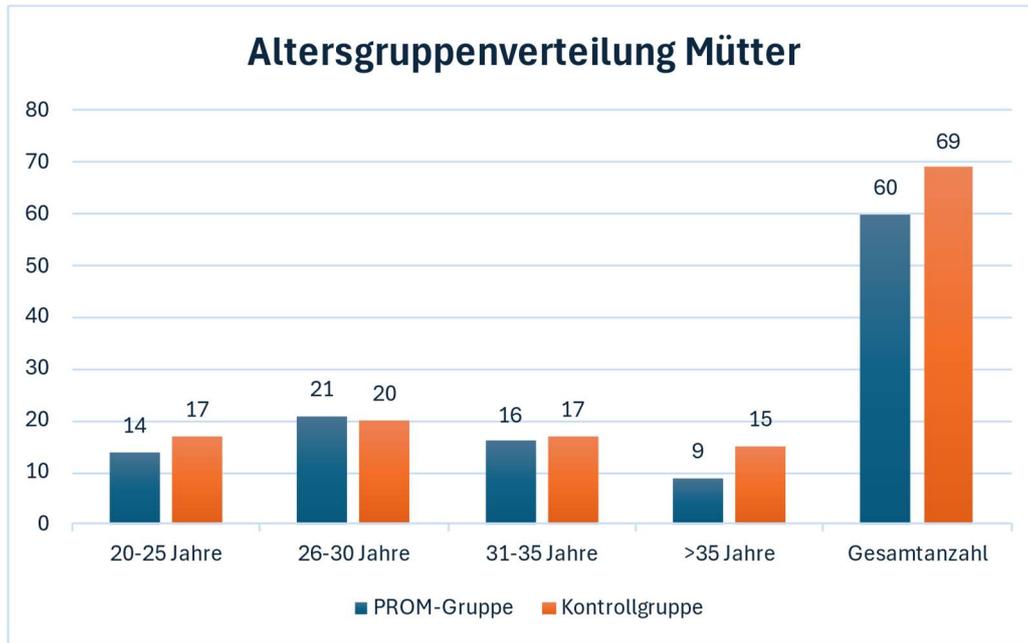


Abbildung 7: Altersgruppenverteilung Mütter

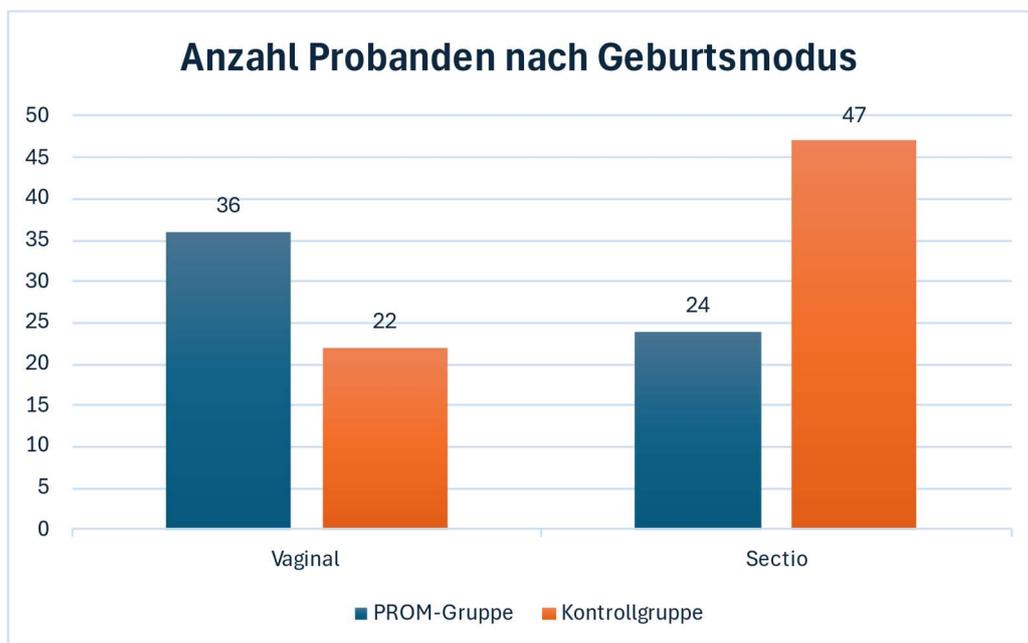


Abbildung 8: Anzahl Probanden nach Geburtsmodus

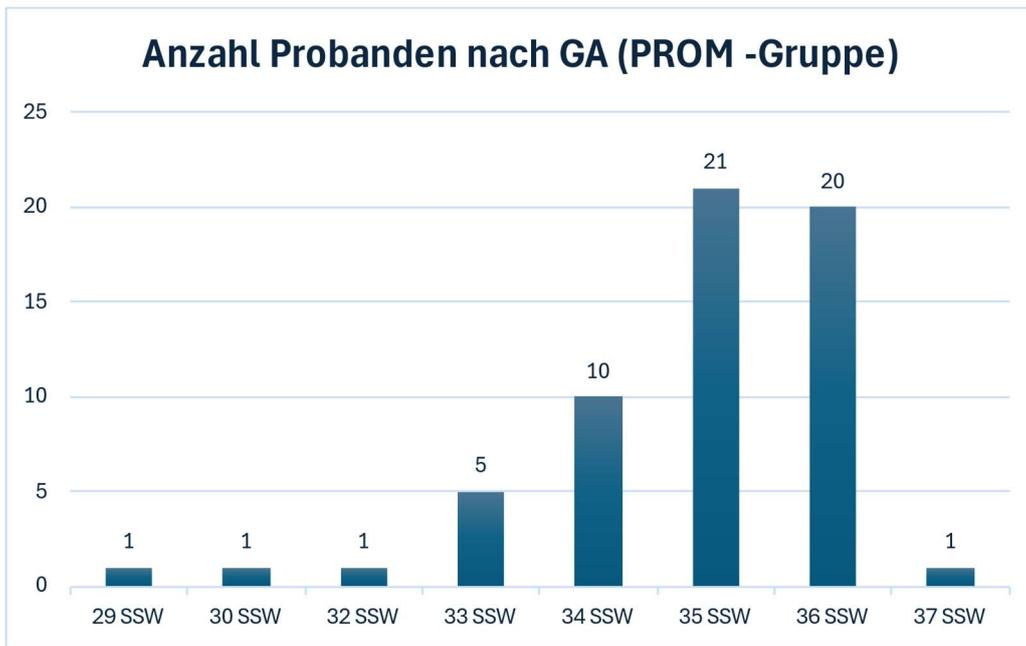


Abbildung 9: Anzahl Probanden nach Gestationsalter (PROM-Gruppe)

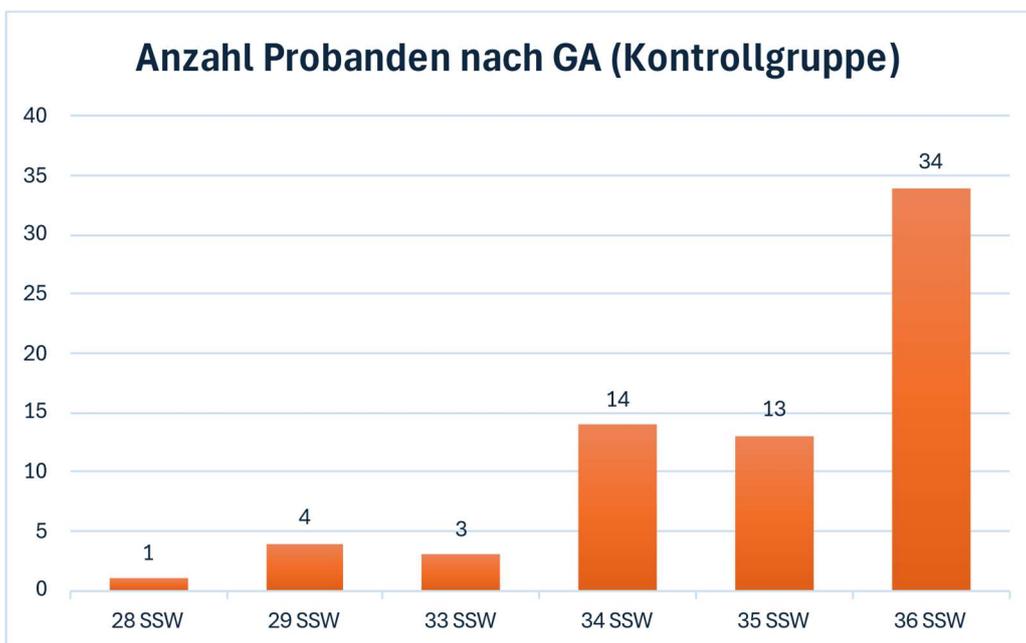


Abbildung 10: Anzahl Probanden nach Gestationsalter (Kontrollgruppe)

### Auffälligkeiten in der Schwangerschaft (PROM-Gruppe)

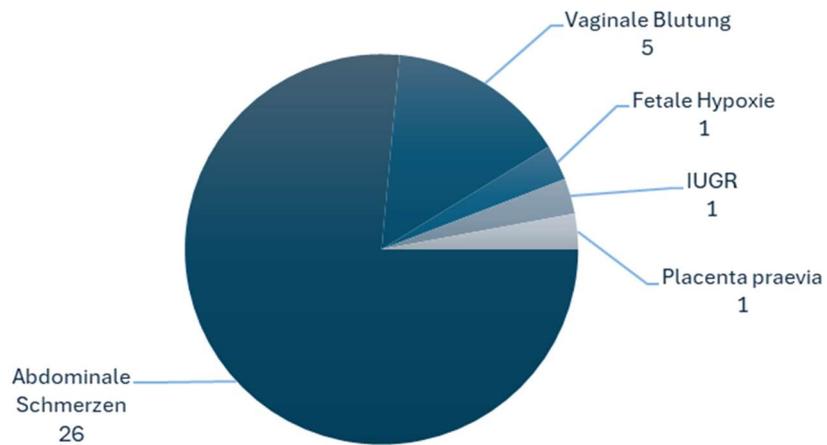


Abbildung 11: Auffälligkeiten in der Schwangerschaft (PROM-Gruppe)

### Auffälligkeiten in der Schwangerschaft (Kontrollgruppe)

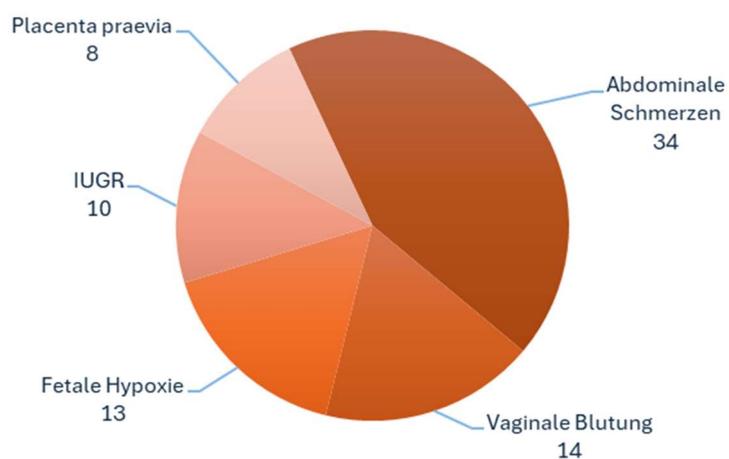


Abbildung 12: Auffälligkeiten in der Schwangerschaft (Kontrollgruppe)

## 3.2 Materialien

### 3.2.1 Lösungen, Puffer, Kits

Tabelle 1: Verwendete Lösungen

| Lösung               | Hersteller                           |
|----------------------|--------------------------------------|
| Destilliertes Wasser | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland   |
| Ethanol (>99.8%)     | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA    |
| xMAP Sheath Fluid    | Luminex Corporation, Austin, TX, USA |

Tabelle 2: Verwendete Kits

| Kit   | Hersteller                           |
|---|--------------------------------------|
| MILLIPEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel | Merck Millipore, Billerica, MA, USA  |
| Luminex 100/200 Performance Verification Kit              | Luminex Corporation, Austin, TX, USA |
| Luminex 100/200 Calibration Kit                           | Luminex Corporation, Austin, TX, USA |

### 3.2.2 Gerätschaften

Tabelle 3: Verwendete Gerätschaften

| Gerät                               | Hersteller  |
|-------------------------------------|---|
| Centrifuge 5415 R                   | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                        |
| Thermomixer comfort                 | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                        |
| Vibrofix VF1                        | IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland |
| SONOREX RK 102 M                    | BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland    |
| Pipette                             | Gilson, Inc., Middleton, WI, USA                          |
| Multipette                          | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                        |
| Syringes classical type 1 (1,25 ml) | VWR International, Radnor, PA, USA                        |
| CS 1000 Autoplex Analyzer           | PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA                       |
| CS 1000 Sheath D                    | PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA                       |

|                   |  |
|-------------------|--|
| Micro tube 1.5 ml | Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland |
| Magnetplatte      |  |

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Konservierung der Blutproben

Wie bereits zuvor beschrieben, wurde das fetale Blut nach Abklemmen und Durchtrennung der Nabelschnur komplett aufgefangen. Die Proben wurden gesammelt und unter aseptischen Bedingungen in EDTA-Röhrchen von 2,7ml oder 1,3 ml Größe mit K-Heparin als Antikoagulanzen sowie in Serum-Röhrchen überführt.

Anschließend erfolgte innerhalb von 30 Minuten die Zentrifugation des Blutes für 10 Minuten bei 1000g. Das Serum konnte als Überstand abpipettiert und in andere Röhrchen überführt werden, welche dann bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert wurden.

#### 3.3.2 Proben- und Reagenzienvorbereitung

Zunächst musste man die benötigten Proben auftauen lassen und einige Sekunden vortexen, um eine ausreichende Durchmischung zu erzielen. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 10.000g für 10 Minuten und die Proben wurden zur Kühlung auf Eis gelagert.

Zur Vorbereitung der Reagenzien wurde jedes der 14 Antibody-Immobilized Beads Fläschchen für 30 Sekunden im Ultraschallbad sonifiziert und daraufhin für eine Minute durch Vortexen durchmischt. Es wurden jeweils 60µl aus jedem der Fläschchen in eine Mixing Bottle überführt. Anschließend wurde die Mixing Bottle auf 3,0ml mit Beat Diluent aufgefüllt, was einer Menge von  $3000\mu\text{l} - (14 \times 60\mu\text{l}) = 2160\mu\text{l}$  entspricht. Es folgte kräftiges Vortexen.

Der nächste Abschnitt entspricht der Präparation der Qualitätskontrollen. Hierzu musste der Gummiverschluss nicht vollständig von den Fläschchen gelöst werden. Die Flüssigkeiten konnten über einen Schlitz hinzugegeben und durch über Kopf schwenken vermischt werden. Die Kontrollen 1 und 2 wurden mit je 250µl Eppendorf-Wasser gelöst, daraufhin über Kopf gedreht und sanft gevortext. Es schloss sich eine Inkubation für 5 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur an, wonach die Proben in vorbereitete Eppendorf-Cups gegeben wurden.

Zur Vorbereitung des Waschpuffers musste dieser zunächst auf Raumtemperatur gebracht werden. Nachfolgend wurde 60ml des Waschpuffers mit 540ml Aqua dest vermischt. Zum Lösen des Standards wurden 250µl Aqua dest verwendet, um eine Konzentration von 10.000pg/ml zu erreichen. Es folgte ein über Kopf drehen der Fläschchen mit anschließendem

Vortexen und einer Inkubation bei Raumtemperatur für 5 bis 10 Minuten. Der Inhalt wurde in ein Eppendorf-Cup überführt und als 10.000pg/ml-Standard verwendet. Daraufhin wurden 5 weitere Eppendorf-Cups entsprechend der Konzentrationen 2.000pg/ml, 400pg/ml, 80pg/ml, 16pg/ml, sowie 3,2pg/ml beschriftet und in jedes der Cups 200µl Assay Buffer vorgelegt. Es wurden 50µl des 10.000pg/ml-Standards entnommen und in den 2.000pg/ml-Standard gegeben, gut durchmischt und mit einer neuen Pipettenspitze wiederum 50µl entnommen, um diese in den nächsten Standard zu geben und die Verdünnungsreihe fortzuführen. Als 0-Standard wurde reiner Assay Buffer verwendet. Zuletzt erfolgte die Zugabe von 1ml Aqua dest zur Serum-Matrix mit nachfolgender Durchmischung und Inkubation bei Raumtemperatur für 10 Minuten.

### **3.3.3 Luminex-System**

Für die Bestimmung der Zytokin- und Chemokinkonzentrationen wurde die Luminex xMAP Technologie verwendet. Im Vergleich zu anderen Messverfahren bietet die Luminex Multiplex Assay den großen Vorteil, dass eine gleichzeitige Erkennung, sowie Quantifizierung mehrerer sekretorischer Proteine, wie beispielsweise Chemokinen, Zytokinen, Wachstumsfaktoren usw. ermöglicht wird. [87]

Das Prinzip dieses Verfahrens ähnelt dem einer Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), besitzt jedoch eine höhere Geschwindigkeit, Effizienz und einen größeren dynamischen Bereich. Luminex nutzt farbkodierte Mikropartikel mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen. Durch die Verwendung präziser Konzentrationen dieser Farbstoffe entstehen individuell markierte bead sets, von welchen jedes mit einem spezifischen Capture Antibody („Erfassungs-Antikörper“) besetzt wird. Nachdem eine Probe bzw. ein sekretorisches Protein durch ein bead erfasst wurde, wird ein zweiter Antikörper eingesetzt. Hierbei handelt es sich um einen biotinylierten Detection Antibody („Nachweis-Antikörper“). [87]

Anschließend wird die Probe mit Streptavidin-PE (Streptavidin-Phycoerythrin) inkubiert, das „Reporter Molecule“, welches die Reaktion auf der Oberfläche der einzelnen Mikropartikel komplettiert und somit überhaupt erst die Messung ermöglicht. Streptavidin bindet das Biotin des Detection Antibody mit hoher Affinität. Das daran fixierte Phycoerythrin ist ein intensiv leuchtendes Phycobiliprotein, welches aus roten Algen gewonnen wird. Dieses Protein ist in der Lage, eine extrem hell leuchtende rot-orange Fluoreszenz abzugeben, wenn es durch Laser im Bereich von 488 bis 561nm erregt wird. Die laserinduzierte Stimulation bewirkt eine Lichtemission mit einem Maximum bei 575nm, welche wiederum durch das Luminex-System

erfasst wird. Sowohl die Analyse, als auch die Quantifizierung der sekretorischen Proteine erfolgt mit Hilfe dieser Fluoreszenz-Signale. Grundsätzlich können jeder Probe verschieden markierte beads zugegeben werden, sodass diverse Informationen simultan aus einer einzelnen Probe erhoben werden können. [87]

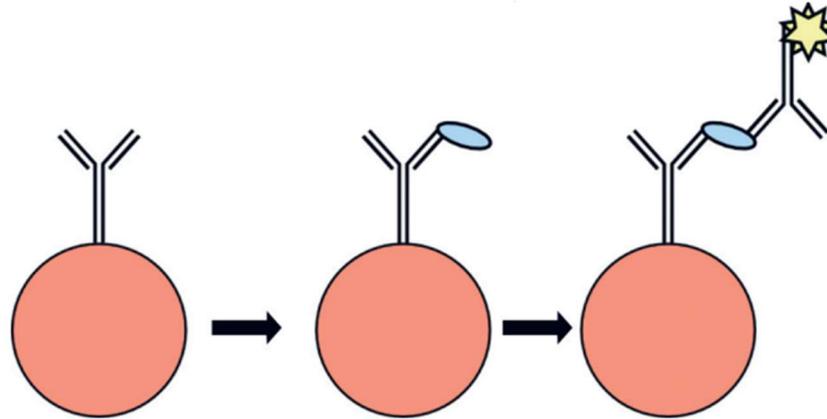


Abbildung 13: Schema Sandwich-Assay – orange = Bead, blau = Analyt, gelb = Fluoreszenzfarbstoff (Radke et al. 2009/2010)

### 3.3.4 Messung der Zytokinkonzentration

Vor Beginn mussten alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden. Als Erstes wurden 200µl Waschpuffer in jedes Well der Platte gegeben, diese mit Folie beklebt und für 10 Minuten auf dem Schüttler bei Raumtemperatur und 550rpm inkubiert. Anschließend wurde der Waschpuffer ausgekippt und die Platte vorsichtig auf Papier ausgeklopft. Da es sich bei den verwendeten Materialien um magnetische Beads handelt, musste die Platte auf einem Magneten platziert und die Neonröhren über dem Arbeitsplatz ausgeschaltet werden.

Im nächsten Schritt wurden je 25µl der Standards mit 0, 3.2, 16, 80, 400, 2000, 10000pg/ml in aufsteigender Reihenfolge sowie je 25µl der Kontrollen in die entsprechenden Wells pipettiert. Weiterhin wurden je 25µl Assay Buffer in die Background-Wells und in die Proben-Wells gegeben sowie je 25µl Serum Matrix sowohl den Background-, den Standard-, als auch den Kontroll-Wells zugefügt. Zuletzt wurden noch je 25µl Plasma-/Serumprobe sowie je 25µl aus der Mixing Bottle, welche vorher noch einmal gevortext werden musste, in die entsprechenden Wells pipettiert. Anschließend wurde die Platte gut verschlossen und auf dem Plattenshaker mit 600rpm inkubiert.

Nach zwei Stunden Inkubation der Platte folgte zweimaliges Waschen. Hierzu wurde die Platte zunächst auf einem Magneten platziert, nach einer Minute geleert und ausgeklopft. Anschließend wurden 200µl Waschpuffer hinzugegeben, die Platte mit einer Folie versiegelt,

vom Magneten genommen und eine Minute geschüttelt. Dieser Vorgang wurde entsprechend noch einmal wiederholt.

Danach wurden 25µl Antikörper jedem Well zugefügt. Die Platte musste wieder gut verschlossen und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Plattenschüttler mit 600rpm inkubiert werden. Im nächsten Schritt wurden 25µl Streptavidin-PE in jedes Well gegeben, die Platte erneut verschlossen und für nochmals 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 500rpm inkubiert. Hiernach folgte erneutes Waschen wie oben beschrieben. Als Nächstes wurden 150µl auf jedes Well pipettiert und die Beads für 5 Minuten auf dem Schüttler resuspendiert.

Zuletzt wurde die Platte in den Luminex gegeben und ausgelesen.

### **3.3.5 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit Hilfe der Statistik- und Analyse-Software SPSS. Um diese entsprechend anwenden zu können, musste zunächst eine korrekte Einteilung der Variablen erfolgen.

Zur Deskription der Daten kann man zwischen quantitativen und qualitativen Daten unterscheiden. Diese Einteilung erfolgt anhand des Skalenniveaus, was die Eigenschaft einer Variablen beschreibt (metrisch/kategorial). Da die Zytokinkonzentrationen durch Messungen erhoben wurden, handelt es sich bei unseren Daten um ein metrisches Skalenniveau und somit um einen quantitativen Datensatz. Weiterhin kann man von metrisch-stetigen Variablen sprechen, da diese theoretisch jeden Wert annehmen können. [99]

Für die Darstellung der Verteilung eines metrisch-stetigen Merkmals eignet sich das Histogramm. Liegt eine Normalverteilung vor, gleicht die Form der Gauß-Kurve, welche auch als „Glockenkurve“ bezeichnet wird. Im Falle unserer Daten zeigte sich jedoch keine Normalverteilung, was nach Analyse sowohl mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test als auch dem Shapiro-Wilk-Test bestätigt werden konnte. [99]

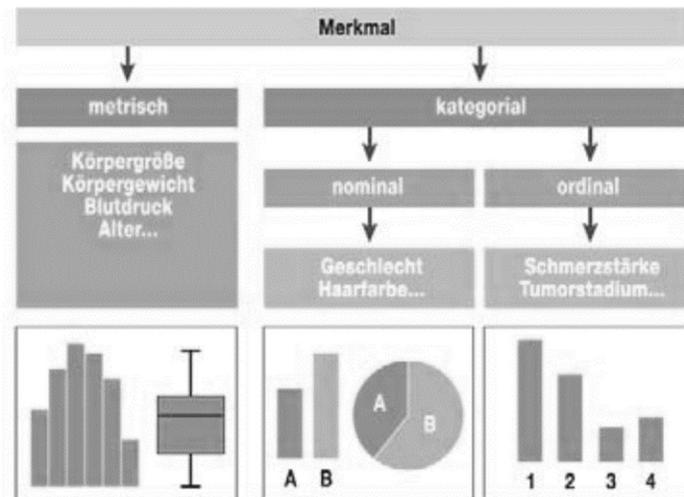


Abbildung 14: Einteilung der Variablen (Ärztblatt, Priestersbach et al. 2009)

Um anschließend die Daten auf statistisch signifikante Zusammenhänge testen zu können, ist die Auswahl des korrekten Testverfahrens obligat.

Die von uns erhobenen Messungen liegen für jeden Probanden des Kollektivs nur zu einem einzigen Zeitpunkt vor und werden mit denen der Kontrollgruppe verglichen, wobei keine Zuordnung von Paaren erfolgte, sodass es sich um unverbundene/unabhängige Stichproben handelt. Dementsprechend wurde der Mann-Whitney-U-Test als nichtparametrischer Test für die Auswertung verwendet. Hierbei wurde das Signifikanzniveau, wie zumeist üblich, bei 5% ( $p < 0,05$ ) festgelegt. [27]

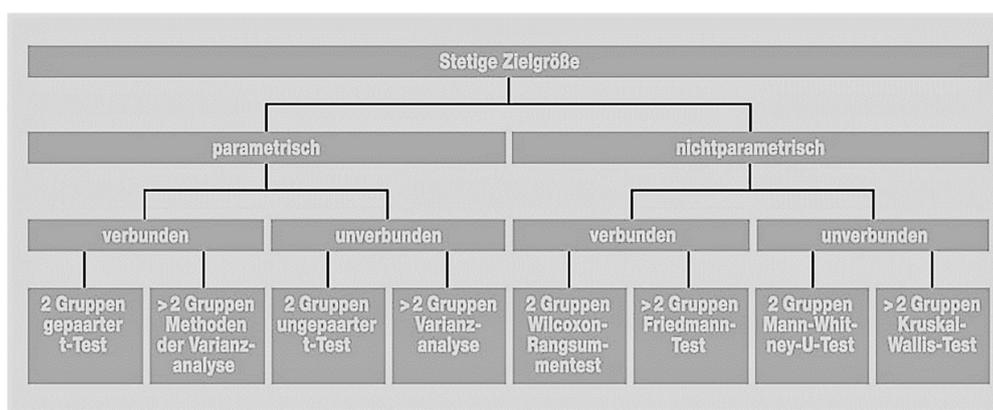


Abbildung 15: Auswahl des geeigneten Tests (Ärztblatt, du Prel et al. 2010)

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Zytokinkonzentrationen im fetalen Nabelschnurblut nach PROM

Insgesamt konnten die Messungen der Zytokinkonzentrationen im fetalen Nabelschnurblut von 129 Probanden in die Auswertung miteinbezogen werden.

Ein Ausschluss erfolgte bei schwerwiegenden akuten oder chronischen Infektionen der Mutter. Außerdem wurden aus der Kontrollgruppe Probanden ausgeschlossen, welche im Verlauf der Schwangerschaft eine PIH entwickelt haben. In verschiedenen Studien konnten bereits hierunter veränderte Zytokinkonzentrationen festgestellt werden, was in der nachfolgenden Diskussion noch einmal genauer beleuchtet wird.

**Tabelle 4: Häufigkeit PROM im Gesamtkollektiv (1 = PROM, 2 = Kontrolle)**

|        |        | Häufigkeit | Prozent | Gültige<br>Prozente | Kumulierte<br>Prozente |
|--------|--------|------------|---------|---------------------|------------------------|
| Gültig | 1      | 60         | 46,5    | 46,5                | 46,5                   |
|        | 2      | 69         | 53,5    | 53,5                | 100,0                  |
|        | Gesamt | 129        | 100,0   | 100,0               |                        |

Nach Auswertung der Häufigkeiten zeigte sich eine ähnliche Größe der beiden Gruppen mit 60 Probanden in der Experimental- und 69 Probanden in der Kontrollgruppe, was jeweils einen prozentualen Anteil von 46,5% bzw. 53,5% ergibt.

In die statistische Testung auf signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden bei einem äußerst großen Datensatz zunächst alle 14 gemessenen Zytokine miteinbezogen.

Wie sich der folgenden tabellarischen Darstellung entnehmen lässt, konnte bei den vier Zytokinen IL-10, GM-CSF, MCP-3 und IL-1 $\beta$  ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den nachgewiesenen Konzentrationen im fetalen Blut und dem Auftreten eines PROMs aufgezeigt werden.

Grenzwertig oberhalb des Signifikanz-Niveaus von 5% lagen hierbei die Unterschiede zwischen den Konzentrationen von IFN- $\gamma$  sowie MCP-1, sodass die Nullhypothese dennoch zu wahrscheinlich ist, um abgelehnt zu werden.

**Tabelle 5: Hypothesenübersicht - Mann-Whitney-U-Test**

|    | Nullhypothese  | Test   | Sig. | Entscheidung              |
|----|--|--|------|---------------------------|
| 1  | Die Verteilung von GCSF ist über die Kategorien von PROM (1 = ja 2 = nein) identisch.      | Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben | ,151 | Nullhypothese beibehalten |
| 2  | Die Verteilung von GMCSF ist über die Kategorien von PROM (1 = ja 2 = nein) identisch.     | Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben | ,023 | Nullhypothese ablehnen    |
| 3  | Die Verteilung von IFNgamma ist über die Kategorien von PROM (1 = ja 2 = nein) identisch.  | Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben | ,054 | Nullhypothese beibehalten |
| 4  | Die Verteilung von IL10 ist über die Kategorien von PROM (1 = ja 2 = nein) identisch.      | Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben | ,003 | Nullhypothese ablehnen    |
| 5  | Die Verteilung von IL12P40 ist über die Kategorien von PROM (1 = ja 2 = nein) identisch.   | Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben | ,108 | Nullhypothese beibehalten |
| 6  | Die Verteilung von IL1alpha ist über die Kategorien von PROM (1 = ja 2 = nein) identisch.  | Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben | ,327 | Nullhypothese beibehalten |
| 7  | Die Verteilung von IL1beta ist über die Kategorien von PROM (1 = ja 2 = nein) identisch.   | Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben | ,033 | Nullhypothese ablehnen    |
| 8  | Die Verteilung von IL6 ist über die Kategorien von PROM (1 = ja 2 = nein) identisch.       | Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben | ,200 | Nullhypothese beibehalten |
| 9  | Die Verteilung von IL8 ist über die Kategorien von PROM (1 = ja 2 = nein) identisch.       | Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben | ,979 | Nullhypothese beibehalten |
| 10 | Die Verteilung von IP10 ist über die Kategorien von PROM (1 = ja 2 = nein) identisch.      | Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben | ,227 | Nullhypothese beibehalten |
| 11 | Die Verteilung von MCP1 ist über die Kategorien von PROM (1 = ja 2 = nein) identisch.      | Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben | ,060 | Nullhypothese beibehalten |
| 12 | Die Verteilung von MCP3 ist über die Kategorien von PROM (1 = ja 2 = nein) identisch.      | Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben | ,019 | Nullhypothese ablehnen    |
| 13 | Die Verteilung von MIP1alpha ist über die Kategorien von PROM (1 = ja 2 = nein) identisch. | Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben | ,288 | Nullhypothese beibehalten |
| 14 | Die Verteilung von TNFalpha ist über die Kategorien von PROM (1 = ja 2 = nein) identisch.  | Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben | ,867 | Nullhypothese beibehalten |

Asymptotische Signifikanzen werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,050.

Bei allen anderen Zytokinen ist die Verteilung der erhobenen Messwerte zwischen den beiden Vergleichsgruppen laut des p-Wertes zu ähnlich, um von einem tatsächlichen Unterschied auszugehen, sodass die Nullhypothese hier ebenfalls beibehalten wurde. Am weitesten entfernt vom Signifikanzniveau und damit den geringsten Unterschied zwischen den beiden Gruppen zeigte der Vergleich der Messwerte von IL8 und TNF $\alpha$ .

#### 4.1.1 IL-10

Die nachfolgende Tabelle sowie der Boxplot veranschaulichen die erhobenen Messwerte von Interleukin-10 im Nabelschnurblut in den beiden zu vergleichenden Gruppen. Vor allem bei Vergleich der Mittelwerte sowie Mediane kann man einen deutlichen Unterschied zwischen PROM- und Kontrollgruppe feststellen. Gegenüber der Kontrollgruppe ist der Mittelwert in der Experimentalgruppe sogar mehr als doppelt so hoch.

**Tabelle 6: Deskriptive Statistik für IL-10 bei Vergleich der beiden Gruppen**

|           | Fallzahl | Mittelwert | Median | Minimum | Maximum |
|-----------|----------|------------|--------|---------|---------|
| PROM      | 59       | 11,69      | 4,74   | 0       | 115     |
| Kontrolle | 67       | 5,46       | 3,20   | 0       | 92      |

Anzahl der Fälle, Mittelwert, Median, Minimum, Maximum von IL-10 in beiden Gruppen.

Konzentrationsangaben in pg/ml.

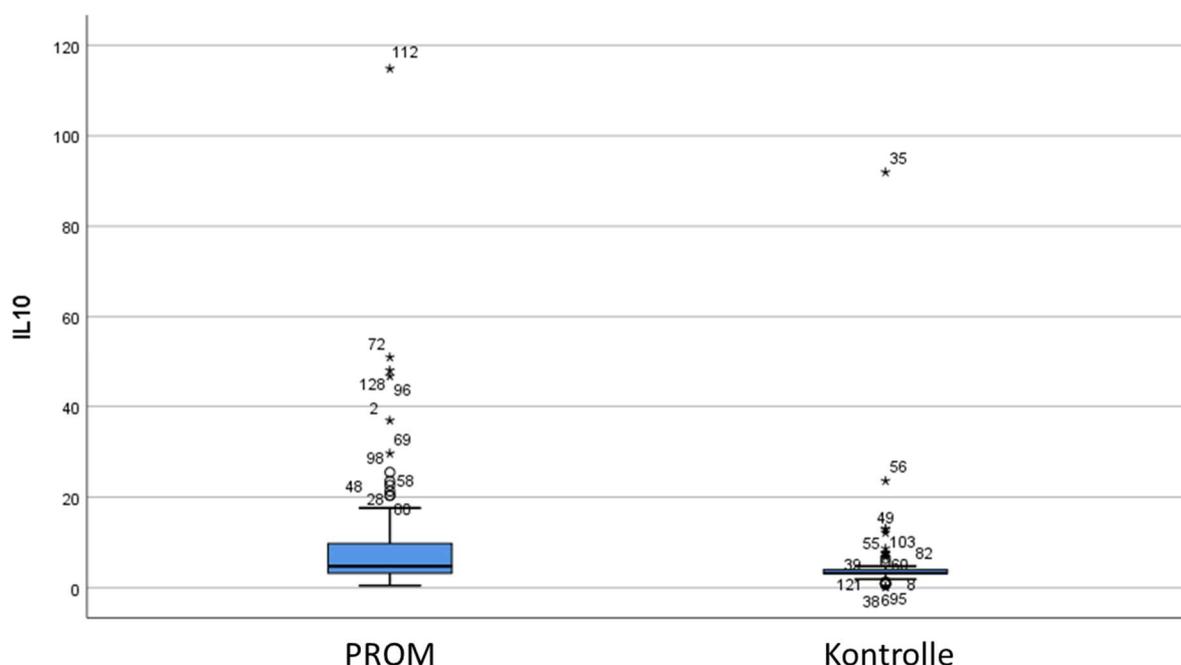


Abbildung 16: Boxplot zum Vergleich der Messwerte von IL-10 in PROM- und Kontrollgruppe

Nach statistischer Auswertung mithilfe des Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben kann bei einem p-Wert von 0,003 von einem hochsignifikanten Unterschied zwischen den Messwerten der beiden Gruppen gesprochen werden.

#### 4.1.2 MCP-3

Anhand der explorativen Datenanalyse der Messwerte von MCP-3 in der Gruppe mit PROM und der Kontrollgruppe ergaben sich die unten aufgeführten Ergebnisse.

Im Gegensatz zu den vorherigen Ergebnissen nimmt der Median in beiden Gruppen den gleichen Wert an, der Mittelwert ist jedoch in der PROM-Gruppe mehr als doppelt so hoch verglichen mit der Kontrollgruppe. Auch bei Betrachtung der gemessenen Maxima ist ein erheblicher Unterschied festzustellen.

**Tabelle 7: Deskriptive Statistik für MCP-3 bei Vergleich der beiden Gruppen**

|           | Fallzahl | Mittelwert | Median | Minimum | Maximum |
|-----------|----------|------------|--------|---------|---------|
| PROM      | 54       | 11,01      | 3,20   | 3       | 138     |
| Kontrolle | 63       | 5,09       | 3,20   | 3       | 84      |

Anzahl der Fälle, Mittelwert, Median, Minimum, Maximum von MCP-3 in beiden Gruppen.

Konzentrationsangaben in pg/ml.

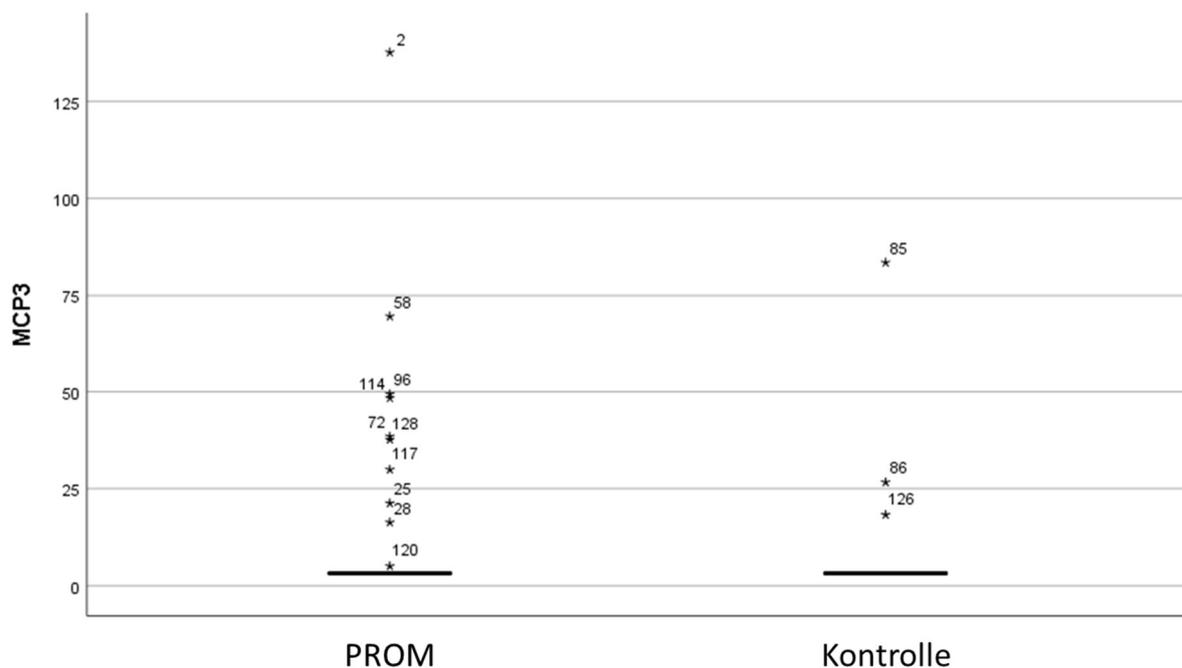


Abbildung 17: Boxplot zum Vergleich der Messwerte von MCP-3 in PROM- und Kontrollgruppe

Für die Analyse auf statistisch signifikante Unterschiede wurde ebenfalls der Wilcoxon-Rangsummentest verwendet, welcher einen p-Wert von 0,019 und damit ein eindeutig signifikantes Ergebnis widerspiegelt.

#### 4.1.3 GM-CSF

Wie bereits zuvor wurde die deskriptive Statistik mit Fallzahlen, Mittelwert, Median, Minimum und Maximum der Messwerte für GM-CSF in den beiden zu vergleichenden Gruppen tabellarisch sowie in Form eines Boxplots dargestellt.

Auch hier kann man deutliche Unterschiede der Mittelwerte und Mediane erkennen. Ebenfalls auffallend ist der Unterschied des gemessenen Maximums, welches in der Gruppe mit PROM mehr als doppelt so hoch ist, als in der Kontrollgruppe.

**Tabelle 8: Deskriptive Statistik für GM-CSF bei Vergleich der beiden Gruppen**

|           | Fallzahl | Mittelwert | Median | Minimum | Maximum |
|-----------|----------|------------|--------|---------|---------|
| PROM      | 59       | 13,50      | 11,70  | 2       | 80      |
| Kontrolle | 69       | 8,82       | 7,01   | 0       | 33      |

Anzahl der Fälle, Mittelwert, Median, Minimum, Maximum von GM-CSF in beiden Gruppen.  
Konzentrationsangaben in pg/ml.

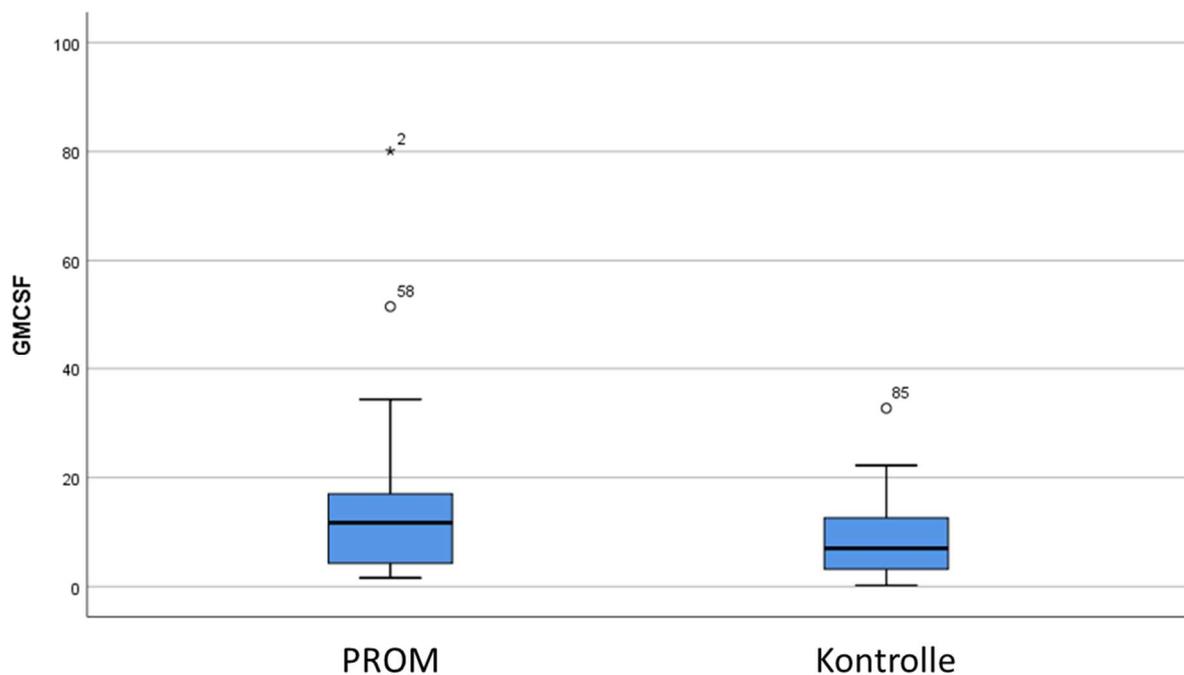


Abbildung 18: Boxplot zum Vergleich der Messwerte von GM-CSF in PROM- und Kontrollgruppe

Die statistische Testung mit dem Mann-Whitney-U-Test konnte bei einem p-Wert von 0,023 ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen den Messergebnissen aufzeigen.

#### 4.1.4 IL-1 $\beta$

Bei der Auswertung von IL-1 $\beta$  hingegen zeigt sich ein weniger deutlicher Unterschied zwischen den Mittelwerten, wobei sowohl Mittelwert als auch Median in der Gruppe mit PROM höher sind.

In diesem Fall liegt das gemessene Maximum der Kontrollgruppe jedoch deutlich über dem der Experimentalgruppe.

**Tabelle 9: Deskriptive Statistik für IL-1 $\beta$  bei Vergleich der beiden Gruppen**

|           | Fallzahl | Mittelwert | Median | Minimum | Maximum |
|-----------|----------|------------|--------|---------|---------|
| PROM      | 57       | 5,99       | 5,09   | 0       | 34      |
| Kontrolle | 69       | 4,19       | 3,01   | 0       | 50      |

Anzahl der Fälle, Mittelwert, Median, Minimum, Maximum von IL-1 $\beta$  in beiden Gruppen.

Konzentrationsangaben in pg/ml.

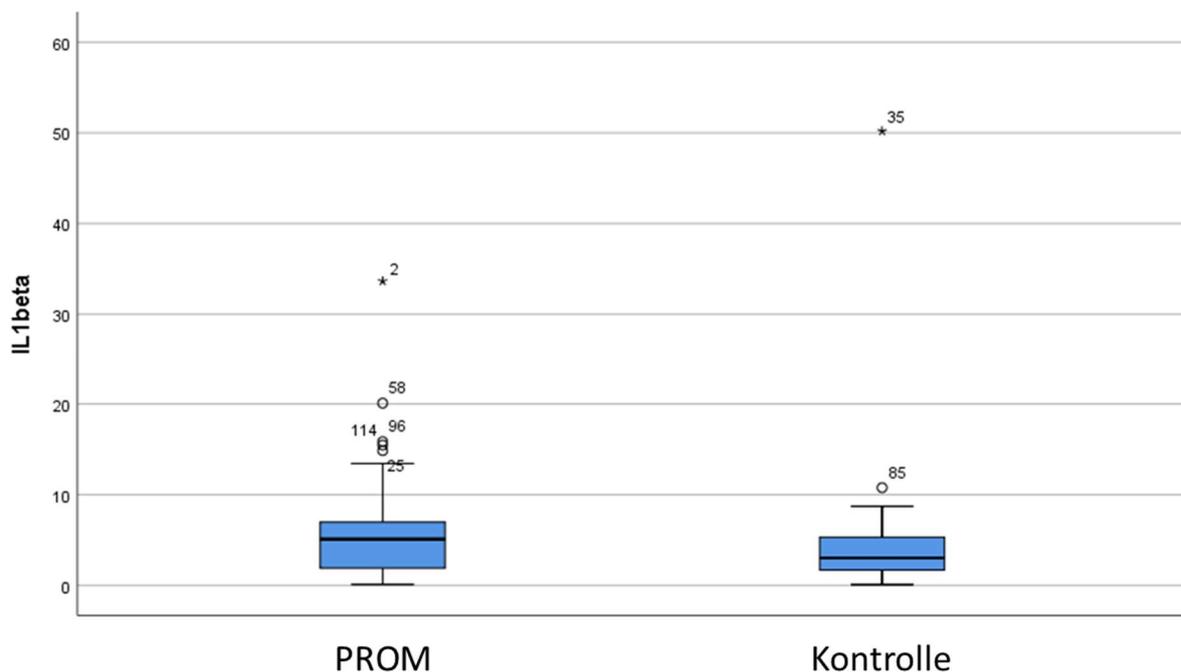


Abbildung 19: Boxplot zum Vergleich der Messwerte von IL-1 $\beta$  in PROM- und Kontrollgruppe

Hier hat sich nach statistischer Testung mit dem Wilcoxon-Rangsummentest ein p-Wert von 0,033 gezeigt, sodass auch hier die Unterschiede zwischen den Gruppen groß genug waren, um die Nullhypothese abzulehnen und von einem signifikanten Ergebnis zu sprechen.

#### 4.1.5 Übrige Zytokine (G-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-12P40, IP-10, MCP-1, MIP- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )

Die Messwerte der Zytokinkonzentrationen von IFN- $\gamma$  und MCP-1 lagen beide geringfügig oberhalb des Signifikanzniveaus von 5%, sodass die Nullhypothese dennoch zu wahrscheinlich ist, um abgelehnt zu werden.

Insbesondere bei IFN- $\gamma$  haben sich nach Auswertung mit dem Mann-Whitney-U-Test deutliche Unterschiede gezeigt, welche laut p-Wert ( $p = 0,054$ ) jedoch nicht groß genug waren, um als statistisch signifikant gewertet zu werden.

Der Median sowie das gemessene Maximum stellten sich in der PROM-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe mehr als doppelt so hoch dar. Der Mittelwert zeigte einen ebenfalls deutlich höheren Wert in der Gruppe mit PROM.

**Tabelle 50: Deskriptive Statistik für IFN- $\gamma$  bei Vergleich der beiden Gruppen**

|           | Fallzahl | Mittelwert | Median | Minimum | Maximum |
|-----------|----------|------------|--------|---------|---------|
| PROM      | 56       | 10,49      | 8,48   | 1       | 76      |
| Kontrolle | 68       | 6,67       | 4,17   | 1       | 29      |

Anzahl der Fälle, Mittelwert, Median, Minimum, Maximum von IFN- $\gamma$  in beiden Gruppen.  
Konzentrationsangaben in pg/ml.

Bei den übrigen Zytokinen (G-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IP-10, MIP- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) musste die Nullhypothese ebenfalls beibehalten werden, sodass kein statistischer Zusammenhang hergestellt werden konnte. Da diese im Folgenden nicht vordergründig diskutiert werden, hat man auf eine explizite Darstellung der Messungen und deren statistischer Auswertung verzichtet.

Den höchsten p-Wert und damit den geringsten Unterschied zwischen den Messergebnissen ergab die statistische Auswertung bei den Zytokinen IL-8 ( $p = 0,979$ ) und TNF- $\alpha$  ( $p = 0,876$ ).

#### 4.2 Zytokinexpression je nach Geburtsmodus

Die statistische Testung bezüglich eines signifikanten Zusammenhangs zwischen dem Geburtsmodus (Vaginale Entbindung / CS) und den jeweiligen Zytokin-Konzentrationen wurde in beiden Gruppen (PROM/Kontrolle) durchgeführt.

Bei alleiniger Betrachtung der PROM-Gruppe musste die Nullhypothese bei allen Zytokinen abgelehnt werden, sodass kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den

verschiedenen Zytokinen unter PROM und einem der beiden Geburtsmodi hergestellt werden konnte.

#### 4.2.1 Kontrollkollektiv

In der Kontrollgruppe konnte die Nullhypothese bei zwei Zytokinen (IL-10, MCP-1) abgelehnt werden. Aufgrund der ebenfalls nicht normalverteilten Daten wurde auch hier zur Auswertung der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben angewandt.

Nach Analyse der Häufigkeiten hat sich die Gruppe mit vaginaler Entbindung (n = 22) im Vergleich zur CS-Gruppe (n=47) weniger als halb so groß dargestellt, was jeweils einen prozentualen Anteil von 31,9% zu 68,1% ergab.

#### *Interleukin-10*

Auch in diesem Fall wurde die deskriptive Statistik mit Fallzahlen, Mittelwert, Median, Minimum und Maximum der gemessenen IL-10-Konzentrationen in den beiden zu vergleichenden Gruppen tabellarisch sowie in Form eines Boxplots dargestellt.

Wie zu erwarten spiegelt sich der bereits erwähnte signifikante Unterschied auch beim Vergleich des Mittelwertes wider, wobei dieser nach vaginaler Entbindung um den Faktor 2,6 höher lag als nach Entbindung per CS. Noch deutlicher wird dies jedoch durch Betrachtung der gemessenen Maxima. Nach vaginaler Entbindung wurde die maximale IL-10-Konzentration sogar um den Faktor 7 höher gemessen, als in der CS-Gruppe.

Nach Betrachtung von Mittelwert, Median und Maximum von IL-10 ist zudem bemerkenswert, dass die im Kollektiv mit vaginaler Entbindung höheren Konzentrationen sich jedoch immer noch deutlich niedriger darstellen, als nach stattgehabtem PROM.

**Tabelle 11: Deskriptive Statistik für IL-10 bei unterschiedlichem Geburtsmodus**

|         | Fallzahl | Mittelwert | Median | Minimum | Maximum |
|---------|----------|------------|--------|---------|---------|
| Vaginal | 21       | 9,51       | 3,20   | 2       | 92      |
| CS      | 46       | 3,61       | 3,20   | 0       | 13      |

Anzahl der Fälle, Mittelwert, Median, Minimum, Maximum von IL-10 in beiden Gruppen.

Konzentrationsangaben in pg/ml.

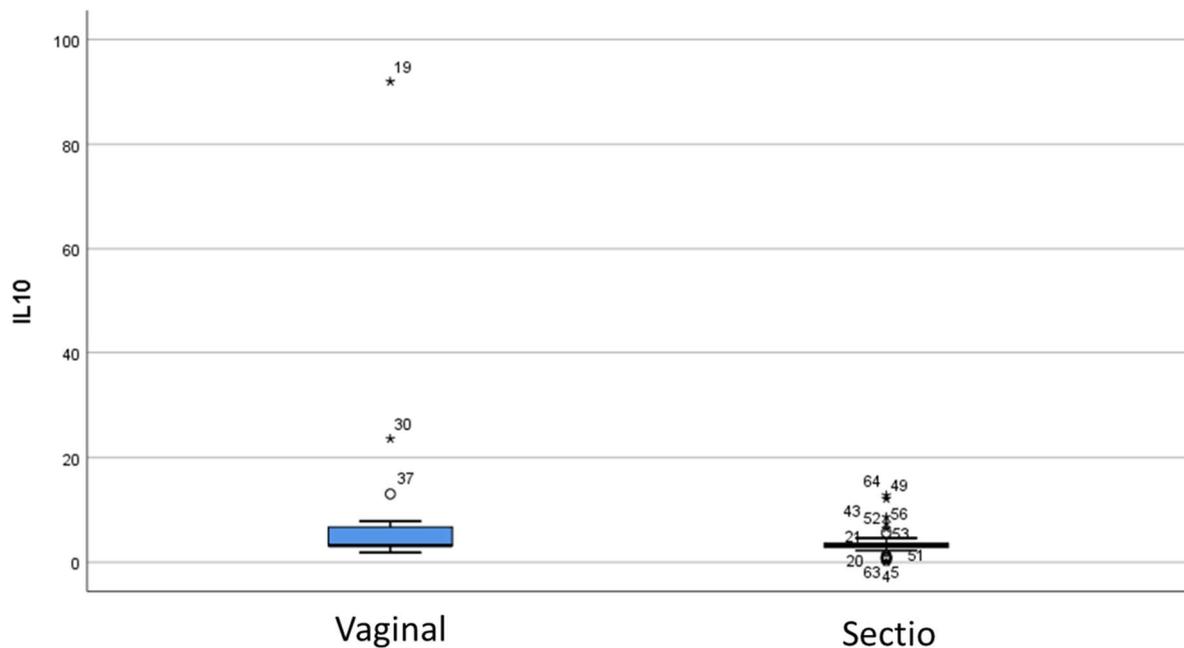


Abbildung 20: Boxplot zum Vergleich der Konzentrationen von IL-10 bei unterschiedlichem Geburtsmodus

Die Auswertung mit dem Wilcoxon-Rangsummentest hat bei einem p-Wert von 0,049 einen signifikanten Unterschied zwischen den IL-10-Konzentrationen in den beiden zu vergleichenden Gruppen aufgezeigt.

### ***Monocyte Chemotactic Protein-1***

Bei der Auswertung von MCP-1 ist insbesondere der Median bezeichnend, welcher im Gegensatz zu den übrigen Parametern in der Gruppe mit CS einen deutlich höheren Wert einnimmt. Das gemessene Maximum hingegen wurde nach vaginaler Entbindung mehr als dreimal so hoch gemessen im Vergleich zur Entbindung per CS.

Der Mittelwert sowie das Minimum der beiden Gruppen unterscheiden sich nur geringfügig, wobei der Mittelwert im Kollektiv nach vaginaler Entbindung geringfügig höher ist.

Vergleicht man die folgende deskriptive Statistik für MCP-1 mit der nach stattgehabtem PROM fällt auf, dass sowohl der Mittelwert als auch das erfasste Maximum nach vaginaler Entbindung niedriger angesiedelt sind. Im Gegensatz dazu liegt der Median nach CS jedoch über dem nach PROM.

**Tabelle 12: Deskriptive Statistik für MCP-1 bei unterschiedlichem Geburtsmodus**

|         | Fallzahl | Mittelwert | Median | Minimum | Maximum |
|---------|----------|------------|--------|---------|---------|
| Vaginal | 47       | 537,68     | 292,25 | 110     | 4551    |
| CS      | 22       | 521,28     | 432,42 | 102     | 1305    |

Anzahl der Fälle, Mittelwert, Median, Minimum, Maximum von MCP-1 in beiden Gruppen.

Konzentrationsangaben in pg/ml.

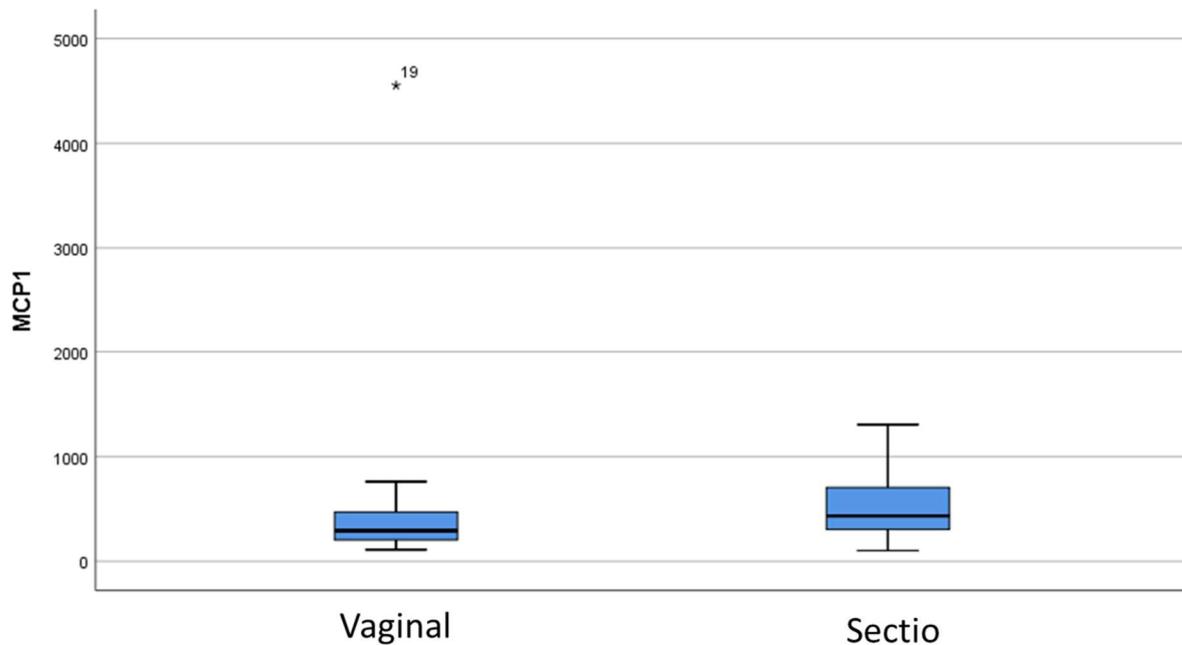


Abbildung 21: Boxplot zum Vergleich der Messwerte von MCP-1 bei unterschiedlichem Geburtsmodus

Nach statistischer Auswertung durch den Mann-Whitney-U-Test kann bei einem p-Wert von 0,037 von einem signifikanten Unterschied zwischen den Messwerten der beiden Gruppen gesprochen werden.

## 5. Diskussion

Seit Jahren sind Zytokine als Mediatoren des Immunsystems sowie das Verständnis ihrer vielfältigen Funktionen ein zentraler Ansatzpunkt in der Forschung. Dabei liegt das Augenmerk jedoch nicht nur auf der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien, sondern auch auf der Etablierung zusätzlicher Präventionsmaßnahmen, um die Entstehung von akuten oder chronischen Erkrankungen nach Möglichkeit verhindern zu können.

Bereits viele den Zytokinen zugehörige Proteine haben in der Vergangenheit ein großes Potential gezeigt, diese im klinischen Alltag verschiedenartig nutzen und etablieren zu können. So wird beispielsweise IL-6 mittlerweile regelhaft als Laborparameter im Rahmen von Neugeboreneninfektionen bestimmt. [35,74] Genauso hat man sich seine Rolle bei Entzündungsreaktionen in der Pharmakologie zunutze gemacht, sodass z.B. im Jahr 2017 der IL-6-Antikörper Salirumab zur Behandlung von Rheumatoider Arthritis zugelassen wurde. Studien zufolge sei dieser dem bisher bekannten und vielfältig eingesetzten TNF- $\alpha$ -Inhibitor Adalimumab signifikant überlegen. [44]

Pathologien in der Schwangerschaft und eine folgende Frühgeburtlichkeit sind immer noch ein großer Risikofaktor für prä- und postnatale Komplikationen des Neonaten sowie einer ggf. damit verbundenen Mortalität [110]. Daher ist es von großem Interesse, diese Komplikationen verhindern oder zumindest frühzeitig erkennen und effizient behandeln zu können.

### 5.1 Rolle verschiedener Zytokine bei Infektion/Inflammation, Frühgeburt und vorzeitigem Blasensprung

Wie bereits zu Beginn beschrieben, spielen Zytokine in der Schwangerschaft, bei Geburt sowie auch im kindlichen Organismus eine nicht unwichtige Rolle und sind daher im Mittelpunkt vieler Untersuchungen. Insbesondere bei Vorliegen einer intrauterinen Infektion kommt es zur Zytokinausschüttung, was die Induktion vorzeitiger Wehen nach sich ziehen kann. Vor allem IL-6 scheint hierbei die Uteruskontraktilität direkt zu beeinflussen. Darüber hinaus konnte laut Reimer et al. 2000 auch eine deutlich erhöhte IL-6-Konzentration im Zervixsekret bei intraamniarer Infektion unabhängig von einem Keimnachweis detektiert werden. [88]

Neben IL-6 kommt es bei Entzündungsreaktionen durch die Zellen von Dezidua, Plazenta sowie in fetalen Geweben zur Sekretion einer Vielzahl weiterer Mediatoren, zu welchen auch TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-8, IL-10, GCSF gehören. Diese konnten laut der Arbeit von Winkler et al. 1996 sowohl im Fruchtwasser als auch in den intrauterinen Geweben nachgewiesen werden. Die Mehrzahl dieser Zytokine wirkt proinflammatorisch und führt zur

Stimulation der Prostaglandinsynthese. [110] Da die Prostaglandine  $E_2$  und  $F_{2\alpha}$  bekanntlich ein Aufweichen der Eihäute sowie die Induktion von Wehen bewirken können, ist eine mögliche Beeinflussung ihrer Produktion und Freisetzung bereits im Rahmen einer Vielzahl von Studien untersucht und auf unterschiedliche Weise bestätigt worden [9,15].

### ***Interleukin-10***

Wie so oft in der Natur ist auch im Bereich der Immunantwort ein Gleichgewicht zwischen fördernden und hemmenden Prozessen notwendig, um die normale Gewebemöostase aufrecht erhalten zu können. Hierbei nimmt IL-10 die „Rolle des Gegenspielers“ ein, indem es die Immunantwort reguliert und begrenzt. [69,92,101] So haben Studien ergeben, dass ein IL-10-Mangel unter anderem sowohl eine ungehinderte Ausbreitung von Infektionen bis hin zum septischen Schock als auch eine Chronifizierung dieser bedingen kann. Andererseits sind durch Unterbindung bzw. Störung der IL-10-Genexpression oder Signalübertragung über seinen Rezeptor durch Antikörper-Blockade viele intrazelluläre Infektionen besser beherrschbar und können auch in ihrer Dauer begrenzt werden. Teilweise konnte eine solche Unterdrückung der IL-10-Funktion ein verbessertes Überleben nach Infektion sowie eine verstärkte adaptive Immunabwehr bewirken. [101]

Diese Begrenzung der Immunantwort kann durch ganz unterschiedliche Mechanismen erreicht werden. Unter anderem beeinflusst IL-10 die Synthese und Funktion verschiedener anderer Zytokine und wirkt hemmend auf bestimmte immunologisch aktive Zellreihen. So wird bereits 1991 in der Arbeit von Fiorentino et al. beschrieben, wie IL-10 die Fähigkeit von Makrophagen zur Induktion der Zytokinproduktion in T-Helferzellen signifikant inhibiert. Eine solche Hemmung der Synthese konnte insbesondere hinsichtlich IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  beobachtet werden. Diese Erkenntnis zeigt nicht nur eine Herunterregulierung der T-Zell-Reaktion, sondern hat auch Relevanz hinsichtlich akuter Entzündungsreaktionen. [31]

Auch in der Arbeit von Sagawa et al. 1996 konnte die genannte Suppression von IL-6, IL-8- und TNF- $\alpha$  in menschlichen mononukleären Zellen nachvollzogen werden, sowohl wenn IL-10 zu Beginn, als auch 24 Stunden nach der Inkubation zur Kultur hinzugegeben wurde. Diese Untersuchungen wurden vor allem in Hinblick auf ein mögliches therapeutisches Potential von exogen zugeführtem IL-10 auf die Zytokinproduktion bei entzündlichen Erkrankungen durchgeführt. [93] Eine solche Suppression der IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$ -Produktion durch IL-10 stellt demnach eine mögliche Erklärung für die, trotz eines stattgehabten PROMS, niedrigen Messergebnisse dieser drei Zytokine in unseren Untersuchungen dar.

Andere Nachforschungen konnten eine Hemmung der GM-CSF-Synthese durch IL-10 bei Probanden mit Pulmonaler alveolärer Proteinose aufzeigen. Durch Bronchoalveoläre Lavage wurden Zellen gewonnen und eine deutliche Beeinträchtigung der GM-CSF-Sekretion bei hohen GM-CSF-mRNA-Spiegeln festgestellt. Gleichzeitig konnten jedoch stark erhöhte IL-10-Protein und IL-10-mRNA-Konzentrationen nachgewiesen werden. Eine in-vitro-Analyse der GM-CSF-Regulation hat gezeigt, dass IL-10 zu einer deutlichen Reduktion sowohl der Ausschüttung von GM-CSF, als auch dessen mRNA-Synthese führt, diese jedoch auch durch den Einsatz von IL-10-Antikörper hochreguliert werden können. [104]

Aufgrund seiner bekannten antiinflammatorischen Eigenschaften wurde die Gabe von rekombinantem IL-10 als Therapeutikum bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen bereits anhand verschiedener klinischer Studien getestet. Auch hierbei zeigte sich eine Suppression der Immunantwort, in diesem Fall durch Reduktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-12P40 bei Patienten mit Psoriasis und Morbus Crohn. Ein vermeintlich positiver Effekt auf den Krankheitsverlauf konnte jedoch insbesondere unter mittleren Dosierungen hervorgerufen werden. Entgegen jeglicher Erwartungen haben hohe Dosen sogar zu einer Hochregulation immunologischer Vorgänge geführt, weshalb IL-10 auch immunstimulierende Eigenschaften zugeschrieben worden sind. Diese konnten vor allem gegenüber humoralen und zytotoxischen Komponenten des Immunsystems aufgezeigt werden. [76]

In Anbetracht dessen, dass durch IL-10 sowohl die zelluläre, als auch die humorale Immunantwort begrenzt und somit eine Ausbreitung von Erregern erleichtert wird, kommt unweigerlich die Frage der klinischen Relevanz therapeutischer IL-10-AK-Gaben auf. Insbesondere auch aufgrund der Tatsache, dass es einigen Erregern mittlerweile gelungen ist, über spezifische Mechanismen eine Hochregulation von IL-10 zu induzieren und damit eine optimale Voraussetzung für die Ausbreitung einer Infektion zu schaffen. Hierzu gehören unter anderem *Toxoplasma gondii* sowie der Tuberkulose-Erreger *Mycobacterium tuberculosis*, welcher ein ähnliches Expressionsmuster zu nutzen scheint. [60,78,101]

Laut Mosser et al. 2008 hat sich bereits in mehreren Studien eine Wirksamkeit von Kombinationstherapien mit IL-10-Antikörpern und Chemotherapeutika bei der Behandlung von bakteriellen, viralen oder neoplastischen Erkrankungen gezeigt [70]. Andererseits wurde das therapeutische Potential von rekombinantem IL-10 bei autoimmunologisch bedingten und malignen Erkrankungen sowie bei verschiedenen Infektionskrankheiten getestet, was unter ektopter Verabreichung jedoch lediglich eine begrenzte Wirksamkeit gezeigt hat. [60,78,101]

Von den Ergebnissen der oben genannten Studien ausgehend kann die hochsignifikante IL-10-Erhöhung in der PROM-Gruppe als protektive Reaktion des Körpers interpretiert werden, eine überschießende Entzündungsreaktion zu vermeiden. In Anbetracht einer möglichen

mikrobiellen Invasion wäre zudem die Fähigkeit mancher Erreger die IL-10-Synthese zu steigern als ursächlich für die hohen IL-10-Messwerte in Erwägung zu ziehen. Gegen eine durch die Keime eigens induzierte Hochregulation von IL-10 spricht jedoch auch der vermeintlich unkomplizierte Verlauf mit geringer Notwendigkeit einer ICU-Aufnahme der Neonaten sowie die Tatsache, dass die Fähigkeit zur Hochregulation von IL-10 bei den klassischen Erregern ascendierender Infektionen bisher nicht bekannt ist.

Neben Infektionsgeschehen und Autoimmunerkrankungen scheint IL-10 auch die Vorgänge im Rahmen von Schwangerschaft und Geburt zu beeinflussen. So konnte bei Untersuchungen von intrauterinen Geweben sowie von Fruchtwasserproben neben anderen anti- und proinflammatorischen Zytokinen auch IL-10 identifiziert werden. [110]

Laut Brown et al. 2000 vermindert IL-10 die Produktion von IL-1 $\beta$  und bewirkt zudem eine Inhibition der Prostaglandin-Synthese in intakten fetalen Membranen. Sowohl Prostaglandine als auch IL-1 können durch unterschiedliche Mechanismen einen Bruch der Membranen verursachen. Hierzu gehört einerseits die IL-1-abhängige Kollagenasen-Produktion, welche durch Verminderung des Kollagengehaltes in den fetalen Membranen deren Zugfestigkeit verringert. Andererseits können Prostaglandine ein Aufweichen der Eihäute und somit frühzeitige Wehen induzieren. [9,15,17,110]

Im Rahmen unserer Messungen im Nabelschnurblut hat sich bei Vergleich der IL-10-Konzentrationen der deutlichste Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen hervorgetan. Anhand der obigen Studien wäre eigentlich davon auszugehen, dass durch die beschriebene IL-10-abhängige Inhibition der Prostaglandin- sowie IL-1 $\beta$ -Synthese ein PROM verhindert würde. Nicht zu vergessen ist auch, dass IL-1 $\beta$  trotz einer möglichen Suppression durch IL-10 ebenfalls in signifikant höheren Konzentrationen nach PROM vorlag. Somit scheint die Inhibition durch IL-10 nicht ausreichend gewesen zu sein, um die IL-1 $\beta$ -Synthese suffizient zu supprimieren. Jedoch muss hier kritisch hinterfragt werden, inwiefern die fetale Immunantwort im Nabelschnurblut mit Messungen im Fruchtwasser bzw. in fetalen Membranen und im mütterlichen Blut zu vergleichen sind.

Auch wenn das häufigste in Studien herangezogene Untersuchungsmedium das Fruchtwasser ist, gibt es mittlerweile doch auch einige Veröffentlichungen, welche sich mit der IL-10-Konzentration im fetalen bzw. neonatalen Blut unter verschiedensten Bedingungen beschäftigt. So besteht laut der Arbeit von Blanco-Quirós et al. 2000 eine positive Korrelation zwischen der IL-10-Konzentration im Nabelschnurblut und dem GA der Neugeborenen. Daher wurden die bei Frühgeborenen signifikant erhöhten IL-10-Konzentrationen primär auf die noch bestehende Unreife des Fetus zurückgeführt. Zudem wurde auch die während der Schwangerschaft auftretende Immunsuppression zur Erhaltung der natürlichen

Gewebehomöostase als mögliche Ursache für erhöhte IL-10-Spiegel gesehen. Konträr zu unseren Ergebnissen hatte der Geburtsmodus in dieser Studie keinen signifikanten Einfluss auf die IL-10-Konzentrationen. [12]

In unseren Messungen hat sich bei Auswertung rein innerhalb der Kontrollgruppe ein signifikant höherer IL-10-Spiegel nach vaginaler Entbindung im Vergleich zur Entbindung per CS gezeigt. Dieser Unterschied kann einerseits durch unterschiedliche Probandenzahlen, ein unterschiedliches mittleres GA, jedoch auch durch andere eventuell gar nicht erfasste Faktoren verursacht sein.

Auch in der Arbeit von Mobini et al. 2016 wird ein Zusammenhang der IL-10-Spiegel mit dem Auftreten von Pathologien in der Schwangerschaft, insbesondere der PTB, erörtert. Da immunologische Reaktionen auf Alloantigene des Fetus ursächlich für verschiedene Komplikationen sein können, scheint es naheliegend, dass IL-10 als antiinflammatorisches Zytokin und Begrenzer der Immunantwort hierbei eine zentrale Bedeutung zukommt. Im Rahmen verschiedener Untersuchungen hat sich dementsprechend gezeigt, dass eine gesteigerte IL-10-Expression zur Suppression entsprechender immunologischer Prozesse führt. Hierzu gehört unter anderem die Entwicklung tolerogener dendritischer Zellen sowie eine Unterdrückung der Reaktion von Natürlichen Killerzellen und T-Lymphozyten. Somit ist davon auszugehen, dass eine veränderte IL-10-Expression bzw. genetische Variationen den Verlauf und auch den Ausgang einer Schwangerschaft signifikant beeinflussen können. Hinsichtlich der Genese einer PTB ist dies häufig mit einer Entzündungsreaktion verbunden, welche durch IL-10 begrenzt werden kann und somit für das notwendige Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Prozessen in einer Schwangerschaft sorgt. [68]

Wenn man diese Erkenntnisse auf unsere Messergebnisse überträgt, scheint eine Entzündungsreaktion, welche durch IL-10 begrenzt wurde, durchaus naheliegend.

### **GM-CSF**

GM-CSF bewirkt als hämatopoetischer Wachstumsfaktor sowohl die Proliferation, als auch die Reifung myeloischer Vorläuferzellen zu Granulozyten und Monozyten. Darüber hinaus ist GM-CSF an der Regulierung dieser Zellen im Sinne einer Aktivierung, Differenzierung und Mobilisierung, auch insbesondere im Rahmen von Entzündungsreaktionen maßgeblich beteiligt. [32,40,84,106,109]

Neutrophile Granulozyten sind bekannt als hämatopoetische Immunzellen, welche vor allem bei bakteriellen Infektionen und Pilzinfektionen eine zentrale Rolle einnehmen, indem beispielsweise Vorgänge wie die Phagozytose von Keimen oder die Produktion

proinflammatorischer Zytokine induziert werden. Die unter anderem durch GM-CSF gesteuerte neutrophile Granulopoese kann bei inflammatorischen Reaktionen verstärkt werden. Nach Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Peripherie dient diese „Notfall-Granulopoese“ dazu, die Homöostase im Knochenmark wiederherzustellen. Eine solche verstärkte Neutrophilenantwort ist für das Überleben des Wirts häufig unerlässlich und kann neben G-CSF und GM-CSF auch durch andere Zytokine, wie IL-3 und -6, gefördert werden. [111]

Wie bereits oben beschrieben, können die GM-CSF-Grundzirkulationswerte unter im Körper ablaufenden Entzündungsreaktionen rasant ansteigen [96,106]. Dies untermauert wiederum die Vermutung, dass eine solche Inflammation nach stattgehabten PROM mit Keimaszension für die signifikant erhöhten GM-CSF-Konzentrationen in unseren Messungen verantwortlich ist. Hierbei darf nicht vergessen werden, dass es sich ebenfalls um „supprimierte Werte“ durch IL-10 handeln kann und die Werte ohne den Einfluss von IL-10 noch höher gewesen wären. Laut verschiedener Studien kommt es neben IL-10 auch durch andere Zytokine wie IL-4 und IFN- $\gamma$  zu einer Unterdrückung der Expression von GM-CSF [48,80,93]. Da diese im Rahmen unserer Messungen jedoch nicht in erhöhten Konzentrationen vorlagen, ist nicht von einer solchen Beeinflussung auszugehen.

Laut der Arbeit von Hashimoto et al. 2001 scheint IL-10 auch eine Beeinträchtigung der Funktion von GM-CSF zu verursachen. In einem Teil der Versuche wurde der Einfluss von IL-10 auf menschliche Monozyten untersucht, welche mit GM-CSF stimuliert wurden. In Abwesenheit von IL-10 entwickelten sich die Monozyten GM-CSF-vermittelt erwartungsgemäß zu Makrophagen. Nach Hinzugabe von IL-10 starben die Monozyten jedoch durch Apoptose. Daraus lässt sich ableiten, dass insbesondere die Fähigkeit von GM-CSF zur Induktion der Differenzierung von Monozyten durch IL-10 inhibiert bzw. gestört wird. [41]

Demnach könnte, trotz signifikant hoher GM-CSF-Spiegel, eine effiziente Erreger-Abwehr durch die hohen IL-10-Konzentrationen bei den Probanden der PROM-Gruppe gestört worden sein. Um diese These weiter untermauern zu können, wäre eine Untersuchung des Differentialblutbildes hinsichtlich des Monozyten-Anteils von Interesse gewesen.

Da eine Veröffentlichung aus dem Jahr 1993 die GM-CSF-vermittelte IL-8-Ausschüttung durch periphere Blutmonozyten beschreibt und IL-10 nachweislich die Monozyten-Funktion bzw. das Überleben dieser Zellreihe beeinflussen kann, wird hierdurch die These einer IL-10-bedingten Suppression der IL-8-Konzentration unterstützt. In der genannten Studie wurden Kulturen aus heparinisierendem Vollblut mit rekombinantem GM-CSF inkubiert und nach zwei Stunden eine Stimulation der IL-8-Sekretion festgestellt. Diese durch GM-CSF induzierte IL-8-Sekretion kann für die Verstärkung einer akuten inflammatorischen Reaktion essentiell sein. [102]

Doch nicht nur im Rahmen von Infektionen in der Neonatalperiode, sondern auch hinsichtlich eines in der Schwangerschaft stattgehabten PROM scheint die Höhe der GM-CSF-Konzentration eine entscheidende Rolle zu spielen.

Eine Untersuchung aus dem Jahr 2020 hat unter anderem den Einfluss von GM-CSF auf die Zugfestigkeit der fetalen Membranen getestet. Hierzu wurde zwischen Amnion und Choriondezhidua unterschieden. Nach Analyse der MMPs und deren Inhibitoren (TIMPs) mittels Multiplex-ELISA hat sich gezeigt, dass GM-CSF das Amnion nicht direkt schwächt, sondern sekundär über eine Verschiebung des Verhältnisses von Proteasen zu Antiproteasen wirkt. [95]

Die Arbeit von Nold et al. 2021 untermauert dieses Ergebnis anhand eines Mausmodells, in welchem gezeigt wurde, dass GM-CSF das Verhältnis von MMPs und TIMPs in verschiedenen Untersuchungsmedien signifikant verändert. Hierzu wurden Fruchtwasser, Uterusgewebe und Serum trächtiger Mäuse nach zuvor stattgehabter intrauteriner Injektion von GM-CSF auf das MMP/TIMP-Verhältnis untersucht. Bei 87,5 % der „GM-CSF-Mäuse“ konnten Anzeichen einer Membranruptur bzw. einer drohenden PTB festgestellt werden, was verglichen mit einem Anteil von 0% in der Kontrollgruppe zu einem hochsignifikanten Ergebnis führt. Zur Objektivierung eines kausalen Zusammenhangs konnte zudem ein erhöhtes MMP/TIMP-Verhältnis im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert werden. Nach diesen Erkenntnissen wäre ein besseres Verständnis der GM-CSF-assoziierten Signalwege von großem Interesse, um ggf. therapeutisch in die während eines PROM ablaufenden Vorgänge eingreifen zu können. Insgesamt könnte dies zu einer Verringerung der Rate an PTBs und der damit einhergehenden neonatalen Morbidität und Mortalität führen. Darüber hinaus konnte unter der Behandlung mit GM-CSF eine signifikant verringerte Expression von TNF- $\alpha$  festgestellt werden, sodass offenbar nicht nur IL-10 zur Suppression anderer Zytokine führen kann. [75]

Diese Erkenntnis stellt eine weitere mögliche Erklärung für die vergleichsweise niedrigen TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in unseren Messergebnissen bei signifikant erhöhten GM-CSF-Spiegeln dar. Zudem könnten laut der Arbeit von Nold et al. 2021 die signifikant erhöhten GM-CSF-Konzentrationen durchaus mitverantwortlich für den PROM gewesen sein, vorausgesetzt, dass das fetale Nabelschnurblut auch das mütterliche Zytokinprofil oder zumindest das Zytokinprofil in den fetalen Kompartimenten mit abbildet.

Nicht zuletzt konnten frühere Studien auch einen Einfluss des GA auf die Höhe des im Blut befindlichen GM-CSF aufzeigen. Hiernach besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem GA und den GM-CSF-Spiegeln im Nabelschnurblut Neugeborener zwischen der 25. und 42. SSW. Dieser genannte Zusammenhang konnte auch nicht durch die gemessene Leukozytenzahl, absolute Neutrophilenzahl, eine PIH oder eine vorliegende Infektion erklärt werden. [6]

## ***Interleukin-1***

Als Protein mit regulatorischer Funktion auf verschiedene Zellen und Gewebe nimmt IL-1 eine zentrale Rolle im Rahmen verschiedener Entzündungsreaktionen ein.

Insbesondere bei der Behandlung von Erkrankungen des rheumatoiden Formenkreises ist es daher zum Ansatzpunkt therapeutischer Strategien geworden. Mithilfe maligner Monozytenzelllinien gelang es einen Interleukin-1-hemmenden Faktor, Interleukin-1-ra, zu extrahieren, welcher in vielen Untersuchungsansätzen seine antiinflammatorische Wirkung unter Beweis stellen konnte. [25,30]

Mit der Einführung des rekombinanten IL-1-ra als Therapeutikum eröffneten sich ganz neue Möglichkeiten in der Intervention vieler Erkrankungen. [110] Im Laufe der Jahre wurden mehrere IL-1-Blocker zugelassen, welche auf ganz unterschiedliche Weise ihre Wirkung entfalten. [26]

Neben rheumatischen Erkrankungen scheint IL-1 auch im Rahmen von intrauterinen Infektionen eine Rolle zu spielen. Bei Vorliegen einer stillen Infektion werden durch Bakterienprodukte verschiedene Prozesse, wie beispielsweise die Aktivierung von Makrophagen, induziert. Makrophagen sind in den Membranen von Dezidua, Plazenta und Fetus allgegenwärtig und sezernieren dort verschiedene Entzündungsmediatoren, unter anderem IL-1. [110] Laut Reimer et al. 2000 gelten erhöhte IL-1 $\beta$ -Werte als sensibelster Parameter für eine intrauterine Keimbesiedlung [88]. Bereits mehrfach wurde in Studien auf einen Zusammenhang der IL-1 $\beta$ -Konzentration und intrauterinen Infektionsgeschehen hingewiesen. So erwies sich IL-1 $\beta$  im Fruchtwasser beispielsweise bei Probandinnen mit Chorioamnionitis als der geeignetste Vorhersagefaktor für eine vaskuläre Ausdehnung der Entzündung im mütterlichen Blut. [8]

Davon ausgehend könnten die in unseren Messungen signifikant erhöhten Konzentrationen von IL-1 $\beta$  in der PROM-Gruppe sowohl als Hinweis auf eine intrauterine Keimbesiedlung als auch auf eine nachfolgende Infektion interpretiert werden. Auch an dieser Stelle kommt die Frage auf, inwiefern die Konzentrationen von IL-1 $\beta$  im Nabelschnurblut unserer Experimentalgruppe mit Messungen im Fruchtwasser bzw. in verschiedenen Zellen fetomaternaler Gewebe vergleichbar sind.

Laut verschiedener Quellen kann IL-10 als antiinflammatorisches Zytokin die IL-1 $\beta$ -Synthese inhibieren [17,88]. Da IL-10 bei unseren Probanden der PROM-Gruppe in signifikant erhöhten Konzentrationen vorlag, ist zu vermuten, dass die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen ohne den Einfluss von IL-10 deutlich höher gewesen wären und die gemessenen Werte als „supprimierte Werte“ anzusehen sind. Dies wird auch durch die Veröffentlichung von O`Garra et al. 2008 unterstützt,

welche unter anderem von einer nachweislichen Reduktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-12P40 durch IL-10 berichtet [76].

In der Vergangenheit wurde vielfach auf eine Schlüsselrolle von IL-1 im Rahmen der Frühgeburtlichkeit hingewiesen. Laut Pandey et al. 2017 konnte eine Assoziation der Konzentrationen von IL-1 $\beta$  und IL-6 als proinflammatorische Zytokine und des antiinflammatorischen IL10 im Fruchtwasser mit Frühgeburtlichkeit aufgezeigt werden, wobei die Spiegel von IL-6 und IL-1 $\beta$  erhöht waren, die von IL-10 hingegen erniedrigt. [81]

Brown et al. 1998 zufolge haben die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen gezeigt, dass IL-1 $\beta$  in einer Gewebekultur fetaler Membranen die Freisetzung von PGE<sub>2</sub> ungefähr verdoppelte. Unter Verwendung des IL-1-ra konnte allerdings kein Einfluss auf die Prostaglandinsynthese festgestellt werden. [16] Dahingegen konnte laut einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2000 eine Inhibition der Synthese von PGE<sub>2</sub>, der IL-1 $\beta$ -Produktion und die Expression der IL-1 $\beta$ -mRNA in intakten fetalen Membranen durch IL-10 erreicht werden [17].

Auch wenn die IL-1-Blockade in anderen Bereichen der Medizin aktuell bereits ein Ansatzpunkt vieler Therapien inflammatorischer sowie autoinflammatorischer Erkrankungen ist, hat diese in präklinischen Studien hinsichtlich der Beeinflussung von PTBs leider nicht die gewünschte Wirksamkeit gezeigt [25,26,49]. Eine Publikation aus dem Jahr 1992 hingegen beschreibt die Induktion einer PTB durch Verabreichung von IL-1 sowie die erfolgreiche Verhinderung dieser durch IL-1-ra-Gabe. Allerdings ließ sich dieses Ergebnis nicht reproduzieren, sodass IL-1-ra weiterhin vornehmlich bei rheumatoiden Erkrankungen eingesetzt wird. [91]

Neben einer möglichen therapeutischen Intervention mithilfe von IL-1 bzw. eines Antagonisten oder Antikörpers ist weiterhin zu überlegen, ob die bisherigen Erkenntnisse auch diagnostischen Wert haben und beispielsweise IL-1 als Indikator einer intrauterinen Infektion sowie gleichzeitig eines drohenden PROM dienen könnte. Einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2014 lässt sich beispielsweise entnehmen, dass ein kombiniertes Biomarkermodell aus IL-1 und IL-1-ra als Vorhersagefaktor für eine termingerechte Entbindung genutzt werden kann. Hierfür wurde die Koexpression von IL-1 und IL-1-ra im Zervikovaginalsekret bei Frauen mit spontaner Geburt zwischen der 24. und 35. SSW untersucht. Dabei hat sich eine Verschiebung des Zytokingleichgewichts vor Beginn der Wehen gezeigt. Die Sensitivität betrug hierbei 86%, die Spezifität 92%. [43]

Aus dieser Arbeit lässt sich schließen, dass das o.g. Biomarkermodell aus IL-1 und IL-1-ra nicht nur eine termingerechte Entbindung, sondern auch eine PTB vorhersagen könnte. Darüber hinaus ist fraglich, ob diese Erkenntnis auch in Bezug auf einen PROM genutzt

werden kann, da hierbei zunächst lediglich eine Ruptur der Eihäute ohne Einsetzen der Wehen auftritt, sich die genannten Ergebnisse jedoch auf den Beginn der Wehen beziehen. Da die Wehen i.d.R. bald nach stattgehabten PROM einsetzen, kann die zeitliche Verzögerung jedoch möglicherweise auch vernachlässigt werden. [15]

Dieser Ansatz wird auch durch die Untersuchungen von Amabebe et al. 2018 unterstützt, laut welcher die IL-1 $\beta$ -Konzentration bei Frauen, welche termingerecht entbinden, im Gegensatz zu Frauen mit einer PTB signifikant abnimmt. Vermutlich lässt sich dies durch eine anhaltende Entzündung des Chorions sowie der Dezidua erklären. Dieser Studie zufolge kann IL-1 $\beta$  also ggf. tatsächlich als Screeningparameter für eine PTB genutzt werden, wofür jedoch noch umfassendere Untersuchungen benötigt werden. [3]

### ***MCP-1 und -3***

Bei mikrobieller Invasion ist die Rekrutierung von Entzündungszellen ein ausschlaggebender Mechanismus der angeborenen Immunabwehr. So vermittelt der Chemokinrezeptor CCR2 beispielsweise die Rekrutierung von Monozyten zum Ort der Inflammation aus dem Knochenmark. Dieser Rezeptor und die damit verbundene Reaktion kann durch die beiden CC-Chemokine MCP-1 und MCP-3 induziert werden. In einem Mausmodell konnte die Rolle von MCP-1 und -3 in der Abwehr von Mikroorganismen verdeutlicht werden. Hierbei war es MCP-3-defizienten Mäusen beispielsweise nicht möglich, Bakterien effizient aus der Milz zu entfernen. Gleichzeitig ließen sich signifikant weniger Monozyten im Blutkreislauf und der Milz, dafür jedoch erhöhte Zahlen im Knochenmark nachweisen, was für eine verminderte Monozytenrekrutierung spricht. [50]

Bereits diese ersten Fakten legen eine Assoziation der nach unserer Auswertung signifikant erhöhten umbilikalen MCP-3- und leicht unterhalb des Signifikanzniveaus gelegenen MCP-1-Konzentrationen mit einer Keimaszension nach PROM nahe.

Diese Vermutung kann durch die Ergebnisse von Jacobsson et al. 2005 untermauert werden, wobei ebenfalls das Vorhandensein von MCP-3 nach mikrobieller Invasion sowie bei Entzündungen der Amnionhöhle aufgezeigt werden konnte. Zudem wurde insbesondere bei PTBs vor der 34. SSW MCP-3 im Fruchtwasser nachgewiesen. [47] Darüber hinaus wurde in einer Arbeit aus dem Jahr 2007 der Zusammenhang zwischen den Konzentrationen verschiedener Zytokine (IL6, IL-8, IL-18, MCP-1, MCP-3) in Gebärmutterhals und Fruchtwasser mit der Entwicklung einer HCA bei PTL und PROM untersucht. Es hat sich gezeigt, dass die intraamniotischen Spiegel unter anderem von MCP-3 bei Fällen mit HCA signifikant höher waren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Amnionspiegel der Zytokine

hatten einen prädiktiven Charakter und konnten alle eine HCA voraussagen. Des Weiteren scheint die Höhe der Zytokinkonzentrationen mit dem Grad der entzündlichen Infiltration in Plazentagewebeproben zu korrelieren. [45]

Demzufolge nimmt MCP-3 neben anderen Zytokinen im Rahmen von intrauterinen Infektionsgeschehen durchaus eine nicht unbedeutende Rolle ein. Im Hinblick auf eine Vergleichbarkeit mit unseren Messergebnissen stellt sich erneut die Frage, inwiefern das Zytokinprofil im Nabelschnurblut dem Zytokinprofil des Fruchtwassers gleicht bzw. inwiefern es dieses repräsentiert.

Eine Veröffentlichung aus dem Jahr 2017 beleuchtet die Assoziation erhöhter umbilikaler Zytokinspiegel mit dem GA der Neonaten, insbesondere auch im Hinblick auf daraus entstehende Komplikationen in der Neonatalperiode. Hierbei hat sich neben anderen Zytokinen auch insbesondere MCP-1 hervorgetan, welches bei sehr frühgeborenen Neonaten im Nabelschnurblut signifikant erhöht war im Vergleich zu Reifgeborenen. Darüber hinaus wurden die Zytokinspiegel im Nabelschnurblut auch hinsichtlich eines Zusammenhanges mit Komplikationen in der Schwangerschaft und nach Geburt untersucht. Erneut konnten erhöhte MCP-1-Level mit intrauterinen Entzündungen, PTBs und neonatalen Komplikationen in Verbindung gebracht werden. Otsubo et al. 2017 legen nahe, die Bestimmung entsprechender Zytokine als diagnostische Maßnahmen zu etablieren, um eine Veränderung dieser als prädiktiven Faktor für neonatale Komplikationen nach intrauteriner Entzündung nutzen zu können. [79]

Nach Übertragung aller obigen Erkenntnisse auf unsere Ergebnisse ist eine mikrobielle Invasion mit nachfolgender Inflammation durch die signifikant hohen MCP-3- sowie GM-CSF-Spiegel als äußerst wahrscheinlich anzusehen. Weiterhin hat sich durch verschiedene Untersuchungen ein Zusammenhang der MCP-Konzentrationen mit einer PTB aufzeigen lassen, sodass das GA hier ebenfalls ursächlich sein könnte. Da allerdings beide Kollektive durch frühgeborene Neonaten gebildet wurden, zwischen welchen sich das mittlere GA nur unwesentlich unterschied, ist nicht von einer Beeinflussung auszugehen. Zudem ist bekannt, dass die Synthese von MCPs auf unterschiedlichen Wegen stimuliert werden kann. Neben bakteriellen oder viralen Reizen ist dies auch durch proinflammatorische Zytokine, wie IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-1 und TNF möglich. [116] Daher scheint ein weiterer möglicher Faktor für die erhöhten MCP-Konzentrationen die signifikant erhöhten IL-1-Konzentrationen zu sein.

## **5.2 Zusammenhang verschiedener Zytokine mit neonatologischen Komplikationen**

Frühgeborene sind trotz des medizinischen Fortschritts immer noch deutlich häufiger von Komplikationen in der Neonatalperiode betroffen als reifgeborene Kinder. Hierbei nehmen sowohl Häufigkeit als auch Schwere mit abnehmendem GA bei Geburt zu. Auch wenn die Morbiditäts- und Mortalitätsraten in den letzten Jahrzehnten deutlich gesunken sind, bleibt die Frühgeburtlichkeit Hauptursache für die perinatale Mortalität. [35,81,110]

Eine Vielzahl von Studien konnte aufzeigen, dass sowohl perinatale entzündliche Erkrankungen als auch andere Komplikationen mit einem Ungleichgewicht von Zytokinen verbunden sind [38]. Sowohl im diagnostischen als auch im therapeutischen Bereich haben sich bereits einige Zytokine etablieren können. Die Aufmerksamkeit liegt jedoch zunehmend auf der Präventivdiagnostik, um einen komplizierten postnatalen Verlauf abmildern oder ggf. sogar vermeiden zu können [28,67,88].

### ***Interleukin-1***

In der Vergangenheit konnte IL-1 bereits mit vielen Vorgängen im Rahmen der Geburt, aber auch der Neonatalperiode in Verbindung gebracht werden. So ist beispielsweise bekannt, dass eine unzureichende Immunantwort durch Zytokine in der noch unreifen Lunge mit einem ANS assoziiert ist. Analog zu Glucocorticoiden vermag IL-1 durch Bindung an intrapulmonale Rezeptoren die Surfactantbildung zu beschleunigen und somit die Lungenreife zu unterstützen. [38,88] Daher kann davon ausgegangen werden, dass bei ausreichenden IL-1-Spiegeln das Risiko für ein ANS deutlich reduziert ist.

Unsere Ergebnisse haben signifikant höhere Konzentrationen von IL-1 $\beta$  im fetalen Blut nach PROM gezeigt, was möglicherweise protektiv hinsichtlich einer pulmonalen Problematik zu sein scheint. Dies steht im Einklang mit dem neonatalen Outcome unserer Probanden bzw. der Häufigkeit einer Aufnahme auf die ICU, da diese in der PROM-Gruppe vergleichsweise deutlich geringer war.

Eine weitere sehr häufige Komplikation stellt die neonatale Sepsis dar. Sowohl bei der Diagnose als auch im Sinne geeigneter Verlaufsparemeter hinsichtlich eines Therapieerfolges unter antibiotischer Therapie scheinen laut der Arbeit von Kurt et al. 2007 neben IL-6 auch andere Zytokine eine nicht unbedeutende Rolle zu spielen. Zur Evaluation der Fragestellung wurden die Probanden verschiedenen Gruppen zugeordnet: Neugeborene mit Kultur-positiver Sepsis, Neugeborene mit Kultur-negativer Sepsis und gesunde Neonaten. Bei Sepsis mit positiver Blutkultur wurden zum Zeitpunkt der Diagnosestellung signifikant höhere

Serumspiegel von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$ , verglichen mit den Kontrollgruppen, detektiert. Im Vergleich der Zytokinkonzentrationen am siebten Tag nach antibiotischer Therapie mit den Ausgangswerten bei Diagnose zeigte sich sowohl bei kulturpositiver als auch kulturnegativer Sepsis ein signifikanter Unterschied. Somit weisen alle vier Entzündungsmediatoren ein diagnostisches Potential auf und könnten ggf. zur Bewertung der Therapieeffizienz herangezogen werden. [57]

Im Rahmen unserer Zytokinbestimmungen wurden lediglich signifikant erhöhte Konzentrationen von IL-1 $\beta$  bei den Probanden nach PROM festgestellt. Sowohl bei IL-8 als auch TNF- $\alpha$  ging der p-Wert gegen 1,0, sodass kein relevanter Unterschied zwischen den zu vergleichenden Gruppen nachzuweisen war. Daher stellt sich die Frage, ob die erhöhten IL-1 $\beta$ -Konzentrationen Ausdruck einer starken Entzündungsreaktion im Sinne einer Bakteriämie oder vielmehr eines anderen Geschehens waren, insbesondere da die IL-6-Spiegel sogar in der Gruppe mit PROM insgesamt niedriger detektiert wurden.

Neben Studien an Blut- oder Fruchtwasserproben liegen auch einige Daten bezüglich des neonatalen Outcomes bei bestimmten pathologischen Prozessen in anderen Untersuchungsmaterialien vor. So wurde beispielsweise 2006 eine Studie veröffentlicht, welche sich mit verschiedenen Zytokinen als Vorhersagefaktor für das Outcome nach stattgehabter HIE beschäftigt. Hierzu hat man im Rahmen einer prospektiven Studie Serum und Liquor von Säuglingen mit HIE und einer Kontrollgruppe hinsichtlich der Konzentrationen von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  untersucht. Alle drei Zytokine waren in der Experimentalgruppe signifikant erhöht, jedoch erbrachte IL-1 $\beta$  das aussagekräftigste Ergebnis. Die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen zeigten sowohl die höchste Korrelation mit dem Schweregrad der HIE, als auch den höchsten Liquor-Serum-Quotienten. Darüber hinaus konnte IL-1 $\beta$  als prädiktiver Faktor für auffällige neurologische Befunde mit einer Sensitivität von 88% und einer Spezifität von 80% genutzt werden. [2]

Laut der Arbeit von Cayabyab et al. 2003 kann die Konzentration von IL-1 $\beta$  im Trachealsekret Frühgeborener mit ANS als Marker für eine prä- oder perinatale Entzündung genutzt werden und sich somit eignen, den weiteren klinischen Verlauf des Neonaten vorherzusagen. Es konnte ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein einer dokumentierten mütterlichen Chorioamnionitis und dem Nachweis von IL-1 $\beta$  im Trachealspirat aufgezeigt werden. Zudem ergab sich eine Korrelation mit der Gesamtzellzahl, der Granulozyten- und Makrophagenanzahl sowie dem Vorhandensein von IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  im Trachealspirat. Neben den möglichen Rückschlüssen auf eine vorherige intrauterine Infektion hat sich auch ein Zusammenhang mit dem neonatalen Outcome gezeigt, wobei Frühgeborene, welche initial IL-1 $\beta$ -positives Sekret aufwiesen, eine längere assistierte

Beatmung, häufiger die Notwendigkeit einer Sauerstoffapplikation sowie einen insgesamt längere Therapiedauer benötigten. [20]

### ***Interleukin-10***

Nachdem durch eine Arbeit aus dem Jahr 2000 bereits ein Zusammenhang zwischen der IL-10-Konzentration und dem GA sowie der daraus resultierenden fetalen Unreife hergestellt werden konnte, wurde durch die Forschungsgruppe um A. Blanco-Quirós auch eine Korrelation mit der Entstehung eines ANS untersucht. Da das ANS eine typische Komplikation Frühgeborener und der pulmonalen Unreife geschuldet ist, lag ein Zusammenhang mit Veränderungen bzw. einer Erhöhung der IL-10-Konzentration nahe, welcher auch bestätigt werden konnte. [12,13]

Eine prospektive Studie konnte zudem aufzeigen, dass nicht nur IL-6, sondern auch das antiinflammatorische IL-10 im Zusammenhang mit der neonatalen Sepsis eine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Es wurden sowohl die Plasmaspiegel von IL-6, IL-10, als auch das CRP im Plasma Frühgeborener zum Zeitpunkt erster Symptome einer Sepsis nach 12 und 24 Stunden bestimmt. Zum Zeitpunkt der zweiten Bestimmung haben die IL-6-Spiegel signifikant mit den IL-10-Spiegeln korreliert. Die maximale IL-6-Konzentration konnte zu Beginn der Sepsis-Symptome, das IL-10-Maximum erst 12 Stunden später detektiert werden. Neben der Sepsis wurden auch zwei weitere Gruppen mit im Verlauf auftretender NEK sowie Pneumonie untersucht, welche ebenfalls erhöhte Konzentrationen der beiden Interleukine sowie höhere CRP-Spiegel zeigten. Interessanterweise wurde nicht nur ein statistisch signifikant höheres CRP bei Aufnahme später letal verlaufender Erkrankungsfälle beobachtet, sondern auch eine signifikante Erhöhung des IL-10. Daher wurde eine erhöhte IL-10-Konzentration als prädiktiver Faktor für einen schweren und ggf. letalen Verlauf gewertet und der vermutete prognostische Wert von IL-10 betont. [89]

Dies passt insofern zu den Ergebnissen unserer Untersuchungen, als dass auch hier ein hohes IL-10 nach zuvor stattgehabter Komplikation im Sinne eines PROM nachgewiesen werden konnte und ein solcher PROM ein erhöhtes Risiko für Komplikationen in der Neonatalperiode, insbesondere entzündlicher bzw. infektiologischer Genese, birgt. Andererseits gingen die IL-10-Konzentrationen der PROM-Gruppe nicht mit einer erhöhten Häufigkeit der Aufnahme auf die ICU einher, sodass ein schwerwiegender Verlauf nicht naheliegend ist. Hinzu kommt die Tatsache, dass die IL-6-Konzentrationen in der PROM-Gruppe im Mittel niedriger waren als die der Kontroll-Gruppe, sodass eine neonatale Sepsis als Folge einer möglichen mikrobiellen Invasion bei unseren Probanden äußerst unwahrscheinlich ist.

### ***MCP-1 und -3***

Viele Untersuchung von Zytokinprofilen im Nabelschnurblut suchen nach einem Zusammenhang dieser mit Komplikationen in der Schwangerschaft sowie nach Geburt. Hierbei konnten erhöhte MCP-1-Level nicht nur mit intrauterinen Entzündungen und PTBs, sondern auch mit neonatalen Komplikationen in Verbindung gebracht werden. Otsubo et al. 2017 legen nahe, die Bestimmung entsprechender Zytokine als diagnostische Maßnahmen zu etablieren, um eine Veränderung dieser als prädiktiven Faktor für neonatale Komplikationen nach intrauteriner Entzündung nutzen zu können. [79]

Ebenfalls im Hinblick auf neue Möglichkeiten in der Präventivdiagnostik hat eine Studie aus dem Jahr 2018 den diagnostischen Wert einer ganzen Reihe verschiedener Zytokine im Serum bei Neonaten untersucht, welche ein erhöhtes Risiko hatten, im Verlauf eine Sepsis zu entwickeln. Um dies zu objektivieren, wurden die Zytokinspiegel von 96 Hochrisiko-Probanden bei Aufnahme, bei Auftreten sowie bei Nichtauftreten einer Sepsis analysiert. 52% der Neonaten entwickelten eine Sepsis, wovon etwa die Hälfte als Early-Onset- und die andere Hälfte als Late-Onset-Sepsis zu kategorisieren waren. Insgesamt war das Auftreten einer Sepsis mit erhöhten Konzentrationen von G-CSF, MCP1, IL-6, IL-10 sowie niedrigen IFN-Konzentrationen verbunden. Darüber hinaus konnte eine Assoziation hoher IL-6- und IL-10-Spiegel mit einer schweren, hohe IL-6- und G-CSF-Spiegel hingegen mit einer frühen Sepsis aufgezeigt werden. [59]

Die Identifikation prognostischer Faktoren hat unter anderem auch als Motivation für die Untersuchungen des Zytokinprofils an unserem Kollektiv gedient. Da sich hierbei keine hohen IL-6-Spiegel gezeigt haben, ist davon auszugehen, dass zwar eine mikrobielle Invasion stattgefunden hat, jedoch bei im Vergleich niedrigerer Aufnahme rate auf die ICU keine Sepsis im weiteren Verlauf aufgetreten ist. Eine mikrobielle Invasion ist durch die signifikant hohen MCP-3- sowie GM-CSF-Spiegel als äußerst wahrscheinlich anzusehen. Die isolierte Erhöhung von IL-10 spricht weiterhin für die Suppression einer fulminanten Entzündungsreaktion, was einerseits als eigene Schutzmaßnahme des Körpers, andererseits auch teilweise durch Erreger selbst bedingt sein kann. Gegen eine durch die Keime induzierte gesteigerte IL-10 Sekretion spricht jedoch auch wieder der vermeintlich unkomplizierte Verlauf mit geringer Intensivpflichtigkeit der Neonaten sowie die Tatsache, dass die Fähigkeit zur Hochregulation von IL-10 bei den klassischen Erregern ascendierender Infektionen bisher nicht bekannt ist.

### **5.3 Vergleichbarkeit der Zytokinkonzentrationen in Fruchtwasser und Nabelschnurblut**

Zytokinbestimmungen im Fruchtwasser als Marker für verschiedene Pathologien in der Schwangerschaft wurden bereits vielfach durchgeführt und haben insbesondere hinsichtlich intrauteriner Infektionen und Frühgeburtlichkeit vielversprechende Ergebnisse geliefert.

Aufgrund einer bis dato unzureichenden Datenlage hinsichtlich des Zytokinprofils einer „normalen, unkomplizierten“ Schwangerschaft als Vergleichs- bzw. Ausgangswert wurde dies in der Arbeit von Chow et al. 2008 weitergehend veranschaulicht und zusätzlich die Korrelation mit den entsprechenden Serumkonzentrationen untersucht. Um eine Infektion auszuschließen, wurden sowohl die Fruchtwasser- als auch die Serumproben der Probandinnen anhand einer Multiplex-PCR auf 17 verschiedene Erreger kongenitaler Infektionen untersucht und diese teilweise auch noch durch serologische Testung ergänzt. Bei IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1 und IL-1RA haben sich signifikante Erhöhungen der Konzentrationen im Fruchtwasser, ohne Hinweis auf Infektion, im Vergleich zum maternalen Serum gezeigt. Bei den 12 übrigen Zytokinen (eotaxin, IFN- $\gamma$ , IL-9, IL-12, IL-15, IL-17, MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, TNF- $\alpha$ , VEGF, PDGF) hingegen zeigte sich das Fruchtwasser-/Serum-Verhältnis genau umgekehrt. Da also zwischen den Konzentrationen aller 17 Zytokine signifikante Unterschiede bei Vergleich von Fruchtwasser- mit Serumproben festzustellen waren, ist davon auszugehen, dass das Fruchtwasser zumindest einen Teil der fetalen Immunantwort abbilden kann, da es unter anderem aus fetalen Sekreten besteht. [21]

Diesbezüglich ist auch das Wissen über die Plazentapassage durch Zytokine nicht zu missachten, um beurteilen zu können, inwiefern das fetale Blut auch zumindest teilweise die maternalen Zytokinverhältnisse widerspiegelt. Laut Aaltonen et al. 2005 kommt es in der gesunden Plazenta nicht zu einer Passage proinflammatorischer Zytokine. In dieser Studie wurde speziell die Passage von IL-6, IL-1 $\beta$  sowie TNF- $\alpha$  betrachtet, wobei nach Zugabe des jeweiligen Zytokins lediglich die Konzentration auf der unilateralen, jedoch nicht auf der kontralateralen Seite der Plazenta anstieg. Es konnte lediglich als Reaktion auf die Perfusion eine geringe endogene Freisetzung von IL-6 beobachtet werden. [1] Allerdings gibt es hinsichtlich der Betrachtung von IL-6 differente Ergebnisse. Hier konnte durch die Arbeit von Zaretsky et al. 2004 eine bidirektionale Passage von IL-6 über die gesunde Plazenta nachgewiesen werden. Weiterhin wurden neben IL-6 auch die inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  in die Untersuchung miteinbezogen, wobei hier eine plazentare Passage nicht eindeutig bzw. allenfalls eine minimale Passage ins fetale Blut aufgezeigt werden konnte. [114]

Den oben genannten Studien folgend ist zumindest eine gewisse transplazentare Passage der Interleukine vom mütterlichen ins fetale Blut denkbar. Um dies jedoch untermauern zu können, wären eine eindeutigere Datenlage und somit weitere Nachforschungen notwendig. Daher wäre auch ein Vergleich der durch uns erhobenen fetalen Zytokinkonzentrationen mit denen im mütterlichen Blut von Interesse gewesen.

Insgesamt lässt sich sagen, dass mithilfe von Fruchtwasserproben bereits eine gewisse Repräsentation der fetalen Immunantwort erreicht und die Erkenntnisse entsprechend genutzt werden konnten [21]. Dennoch sind ohne Zweifel bei einer solchen Fragestellung Messungen im Nabelschnurblut denen in anderen Untersuchungsmaterialien deutlich überlegen.

## **5.4 Interleukin-6 im Nabelschnurblut**

Hinsichtlich einer Objektivierung der fetalen Immunantwort hat Nabelschnurblut als Untersuchungsmedium in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung und Interesse gewonnen.

So hat eine Arbeit aus dem Jahr 2013 beispielsweise ein besonderes Augenmerk auf Interleukin 6 im Nabelschnurblut als Referenzwert für die fetale inflammatorische Immunantwort sowohl bei MIAC als auch bei HCA nach PROM gelegt. IL-6 wurde im venösen Nabelschnurblut bestimmt und ab einer Serumkonzentration von  $> 11 \text{ pg/ml}$  als FIRS gewertet. Hierbei hat sich gezeigt, dass insbesondere die Kombination aus MIAC und einer HCA eine höhere fetale inflammatorische Reaktion auslöst als das isolierte Vorliegen eines der beiden Phänomene. Allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den IL-6-Konzentrationen bei alleinigem Vorliegen einer MIAC oder HCA und der Kontrollgruppe festgestellt werden. [52] Laut Musilova et al. 2017 hingegen hat eine isolierte intraamniotische Inflammation mit den höchsten IL-6-Spiegeln und damit der ausgeprägtesten fetalen Immunantwort korreliert, unabhängig davon, ob eine mikrobielle Invasion der Fruchthöhle stattgefunden hat oder nicht [71].

Im Rahmen der neonatalen Immunantwort gilt IL-6 bereits seit Jahren als sensitiver Parameter für die Detektion bakterieller Infektionen beim Neonaten [18,74]. Jüngere Studien belegen auch seine Funktion als prädiktiven Faktor für die neonatale Sepsis, insbesondere auch nach PROM, sodass dies in Bezug auf die neonatale Morbidität von großer Bedeutung ist [20,60,76].

Laut der Messungen im Nabelschnurblut unserer Probanden stellten sich die IL-6-Konzentrationen in der Experimentalgruppe mit PROM im Mittel sogar niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe dar. Dieses Ergebnis könnte auf die signifikant erhöhten Konzentrationen von IL-10 im Kollektiv mit PROM zurückgeführt werden.

Ein weiterer Aspekt wäre möglicherweise, dass eine Entzündung des Amnions in der Mehrzahl der Fälle nicht ursächlich für den stattgehabten PROM war, nur in mit FIRS gekommen ist. Gerade in diesem Fall wäre der weitere postnatale Verlauf mit einer mehrzeitigen Erhebung der Entzündungsparameter sowie einer Bestimmung dieser im peripheren Blut der Mutter durchaus von Interesse gewesen, um die Wahrscheinlichkeit einer intraamnialen Infektion einschätzen zu können. Trotz des Fehlens einer mehrzeitigen Bestimmung der Zytokine oder einer weiteren Dokumentation des postnatalen Verlaufs, kann das neonatale Outcome jedoch zumindest hinsichtlich der Notwendigkeit einer Aufnahme auf eine ICU veranschaulicht werden. Hierbei lag der Anteil an intensivpflichtigen Neonaten in der PROM-Gruppe deutlich unter dem der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis in Addition mit den niedrigen IL-6-Konzentrationen relativiert die Wahrscheinlichkeit eines fulminanten Entzündungsgeschehens sowohl im Sinne einer Early-Onset-Sepsis als auch einer Chorioamnionitis deutlich. Hinzu kommt an dieser Stelle auch die Abwesenheit von klinischen Entzündungszeichen bei den Müttern.

Neben all den dargelegten Fakten hätte eine gleichzeitige Messung der Zytokine im Fruchtwasser durchaus hilfreich sein können. Nicht nur zur Detektion einer Infektion, sondern ggf. auch bezüglich der Funktionalität eines Fruchtwasser-/Serum-Quotienten verschiedener Zytokine, da ein Zusammenhang zwischen intraamnialer Entzündung und FIRS sowie dem Auftreten von Komplikationen in der Neonatalperiode bereits vielfach belegt werden konnte. Diese These wird beispielsweise durch die Arbeit von Musilova et al. 2018 gestützt, welche innerhalb eines Kollektivs von Frauen mit MIAC und intraamniotischer Inflammation das neonatale Outcome anhand des Vorhandenseins eines FIRS und der damit verbundenen Raten des Auftretens einer Early-Onset-Sepsis sowie einer IVH I° und II° untersucht hat. Hierbei hat sich gezeigt, dass die höchsten mittleren IL-6-Konzentrationen im Nabelschnurblut mit den FIRS-Raten korreliert haben. Außerdem standen die genannten neonatalen Komplikationen im Zusammenhang mit dem Vorhandensein eines FIRS, welches anhand der IL-6-Konzentrationen im Nabelschnurblut und der Histopathologie der Plazenta definiert wurde. [72]

## **5.5 Einfluss verschiedener maternalen, fetaler und äußerer Faktoren auf den Zytokinhaushalt**

### ***Ethnische Herkunft***

Da es sich bei unserem Kollektiv um Frauen aus Sri Lanka handelt, zeichnet sich zudem die Frage ab, ob auch die Ethnie und damit genetische Unterschiede einen Einfluss auf das Ergebnis unserer Arbeit haben.

Diesbezüglich wurde im Indian Journal of Medical Research eine Studie veröffentlicht, welche eine Assoziation von Zytokin-Genpolymorphismen und Zytokinspiegeln bei PTB untersucht hat. Diese Untersuchung stützte sich auf die Vermutung, dass die unterschiedlichen Frühgeburtsraten zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen auf genetisch vermittelte unterschiedliche Zytokinreaktionen bei Infektionen zurückzuführen seien. Untersucht wurden genetische Variationen der Gene von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  und toll-like Rezeptor-4. Jedoch konnte keine Assoziation zwischen einem der Polymorphismen und PTB nachgewiesen werden. [81]

Auch wenn genetische Polymorphismen der verschiedenen Zytokine keine Rolle zu spielen scheinen, so ist dennoch nicht auszuschließen, dass andere ethnisch bzw. kulturell bedingte Unterschiede, wie beispielsweise das Alter der Mutter bei Geburt, die Anzahl der Geburten, die medizinische Versorgung während der Schwangerschaft und Geburt durchaus eine Rolle spielen könnten. Zudem stellt sich die Frage, inwiefern sich das Keimspektrum zwischen den ethnischen Gruppen und damit ggf. auch die Anzahl und Schwere von intrauterinen Infektionen unterscheidet. Zumindest in Bezug auf einen stattgehabten PROM scheint das Alter der Mutter keine entscheidende Rolle zu spielen, da hierbei laut unserer Auswertung kein statistisch signifikanter Zusammenhang aufgezeigt werden konnte.

### ***Schwangerschaftshypertonie***

Wie bereits erwähnt, wurden im Rahmen der Patientenauswahl Probandinnen mit PIH aus dem Kontrollkollektiv ausgeschlossen, um die Ergebnisse der Zytokinmessungen möglichst nicht zu verfälschen.

Diese Entscheidung lässt sich unter anderem durch die Beobachtungen von Yin et al. 1998 begründen, welche veranschaulichen, dass eine PIH die Immunaktivität der Betroffenen steigert. Die IL-6-Spiegel im peripheren Blut stiegen in den Untersuchungen deutlich an und lagen bei mittelschwerer und schwerer PIH signifikant höher als bei normaler

Schwangerschaft. Aufgrund dieser Überproduktion von IL-6 durch aktivierte Immunzellen scheint es nachfolgend zu einer Schädigung des Gefäßendothels zu kommen. Im Gegensatz dazu konnte eine Abnahme der IL-6-mRNA in der Plazenta sowie der IL-6-Konzentration im Fruchtwasser beobachtet werden, wofür eine abnehmende Fähigkeit der Produktion sowie des Transports von IL-6 verantwortlich gemacht wurde. Die Schädigung des Gefäßendothels mit Transport- und Synthesestörung der Plazenta sowie eine Ischämie der Plazenta-Trophoblasten wird als ursächlich für die Störung von Wachstum und Entwicklung von Plazenta und Fetus gesehen. [113]

Charakteristisch für die PIH ist bekanntlich eine generalisierte Vasokonstriktion, welche somit auch eine uteroplazentare Hypoperfusion bedingt [37,62]. Diese scheint Folge einer abnormen Invasion von Zytotrophoblasten in den Spiralarteriolen zu sein. Aus einer plazentaren Ischämie mit ausgeprägter Dysfunktion des mütterlichen Gefäßendothels kann ein gestörtes Gleichgewicht von Vasokonstriktoren und Vasodilatoren resultieren. [37] Laut Pierce et al. 2000 führt eine solche plazentare Hypoperfusion zu einer erhöhten Produktion und damit erhöhten Serumspiegeln von TNF- $\alpha$  und IL-6 im peripheren Blut [83]. Auch die Ergebnisse von Li et al. 2016 bestätigen, dass nicht nur die Serumkonzentration von IL-6 durch eine PIH beeinflusst wird, sondern auch der TNF $\alpha$ -Spiegel im peripheren Blut. In der Studie zeigte sich eine signifikant höhere Konzentration beider Zytokine bei Frauen mit PIH im Vergleich zu Frauen ohne Schwangerschaftshypertonie. [62]

Demnach ist anzunehmen, dass eine solche Hypoperfusion mit nachfolgender Schädigung von Gefäßen und Plazenta auch zur Veränderung weiterer inflammatorischer Zytokine führen könnte.

### ***Gestationsdiabetes/Insulinresistenz***

Im Kollektiv belassen wurden Patientinnen mit Schwangerschaftsdiabetes (Gestationsdiabetes mellitus [GDM]). Dies trifft lediglich auf 5 Probandinnen zu, welche sich annähernd gleich auf beide Gruppen verteilen (2 in der Experimental-, 3 in der Kontrollgruppe), sodass selbst bei unter GDM veränderten Zytokinkonzentrationen, dies keinen signifikanten Einfluss auf unsere Ergebnisse haben sollte. Weiterhin ist nicht nachzuvollziehen, wie sich die absoluten Blutzuckerwerte der Probandinnen dargestellt haben, wie regelmäßig diese kontrolliert wurden und zu welchem Zeitpunkt in der Schwangerschaft der GDM diagnostiziert wurde. Außerdem liegen keine Informationen über eine möglicherweise stattgehabte Therapie vor. Es ist davon auszugehen, dass ein therapierter und gut eingestellter GDM keine weitreichenden Auswirkungen im Sinne inflammatorischer Reaktionen auf das Zytokingleichgewicht des Fetus haben sollte. Zuletzt ist fraglich, ob die übrigen Probandinnen

auch zeitweise Blutzucker-Erhöhungen oder ggf. sogar auffällige orale Glucose-Toleranz-Tests aufwiesen.

In der Schwangerschaft ist das Auftreten einer Insulinresistenz zunächst physiologisch, da sie die Energiezufuhr für das ungeborene Kind erleichtert. Aus diesem Grund steigt der Insulinbedarf deutlich an, was jedoch nicht immer durch die mütterliche Synthese gedeckt werden kann. Kommt es zu eben beschriebenen Missverhältnis, steigen die Blutzuckerwerte der Mutter an, was zu einem GDM führen kann. [46] Laut einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2014 führt eine gestörte Glukosetoleranz aufgrund einer Insulinresistenz nicht nur zur vermehrten Ausschüttung gewisser Entzündungsmediatoren, sondern auch zu verminderten Konzentrationen antiinflammatorischer Zytokine. Insbesondere bei IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-10 wurde eine veränderte Sekretion beobachtet. [112]

Laut King et al. 2008 können viele Faktoren eine Insulinresistenz verstärken. Dies kann einerseits bedingt sein durch beeinflussbare Faktoren wie Bewegungsmangel, Adipositas, jedoch auch genetische Faktoren, chronische Entzündungen sowie Infektionen. Es konnte eine durch die Aktivierung von Monozyten und vermehrte Synthese von Entzündungsmediatoren ausgelöste Verstärkung der Inflammation bei Insulinresistenz ohne das Vorhandensein eines Diabetes festgestellt werden. [54] Folglich kann davon ausgegangen werden, dass bereits die physiologische, in der Schwangerschaft auftretende Insulinresistenz zu einer Veränderung der oben genannten Zytokinkonzentrationen führt. Allerdings ist dies ein physiologischer und somit bei jeder Schwangeren vorhandener biochemischer Vorgang und sollte demnach zu keinem Unterschied zwischen den beiden Gruppen führen.

Eine Übersichtsarbeit bezüglich GDM, welche die mütterlichen Zytokinspiegel im 2. und 3. Trimenon überprüfte, konnte lediglich eine geringfügig höhere TNF- $\alpha$ -Konzentration bei Vorliegen eines GDM nachweisen, welche jedoch nicht statistisch signifikant war. Bei allen anderen Zytokinen konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. [33] Die Untersuchungen von Atégbo et al. 2006 ergaben hingegen eine signifikante Erhöhung sowohl der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  sowie des antiinflammatorischen IL-10 bei Müttern mit diagnostiziertem GDM im Vergleich zur Kontrollgruppe [4].

### ***Fetale Hypoxie / hypoxischer Stress***

Die „fetale Hypoxie“ im Sinne einer CTG-Verschlechterung wurde ebenfalls mehrfach als „Auffälligkeit“ verzeichnet, wobei nicht nachzuvollziehen ist, ob diese andauernd oder nur kurzzeitig vorhanden war, therapeutische Konsequenzen nach sich zog und einen Einfluss auf das neonatale Outcome hatte oder nicht.

Im Rahmen bereits genannter Studien haben sich eindeutige Zusammenhänge zwischen den Veränderungen gewisser Zytokinprofile und hypoxischen Ereignissen in der Schwangerschaft sowie der postnatalen respiratorischen Anpassung gezeigt [20,77]. Es ist jedoch anzunehmen, dass die veränderten Zytokinprofile nicht Folge einer fetalen Hypoxie, sondern vielmehr eines Pathomechanismus sind, welcher die fetale Hypoxie verursacht hat. Oftmals stehen CTG-Veränderung in Zusammenhang mit intrauterinen Infektionen und somit einer inflammatorischen, durch entsprechende Entzündungsmediatoren vermittelten Reaktion.

In der Arbeit von Cayabyab et al. 2003 wurde beispielsweise das Trachealaspirat Frühgeborener bei dokumentierter mütterlicher Chorioamnionitis auf den Nachweis verschiedener Zytokine sowie veränderte Zellzahlen untersucht und gleichzeitig das neonatale Outcome hinsichtlich der respiratorischen Anpassung beurteilt. Es zeigte sich, dass Frühgeborene, welche initial IL-1 $\beta$ -positives Sekret aufwiesen, eine längere assistierte Beatmung, häufiger die Notwendigkeit einer Sauerstoffapplikation sowie eine insgesamt längere Therapiedauer benötigten. [20] Natürlich ist in dieser Konstellation die intrauterine Infektion als ursächlich sowohl für die pulmonale Situation, als auch die einhergehenden Zytokinveränderungen zu sehen.

Da sich auch in unseren Messungen erhöhte Konzentrationen, insbesondere von IL-1 $\beta$  in der PROM-Gruppe, gezeigt haben und ein PROM eine Keimaszension und die nachfolgende Entstehung eines Amnioninfektionssyndroms erleichtert, ist an dieser Stelle erneut die Möglichkeit einer stillen intrauterinen Infektion zu überlegen. Allerdings stellt sich die Frage, inwiefern Trachealaspirat mit Studien an fetalem Nabelschnurblut zu vergleichen ist.

Insgesamt wäre bei einer relevanten Infektion von erhöhten IL-6- und IL-8-Konzentrationen sowie entsprechenden klinischen Symptomen bei Mutter und Neonaten auszugehen. Zudem wäre je nach Ausmaß der Infektion eine schlechte postnatale Anpassung im Sinne eines erniedrigten APGAR-Wertes sowie einer erhöhten Rate an intensivpflichtigen Neonaten zu erwarten. Da der 5-Minuten-APGAR bei keinem einzigen Probanden unterhalb von 8 Punkten lag und die Häufigkeit an ICU-Aufnahmen in der PROM-Gruppe sogar deutlich niedriger verzeichnet wurde, sind demnach die als „fetale Hypoxie“ dokumentierten Ereignisse nicht als relevant bezüglich unserer Messergebnisse einzustufen.

Studien bezüglich des Einflusses einer chronischen Hypoxie in der Schwangerschaft auf lokale Entzündungsmechanismen ergaben ebenfalls veränderte Zytokinprofile, welche sich jedoch von denen bei intrauteriner Infektion unterscheiden.

Durch die Arbeit von Oh et al. 2008 konnte gezeigt werden, dass chronisch hypoxischer Stress zu einer lokalen inflammatorischen Reaktion in fetalen Herzen und somit zu signifikanten Erhöhungen verschiedener Zytokine sowie Metalloproteasen führt. Unter anderem zeigten

sich statistisch signifikant erhöhte Konzentrationen von TNF- $\alpha$  und IL-6 in den Kardiomyozyten. [77]

Natürlich ist chronisch hypoxischer Stress nicht mit einer kurzzeitigen CTG-Veränderung zu vergleichen, da dauerhafte lokale inflammatorische Reaktionen andere Folgen, häufig auch im Sinne irreversibler struktureller Veränderungen und somit chronischer Folgeerkrankungen nach sich ziehen können.

### ***Intrauterine Wachstumsretardierung***

Einige wenige Probanden in beiden Kollektiven wiesen eine IUGR auf, welche laut einer Untersuchung aus dem Jahr 2013 ebenfalls mit veränderten Zytokinkonzentrationen im Nabelschnurblut in Zusammenhang steht. Das Kollektiv umfasste insgesamt 93 Frühgeborene, von welchen 29 der SGA-Gruppe und 63 Probanden der Kontrollgruppe zuzuordnen waren. Alle Frühgeborenen wurden per CS entbunden und weder bei den Neonaten, noch bei der Mutter lagen Hinweise auf eine Infektion vor. Laut Lindner et al. 2013 haben sich nach Messung und statistischer Auswertung signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bei IL-8, IL-12p40 und G-CSF gezeigt, welche somit als ursächlich für eine IUGR sowie eine entsprechend erhöhte Morbidität und Mortalität in Betracht zu ziehen sind. [63]

Aufgrund eher geringer Probandenzahlen in der SGA-Gruppe wären weitere Studien mit größeren Kollektiven notwendig, um die Spezifität der Ergebnisse prüfen zu können. Generell ist ein Zusammenhang zwischen einer IUGR und Zytokinveränderungen jedoch durchaus naheliegend, da der IUGR gänzlich unterschiedliche Pathologien zugrunde liegen können.

Da lediglich ein Proband in der PROM- und hingegen zehn Probanden in der Kontroll-Gruppe eine IUGR aufwiesen, jedoch die Konzentrationen von IL-8, IL-12p40 und G-CSF in unseren Messungen keine nennenswerten Unterschiede zwischen den beiden Kollektiven hervorbrachten, ist eine Beeinflussung hierdurch unwahrscheinlich.

### ***Unspezifische Auffälligkeiten in der Schwangerschaft***

Ebenfalls im Patientenkollektiv belassen, wurden Probandinnen mit typischen, jedoch eher unspezifischen Auffälligkeiten in der Schwangerschaft, wie beispielsweise abdominellen Beschwerden bzw. Schmerzen, transitorischen vaginalen Blutungen, Beckenendlage des Kindes usw.

Auch hierbei ist natürlich nicht auszuschließen, dass diese zu einer Beeinflussung der Zytokinspiegel führen. Jedoch sind auch hier die Auffälligkeiten in beiden Gruppen und

wahrscheinlich mehr oder weniger ausgeprägt in nahezu jeder „normalen Schwangerschaft“ vorhanden.

### **Gestationsalter**

Eine Vielzahl von Studien belegt den Zusammenhang einer PTB mit veränderten Zytokinprofilen, wodurch es naheliegend scheint, dass auch eine deutliche Differenz des GA zu Unterschieden führen und die Ergebnisse beeinflussen kann. [6,12,79,81]

Diese These wird unter anderem auch durch eine Veröffentlichung aus dem Jahr 2012 unterstützt, welche sich mit den Variationen der Expression von Zytokinen durch verschiedene Einflussfaktoren, wie dem GA beschäftigt. Hierzu wurden Fruchtwasserproben einmal im mittleren Trimester per Amniozentese mit einem mittleren GA von 17 SSW und zudem bei Entbindung per CS mit einem mittleren GA von 39 SSW entnommen und mittels ELISA untersucht. Bei IL-4, IL-10, IL-12, MIP-1 $\beta$ , GRO- $\alpha$  und TNF- $\alpha$  konnten signifikante Unterschiede der Konzentrationen nachgewiesen werden. [108]

Weiterhin konnte in einer Studie bezüglich der Expression von Zytokinen und deren Modulatoren in einer normalen Schwangerschaft ebenfalls ein Zusammenhang der Veränderung verschiedener Zytokinprofile mit dem Anstieg des GA hergestellt werden. Da bekannt ist, dass lösliche IL-6-Rezeptoren und IL-1ras die Aktivität von IL-6 und IL-1 beeinflussen können, wurden alle 4 Komponenten sowohl im mütterlichen Serum zu verschiedenen Zeitpunkten in der Schwangerschaft, als auch nach der Entbindung im mütterlichen Blut und Nabelschnurblut gemessen. Hierbei zeigte sich, dass die Konzentrationen von IL-1ra und IL-6 mit fortschreitendem GA anstiegen. [5]

Ein Zusammenhang der in unseren Messungen bestimmten Zytokinkonzentrationen mit dem GA wurde ebenfalls mittels statistischer Testung untersucht, jedoch konnte keine Assoziation gefunden werden, weder in einer Gesamtauswertung, noch bei Auswertung innerhalb der einzelnen Kollektive, sodass hier nicht von einer Beeinflussung ausgegangen werden muss. Dies kann jedoch vor allem auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass nur sehr wenige Probanden ein GA < 32 SSW aufwiesen und daher nur eine geringe Repräsentation sehr unreifer Neugeborener im Kollektiv vorhanden war. Denn auch wenn sich im Rahmen unserer Auswertung kein Zusammenhang zwischen den Zytokinkonzentrationen und dem GA der Neonaten gezeigt hat, konnten bereits viele andere Studien einen Zusammenhang sowohl mit dem GA als auch mit einer einhergehenden Unreife und daraus entstehender Komplikationen in der Neonatalperiode darlegen. [6,12,79,81]

## **Geburtsmodus**

Weiterhin wurde im Rahmen unserer Nachforschungen die fetale Immunantwort bei vaginaler Entbindung und Entbindung per CS auf statistisch signifikante Zusammenhänge mit den verschiedenen Zytokinprofilen untersucht. Diesbezüglich liegen bereits mehrere Studien mit jedoch unterschiedlichen Ergebnissen vor.

So ist laut Tutdibi et al. 2012 die spontane Geburt mit vaginaler Entbindung im Vergleich zu einer elektiven CS nicht mit einer systemischen inflammatorischen Reaktion und einer vermehrten Ausschüttung von Entzündungsmediatoren verbunden. Lediglich TGF- $\beta$ 1 wies in der Gruppe nach spontaner vaginaler Entbindung (spontaneous vaginal delivery [SVD]) erhöhte Konzentrationen auf, sodass diesbezüglich weitere Nachforschungen angeraten sind. Untersucht wurden die Konzentrationen von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-17, IL-1-ra, löslicher IL-2 Rezeptor  $\alpha$ , GM-CSF, IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  sowie Interferon-induzierbares Protein 10 im venösen Nabelschnurblut bei 25 Probanden nach SVD im Vergleich mit 35 Probanden nach elektiver CS, sodass insgesamt von einem recht kleinen Patientenkollektiv gesprochen werden kann. Laut der Untersuchungen zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich Geschlechterverteilung, Geburtsgewicht, Nabelarterien-pH und APGAR-Wert. Allerdings lag das GA in der CS-Gruppe signifikant niedriger mit einer Differenz von einer Woche bei Vergleich der Mittelwerte, sodass dies neben der geringen Probandenzahl womöglich zusätzlich eine Rolle hinsichtlich der Zytokinkonzentrationen spielen kann. [105]

Im Gegensatz hierzu konnte durch Buonocore et al. 1995 bereits Jahre zuvor eine Beeinflussung der Zytokinexpression durch den Geburtsmechanismus aufgezeigt werden. Auch hier hat es sich um Blutproben aus der Nabelschnur gehandelt, in welchen die Plasmaspiegel von IL-1, -6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und GM-CSF unter verschiedenen Geburtsmechanismen (SVD, elektive CS) betrachtet wurden. Die SVD hatte höhere Plasmaspiegel von IL-1- $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  sowie höhere ( $O_2$ -)Level im Nabelschnurblut zur Folge. Darüber hinaus hat sich auch ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den IL-6-Spiegeln im Plasma und der  $O_2$ -Freisetzung im Nabelschnurblut von Neonaten, welche vaginal entbunden wurden, präsentiert. [19]

Ähnlich zu diesen Erkenntnissen hat sich auch in unserer Auswertung ein statistisch signifikanter Unterschied bei verschiedenen Zytokinen gezeigt. Sowohl das antiinflammatorische IL-10 ( $p = 0,049$ ) als auch MCP-1 ( $p = 0,037$ ) lagen nach SVD in erhöhten Konzentrationen vor. Bei den übrigen Zytokinen stellte sich  $p > 0,05$  dar und somit musste die Nullhypothese beibehalten werden. Allerdings hat es sich in unserem Fall ebenfalls um eher kleine Kollektive mit  $n = 22$  in der SVD-Gruppe und  $n = 47$  in der CS-Gruppe gehandelt, sodass

weitere Untersuchungen mit höheren Probandenzahlen notwendig wären, um die Nachvollziehbarkeit der Ergebnisse einschätzen und diese auf eine Reproduzierbarkeit prüfen zu können.

Diesen Erkenntnissen zufolge ist fraglich, ob der Geburtsmodus mitverantwortlich für die signifikant erhöhten Konzentrationen von IL-10 in unseren Messungen gewesen sein kann. Insbesondere da in der PROM-Gruppe der Anteil vaginaler Entbindungen mit 60% deutlich über dem der Kontrollgruppe mit lediglich 35% lag. Allerdings ergab sich bei Auswertung innerhalb der PROM-Gruppe kein statistisch signifikanter Unterschied der Messwerte bei Vergleich der beiden Geburtsmodi.

Im Rahmen der Untersuchungen von Blanco-Quirós et al. 2000 konnte in Übereinstimmung mit Tutdibi et al. 2012 ebenfalls kein Unterschied der ermittelten Zytokinkonzentrationen, insbesondere von IL-10, in Bezug auf die Geburtsmodi festgestellt werden, sodass eine derartige Beeinflussung unserer Ergebnisse fraglich ist, jedoch in weiteren Studien überprüft werden sollte. [12]

## 6. Interpretation und Ausblick

Das Thema Frühgeburtlichkeit sowie die ursächlichen Pathologien sind bereits im Rahmen einer Vielzahl von Studien hinsichtlich verschiedener Präventionsmöglichkeiten beleuchtet worden. Insbesondere der PROM, jedoch auch die PROM-auslösenden Vorgänge nehmen hierbei eine zentrale Rolle ein. In der Arbeit von Kumar et al. 2015 konnte beispielsweise eine mögliche medikamentöse Beeinflussung dieser Vorgänge aufgezeigt werden. Eine solche Erkenntnis ist essentiell und kann einen Ansatz zur Intervention und somit ggf. sogar zur Senkung der Frühgeburtenrate bieten. [56]

Auch wenn solche Ansatzpunkte bereits erarbeitet wurden, werden der PROM und die häufig damit einhergehende PTB dennoch ein relevantes Thema bleiben. Umso wichtiger ist es, die Neonatalperiode und die in dieser Zeit häufig auftretenden Komplikationen durch Erkenntnisse der biochemischen Vorgänge besser zu verstehen, um die Vulnerabilität und Morbidität der Neonaten senken zu können. Von besonderem Interesse sind demnach Untersuchungen des Nabelschnurblutes, welches die fetale Immunantwort zu repräsentieren vermag, einerseits zur Erforschung der immunologischen Vorgänge, andererseits jedoch auch als Quelle für Regenerationsforschung.

So beschäftigt sich die Arbeit von Romanov et al. 2019 mit dem Wert von Nabelschnurblut in der Reproduktionsmedizin. Mithilfe von Multiplex-Analysen konnte ein signifikanter Unterschied der Konzentrationen verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren im peripheren Blut Erwachsener verglichen mit Nabelschnurblut detektiert werden. Da hierunter auch durchaus Moleküle mit entzündungshemmenden, proangiogenetischen sowie antiapoptischen Eigenschaften fallen, ist das Nabelschnurblut als Ausgangsquelle für die regenerative Medizin durchaus von Bedeutung. [90]

In den letzten Jahren ist fetales Nabelschnurblut auch im Hinblick auf das neonatale Outcome zunehmend in den Fokus gerückt. [59] In der allgemeinen Patientenversorgung und somit auch im Bereich der Neonatologie, soll die präventive Medizin mehr und mehr vorangetrieben und etabliert werden. Hierfür sind prädiktive und prognostische Parameter unabdingbar.

Die Identifikation prognostischer Faktoren hat unter anderem auch als Motivation für die Untersuchungen des Zytokinprofils an unserem Kollektiv gedient.

Da sich hierbei keine hohen IL-6 und IL-8-Spiegel gezeigt haben, ist davon auszugehen, dass bei hohem GM-CSF und MCP-3 zwar eine mikrobielle Invasion stattgefunden hat, jedoch bei in der PROM-Gruppe deutlich geringerer Intensivpflichtigkeit keine starke systemische Entzündungsreaktion/Sepsis im weiteren Verlauf aufgetreten ist. Inflammatorisch getriggerte Pathologien und Komplikationen anderer Art sind im späteren Verlauf allerdings nicht gänzlich

auszuschließen, weshalb eine mehrzeitige Bestimmung der Entzündungsparameter sowie eine weitere Erfassung des klinischen Verlaufes von großem Interesse gewesen wäre.

Insgesamt ist anhand bereits publizierter Erkenntnisse und den Ergebnissen unserer Messungen ein kombiniertes Biomarker-Modell aus verschiedenen Zytokinen, wie beispielsweise IL6, IL-8, IL-10, G-CSF, GM-CSF, MCP-1 und MCP-3 als prädiktiver Faktor für entzündliche Folgen bzw. insbesondere für prä-, peri- und postnatale Infektionen sowie für das neonatale Outcome in Erwägung zu ziehen. [59] Die beiden Zytokine IL-6 und IL-8 wären demnach als Parameter für eine systemische Entzündungsreaktion und deren Ausprägung zu werten. IL-10 als antiinflammatorisches Zytokin könnte sowohl protektiv eine überschießende Entzündungsreaktion eindämmen, jedoch auch die Ausbreitung einer Infektion begünstigen und wäre somit nur in Kombination mit den anderen Zytokinen sowie der Klinik zu interpretieren. Sowohl hohe Spiegel an GM-CSF als auch MCP-3 würden sich eignen, um eine mikrobielle Invasion zu demarkieren.

Anhand unserer Ergebnisse sowie den Ergebnissen von Leal et al. 2019 ließe sich also Folgendes ableiten:

**Hohes GM-CSF, MCP-3:** mikrobielle Invasion wahrscheinlich

**Kombiniert hohes IL-6, IL-8 und IL-10:** schwerwiegende Entzündungsreaktion / Infektion / Sepsis

**Isoliert hohes IL-6:** frühe Sepsis

**Isoliert hohes IL-10:** voraussichtlich keine ausgeprägte Infektion, da IL-6 und IL-8 niedrig und überschießende Entzündungsreaktion durch IL-10 verhindert

Insgesamt lässt sich sagen, dass anhand unserer Ergebnisse ein niedriges IL-6 kombiniert mit einem hohen IL-10 mit einem guten Outcome bei geringer Intensivpflichtigkeit vergesellschaftet zu sein scheint.

Natürlich wäre für die Umsetzung und Etablierung eines solchen Biomarker-Modells eine langjährige Praxiserprobung erforderlich.

Zukünftig werden weitere Studien zur Erforschung der fetalen Immunantwort durch größere Patientenkollektive sowie einer zwei- bzw. mehrzeitigen Beurteilung des weiteren Verlaufes mit einer erneuten Bestimmung der Zytokine und Entzündungsparameter sowie einer Reevaluation des klinischen Zustandes benötigt, um die Nachvollziehbarkeit der Ergebnisse aufzeigen zu können. Insbesondere auch bei den Zytokinkonzentrationen von IFN- $\gamma$  und MCP-1, welche beide geringfügig oberhalb des Signifikanzniveaus von 5% lagen, könnte dieses durch eine größere Probandenzahl ggf. unterschritten und die Nullhypothese abgelehnt

werden. Auch hinsichtlich des GA's sowie der Geburtsmodi wären Studien mit größeren Kollektiven und möglichst unter Ausschaltung anderer Einflussfaktoren durchaus von Interesse, da hier durch verschiedene Forschungsgruppen differente Ergebnisse vorliegen [19,105].

Ein bedeutender Mehrwert läge zudem in der Erhebung von Studien zur Vergleichbarkeit von Fruchtwasser, fetalen Kompartimenten, mütterlichem sowie Nabelschnurblut, insbesondere hinsichtlich der Konzentrationen von Entzündungsparametern und Zytokinen, unter anderem um die Repräsentation des fetalen Systems in diesen Medien einschätzen zu können. Darüber hinaus wäre die Funktionalität eines Fruchtwasser-/Serum-Quotienten (aus Nabelschnurblut) verschiedener Zytokine zu überdenken, da ein Zusammenhang zwischen intraamniotischer Entzündung, FIRS mit entsprechenden Zytokinveränderungen und dem Auftreten von Komplikationen in der Neonatalperiode bereits vielfach belegt wurde.

Inwiefern sich die Medizin insbesondere in den Bereichen der Prävention sowie ggf. der regenerativen Medizin durch Untersuchungen des Nabelschnurblutes weiterentwickeln wird, bleibt abzuwarten, jedoch lässt sich unter anderem durch Arbeiten wie diese ein enormes Potential erahnen.

## 7. Anhang

### 7.1 Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: Verwendete Lösungen .....   | 43 |
| Tabelle 2: Verwendete Kits.....  | 43 |
| Tabelle 3: Verwendete Gerätschaften .....  | 43 |
| Tabelle 4: Häufigkeit PROM im Gesamtkollektiv (1 = PROM, 2 = Kontrolle).....               | 49 |
| Tabelle 5: Hypothesenübersicht - Mann-Whithney-U-Test.....                                 | 50 |
| Tabelle 6: Deskriptive Statistik für IL-10 bei Vergleich der beiden Gruppen.....           | 51 |
| Tabelle 7: Deskriptive Statistik für MCP-3 bei Vergleich der beiden Gruppen.....           | 52 |
| Tabelle 8: Deskriptive Statistik für GM-CSF bei Vergleich der beiden Gruppen.....          | 53 |
| Tabelle 9: Deskriptive Statistik für IL-1 $\beta$ bei Vergleich der beiden Gruppen.....    | 54 |
| Tabelle 10: Deskriptive Statistik für IFN- $\gamma$ bei Vergleich der beiden Gruppen ..... | 55 |
| Tabelle 11: Deskriptive Statistik für IL-10 bei unterschiedlichem Geburtsmodus .....       | 56 |
| Tabelle 12: Deskriptive Statistik für MCP-1 bei unterschiedlichem Geburtsmodus .....       | 58 |

### 7.2 Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1: Anteil von GBS, a - an der neonatalen Early-Onset-Sepsis, b - an der neonatalen Late-Onset-Sepsis (Berner, 2003) .....                                       | 17 |
| Abbildung 2: Stadien der intrauterinen Infektion durch Keimaszension (Baumann et al. 1996) .....  | 19 |
| Abbildung 3: Erregerspektrum Early- / Late-Onset-Sepsis (Duale Reihe Pädiatrie. Gortner L, Meyer S, 5. vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2018.) ..... | 20 |
| Abbildung 4: Einteilung Zytokine (Duale Reihe Biochemie) .....  | 23 |
| Abbildung 5: Maternale und fetale Auswirkungen bei intrauterinen Infektionen (Reimer et al. 2000) .....   | 32 |
| Abbildung 6: Immunologische Vorgänge bei vorzeitiger Wehentätigkeit (Springer Verlag 2010; Egarter, Friese) .....   | 33 |
| Abbildung 7: Altersgruppenverteilung Mütter .....   | 38 |
| Abbildung 8: Anzahl Probanden nach Geburtsmodus .....   | 38 |
| Abbildung 9: Anzahl Probanden nach Gestationsalter (PROM-Gruppe) .....  | 39 |
| Abbildung 10: Anzahl Probanden nach Gestationsalter (Kontrollgruppe) .....  | 39 |
| Abbildung 11: Auffälligkeiten in der Schwangerschaft (PROM-Gruppe) .....  | 40 |

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 12: Auffälligkeiten in der Schwangerschaft (Kontrollgruppe) .....   | 40 |
| Abbildung 13: Schema Sandwich-Assay – orange = Bead, blau = Analyt, gelb =<br>Fluoreszenzfarbstoff (Radke et al. 2009/2010) ..... | 44 |
| Abbildung 14: Einteilung der Variablen (Ärzteblatt, Priestersbach et al. 2009) .....  | 46 |
| Abbildung 15: Auswahl des geeigneten Tests (Ärzteblatt, du Prel et al. 2010) .....  | 46 |
| Abbildung 16: Boxplot zum Vergleich der Messwerte von IL-10 in PROM- und<br>Kontrollgruppe .....                                  | 49 |
| Abbildung 17: Boxplot zum Vergleich der Messwerte von MCP-3 in PROM- und<br>Kontrollgruppe .....                                  | 50 |
| Abbildung 18: Boxplot zum Vergleich der Messwerte von GM-CSF in PROM- und<br>Kontrollgruppe .....                                 | 51 |
| Abbildung 19: Boxplot zum Vergleich der Messwerte von IL-1 $\beta$ in PROM- und<br>Kontrollgruppe .....                           | 52 |
| Abbildung 20: Boxplot zum Vergleich der Konzentrationen von IL-10 bei<br>unterschiedlichem Geburtsmodus .....                     | 55 |
| Abbildung 21: Boxplot zum Vergleich der Messwerte von MCP-1 bei<br>unterschiedlichem Geburtsmodus .....                           | 56 |

## 8. Literaturverzeichnis

1. Aaltonen R, Heikkinen T, Hakala K, Laine K, Alanen A (2005) Transfer of Proinflammatory Cytokines Across Term Placenta. *Obstetrics & Gynecology* 106:
2. Aly H, Khashaba MT, El-Ayouty M, El-Sayed O, Hasanein BM (2006) IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  and outcomes of neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. *Brain Dev* 28:
3. Amabebe E, Chapman DR, Stern VL, Stafford G, Anumba DOC (2018) Mid-gestational changes in cervicovaginal fluid cytokine levels in asymptomatic pregnant women are predictive markers of inflammation-associated spontaneous preterm birth. *J Reprod Immunol* 126:
4. Atègbo J-M, Grissa O, Yessoufou A, Hichami A, Dramane KL, Moutairou K, Miled A, Grissa A, Jerbi M, Tabka Z, Khan NA (2006) Modulation of Adipokines and Cytokines in Gestational Diabetes and Macrosomia. *J Clin Endocrinol Metab* 91:
5. Austgulen R, Lien E, Liabakk N-B, Jacobsen G, Arntzen KJ (1994) Increased levels of cytokines and cytokine activity modifiers in normal pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 57:149–155
6. Bailie KEM, Irvine AE, Bridges JM, McClure BG (1994) Granulocyte and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factors in Cord and Maternal Serum at Delivery. *Pediatr Res* 35:164–168
7. Balkwill FR, Burke F (1989) The cytokine network. *Immunol Today* 10:299–304
8. Baud O, Emilie D, Pelletier E, Lacaze-Masmonteil T, Zupan V, Fernandez H, Dehan M, Frydman R, Ville Y (1999) Amniotic fluid concentrations of Interleukin-1beta, Interleukin-6 and TNF-alpha in chorioamnionitis before 32 weeks of gestation: histological associations and neonatal outcome. *BJOG* 106:
9. Baumann P, Romero R (1996) Intraamniale Infektion, Zytokine und Frühgeburtlichkeit. *FOCUS MUL* 130–141
10. Ben-Baruch A, Xu L, Young PR, Bengali K, Oppenheim JJ, Wang JM (1995) Monocyte Chemotactic Protein-3 (MCP3) Interacts with Multiple Leukocyte Receptors. *Journal of Biological Chemistry* 270:
11. Berner R (2003) Infektionen durch Gruppe-B-Streptokokken in der Neonatalperiode. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 151:373–383

12. Blanco-Quirós A, Arranz E, Solis G, Villar A, Ramos A, Coto D (2000) Cord blood interleukin-10 levels are increased in preterm newborns. *Eur J Pediatr* 159:
13. Blanco-Quirós A, Arranz E, Solis G, Garrote JA, Mayo A (2004) High cord blood IL-10 levels in preterm newborns with respiratory distress syndrome. *Allergol Immunopathol (Madr)* 32:
14. Boenisch S, Fae P, Drexel H, Walli AK, Fraunberger P (2013) Spielen CRP-Spiegel neben IL-6 und PCT noch eine Rolle für Patienten auf Intensivstationen?/Are circulating levels of CRP compared to IL-6 and PCT still relevant in intensive care unit patients? *Laboratoriumsmedizin* 37:
15. Breckwoldt M, Kaufmann M, Pfeleiderer A (2008) *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 5. Auflage edition. Georg Thieme Verlag KG
16. Brown N, Alvi S, Elder M, Bennett P, Sullivan M (1998) Regulation of prostaglandin production in intact fetal membranes by interleukin-1 and its receptor antagonist. *Journal of Endocrinology* 159:519–526
17. Brown NL, Alvi SA, Elder MG, Bennett PR, Sullivan MHF (2000) The regulation of prostaglandin output from term intact fetal membranes by anti-inflammatory cytokines. *Immunology* 99:124–133
18. Buck C, Bundschu J, Gallati H, Bartmann P, Pohlandt F (1994) Interleukin-6: a sensitive parameter for the early diagnosis of neonatal bacterial infection. *Pediatrics* 93:54–58
19. Buonocore G, De Filippo M, Gioia D, Picciolini E, Luzzi E, Bocci V, Bracci R (1995) Maternal and Neonatal Plasma Cytokine Levels in Relation to Mode of Delivery. *Neonatology* 68:104–110
20. Cayabyab RG, Jones CA, Kwong KYC, Hendershott C, Lecart C, Minoo P, Ramanathan R (2003) Interleukin-1 $\beta$  in the bronchoalveolar lavage fluid of premature neonates: a marker for maternal chorioamnionitis and predictor of adverse neonatal outcome. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 14:
21. Chow SSW, Craig ME, Jones CA, Hall B, Catteau J, Lloyd AR, Rawlinson WD (2008) Differences in amniotic fluid and maternal serum cytokine levels in early midtrimester women without evidence of infection. *Cytokine* 44:78–84
22. Cobo T, Kacerovsky M, Andrys C, Drahosova M, Musilova I, Hornychova H, Jacobsson B (2013) Umbilical Cord Blood IL-6 as Predictor of Early-Onset Neonatal Sepsis in Women with Preterm Prelabour Rupture of Membranes. *PLoS One* 8:

23. Cook AD, Braine EL, Campbell IK, Rich MJ, Hamilton JA (2001) Blockade of collagen-induced arthritis post-onset by antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): requirement for GM-CSF in the effector phase of disease. *Arthritis Res* 3:
24. Dammann O, Leviton A (1997) Maternal Intrauterine Infection, Cytokines, and Brain Damage in the Preterm Newborn. *Pediatr Res* 42:1–8
25. Dayer J-M, Oliviero F, Punzi L (2017) A Brief History of IL-1 and IL-1 Ra in Rheumatology. *Front Pharmacol* 8:
26. Dinarello CA, van der Meer JWM (2013) Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Semin Immunol* 25:
27. du Prel J-B, Röhrig B, Hommel G, Blettner M (2010) Auswahl statistischer Testverfahren. *Deutsches Ärzteblatt* 343–348
28. Egarter C, Friese K (2000) Immunological diagnostics in cases of preterm labor. *Gynakologe* 33:351–355
29. El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, Zhang G-X, Dittel BN, Rostami A (2011) The encephalitogenicity of TH17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol* 12:
30. Endres S, Gröttrup E (1992) Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist. *Dtsch Arztebl*
31. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A (1991) IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 147:3815–22
32. Gasson J (1991) Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 77:
33. Gomes CP, Torloni MR, Gueuvoghlian-Silva BY, Alexandre SM, Mattar R, Daher S (2013) Cytokine Levels in Gestational Diabetes Mellitus: a Systematic Review of the Literature. *American Journal of Reproductive Immunology*
34. Gomes TS, Lindner U, Tennekoon KH, Karandagoda W, Gortner L, Obeid R (2010) Homocysteine in small-for-gestational age and appropriate-for-gestational age preterm neonates from mothers receiving folic acid supplementation. *cclm* 48:1157–1161
35. Gortner L, Meyer S (2018) *Duale Reihe Pädiatrie*. 5. Auflage edition. Georg Thieme Verlag KG

36. GOTSCH F, ROMERO R, KUSANOVIC JP, MAZAKI-TOVI S, PINELES BL, EREZ O, ESPINOZA J, HASSAN SS (2007) The Fetal Inflammatory Response Syndrome. *Clin Obstet Gynecol* 50:652–683
37. Granger JP, Alexander BT, Bennett WA, Khalil RA (2001) Pathophysiology of pregnancy-induced hypertension. *Am J Hypertens* 14:178–185
38. Hallman M (1999) Cytokines, Pulmonary Surfactant and Consequences of Intrauterine Infection. *Biol Neonate* 76:2–9
39. Hamilton JA (1993) Rheumatoid arthritis: opposing actions of haemopoietic growth factors and slow-acting anti-rheumatic drugs. *The Lancet* 342:
40. Hamilton JA, Achuthan A (2013) Colony stimulating factors and myeloid cell biology in health and disease. *Trends Immunol* 34:
41. Hashimoto S, Komuro I, Yamada M, Akagawa KS (2001) IL-10 Inhibits Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Dependent Human Monocyte Survival at the Early Stage of the Culture and Inhibits the Generation of Macrophages. *The Journal of Immunology* 167:3619–3625
42. Heinrich, Müller, Graeve (2014) Löffler/ Petrides *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag
43. Heng YJ, Liong S, Permezel M, Rice GE, Quinzio MKW Di, Georgiou HM (2014) The Interplay of the Interleukin 1 System in Pregnancy and Labor. *Reproductive Sciences* 21:
44. Herrmann M (2017) Rheumatoide Arthritis: IL-6-Rezeptor-Inhibitor zugelassen. *Dtsch Arztebl* 114:
45. Holst R-M, Laurini R, Jacobsson B, Samuelsson E, Sävman K, Doverhag C, Wennerholm U-B, Hagberg H (2007) Expression of cytokines and chemokines in cervical and amniotic fluid: Relationship to histological chorioamnionitis. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 20:885–893
46. Hummel M (2014) Diabetes und Schwangerschaft: Was alles zu beachten ist. *Dtsch Arztebl* 12:
47. Jacobsson B, Holst R, Andersson B, Hagberg H (2005) Monocyte chemotactic protein-2 and -3 in amniotic fluid: relationship to microbial invasion of the amniotic cavity, intra-amniotic inflammation and preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 84:566–571

48. Jansen JH, Wientjens GJ, Fibbe WE, Willemze R, Kluin-Nelemans HC (1989) Inhibition of human macrophage colony formation by interleukin 4. *Journal of Experimental Medicine* 170:
49. Jesus AA, Goldbach-Mansky R (2014) IL-1 Blockade in Autoinflammatory Syndromes. *Annu Rev Med* 65:
50. Jia T, Serbina N V., Brandl K, Zhong MX, Leiner IM, Charo IF, Pamer EG (2008) Additive Roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-Mediated Recruitment of Inflammatory Monocytes during *Listeria monocytogenes* Infection. *The Journal of Immunology* 180:6846–6853
51. Jung E, Romero R, Yeo L, Diaz-Primera R, Marin-Concha J, Para R, Lopez AM, Pacora P, Gomez-Lopez N, Yoon BH, Kim CJ, Berry SM, Hsu C-D (2020) The fetal inflammatory response syndrome: the origins of a concept, pathophysiology, diagnosis, and obstetrical implications. *Semin Fetal Neonatal Med* 25:101146
52. Kacerovsky M, Cobo T, Andrys C, Musilova I, Drahosova M, Hornychova H, Janku P, Jacobsson B (2013) The fetal inflammatory response in subgroups of women with preterm prelabor rupture of the membranes. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 26:
53. Kiechle M (2007) *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Urban & Fischer Verlag
54. King GL (2008) The Role of Inflammatory Cytokines in Diabetes and Its Complications. *J Periodontol* 79:
55. Koletzko (2013) *Kinder- und Jugendmedizin*. Springer-Verlag
56. Kumar D, Springel E, Moore RM, Mercer BM, Philipson E, Mansour JM, Mesiano S, Schatz F, Lockwood CJ, Moore JJ (2015) Progesterone inhibits in vitro fetal membrane weakening. *Am J Obstet Gynecol* 213:520.e1-520.e9
57. Kurt ANC, Aygun AD, Godekmerdan A, Kurt A, Dogan Y, Yilmaz E (2007) Serum IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$  Levels in Early Diagnosis and Management of Neonatal Sepsis. *Mediators Inflamm* 2007:
58. Le Bouar G, Lassel L, Poulain P (2002) Markers of infection and inflammation in the amniotic fluid: therapeutic contribution of amniocentesis. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 52–56

59. Leal YA, Álvarez-Nemegyei J, Lavadores-May AI, Girón-Carrillo JL, Cedillo-Rivera R, Velazquez JR (2019) Cytokine profile as diagnostic and prognostic factor in neonatal sepsis. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 32:2830–2836
60. Leng J, Denkers EY (2009) *Toxoplasma gondii* Inhibits Covalent Modification of Histone H3 at the IL-10 Promoter in Infected Macrophages. *PLoS One* 4:
61. Leslie V. Simon, Muhammad F. Hashmi, Bradley N. Bragg (2023) APGAR Score.
62. Li Y, Wang Y, Ding X, Duan B, Li L, Wang X (2016) Serum Levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 Are Associated With Pregnancy-Induced Hypertension. *Reproductive Sciences* 23:1402–1408
63. Lindner U, Tutdibi E, Binot S, Monz D, Hilgendorff A, Gortner L (2013) Levels of Cytokines in Umbilical Cord Blood in Small for Gestational Age Preterm Infants. *Klin Padiatr* 225:
64. Lukens JR, Barr MJ, Chaplin DD, Chi H, Kanneganti T-D (2012) Inflammasome-Derived IL-1 $\beta$  Regulates the Production of GM-CSF by CD4<sup>+</sup> T Cells and  $\gamma\delta$  T Cells. *The Journal of Immunology* 188:
65. Martinez FO, Gordon S (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 6:
66. McQualter JL, Darwiche R, Ewing C, Onuki M, Kay TW, Hamilton JA, Reid HH, Bernard CCA (2001) Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Journal of Experimental Medicine* 194:
67. Mirzarahimi M, Barak M, Eslami A, Enteshari-Moghaddam A (2017) The role of interleukin-6 in the early diagnosis of sepsis in premature infants. *Pediatr Rep* 9:
68. Mobini M, Mortazavi M, Nadi S, Zare-Bidaki M, Pourtalebi S, Arababadi MK (2016) Significant roles played by interleukin-10 in outcome of pregnancy. *Iran J Basic Med Sci* 19:119–24
69. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19:
70. Mosser DM, Zhang X (2008) Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* 226:
71. Musilova I, Andrys C, Drahosova M, Soucek O, Stepan M, Bestvina T, Spacek R, Jacobsson B, Cobo T, Kacerovsky M (2017) Intraamniotic inflammation and umbilical

- cord blood interleukin-6 concentrations in pregnancies complicated by preterm prelabor rupture of membranes. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 30:
72. Musilova I, Andrys C, Drahosova M, Zednikova B, Hornychova H, Pliskova L, Zemlickova H, Jacobsson B, Kacerovsky M (2018) Late preterm prelabor rupture of fetal membranes: fetal inflammatory response and neonatal outcome. *Pediatr Res* 83:630–637
  73. Nadeau-Vallée M, Obari D, Quiniou C, Lubell WD, Olson DM, Girard S, Chemtob S (2016) A critical role of interleukin-1 in preterm labor. *Cytokine Growth Factor Rev* 28:
  74. Niehues T (2013) The Febrile Child. *Deutsches Aerzteblatt Online*
  75. Nold C, Esteves K, Jensen T, Vella AT (2021) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor initiates amniotic membrane rupture and preterm birth in a mouse model. *American Journal of Reproductive Immunology* 86:
  76. O'Garra A, Barrat FJ, Castro AG, Vicari A, Hawrylowicz C (2008) Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunol Rev* 223:
  77. Oh C, Dong Y, Liu H, Thompson LP (2008) Intrauterine hypoxia upregulates proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in fetal guinea pig hearts. *Am J Obstet Gynecol* 199:78.e1-78.e6
  78. Othieno C, Hirsch CS, Hamilton BD, Wilkinson K, Ellner JJ, Toossi Z (1999) Interaction of Mycobacterium tuberculosis-Induced Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 and Interleukin-10. *Infect Immun* 67:
  79. Otsubo Y, Hashimoto K, Kanbe T, Sumi M, Moriuchi H (2017) Association of cord blood chemokines and other biomarkers with neonatal complications following intrauterine inflammation. *PLoS One* 12:e0175082
  80. Ozawa H, Aiba S, Nakagawa S, Tagami H (1996) Interferon- $\gamma$  and interleukin-10 inhibit antigen presentation by Langerhans cells for T helper type 1 cells by suppressing their CD80 (B7-1) expression. *Eur J Immunol* 26:
  81. Pandey M, Chauhan M, Awasthi S (2017) Interplay of cytokines in preterm birth. *Indian Journal of Medical Research* 146:316–327
  82. Parajuli B, Sonobe Y, Kawanokuchi J, Doi Y, Noda M, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A (2012) GM-CSF increases LPS-induced production of proinflammatory mediators via upregulation of TLR4 and CD14 in murine microglia. *J Neuroinflammation* 9:

83. Pierce BT, Pierce LM, Wagner RK, Apodaca CC, Hume , Roderick F., Nielsen PE, Calhoun BC (2000) Hypoperfusion causes increased production of interleukin 6 and tumor necrosis factor  $\alpha$  in the isolated, dually perfused placental cotyledon. *Am J Obstet Gynecol* 183:863–867
84. Ponomarev ED, Shriver LP, Maresz K, Pedras-Vasconcelos J, Verthelyi D, Dittel BN (2007) GM-CSF Production by Autoreactive T Cells Is Required for the Activation of Microglial Cells and the Onset of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* 178:
85. Qiu X, Zhang L, Tong Y, Qu Y, Wang H, Mu D (2018) Interleukin-6 for early diagnosis of neonatal sepsis with premature rupture of the membranes. *Medicine* 97:
86. Quackenbush EJ, Wershil BK, Gutierrez-Ramos J-C (2000) Modulation of Mast Cell Development from Embryonic Haematopoietic Progenitors by Eotaxin. Elsevier
87. Radke L, López-Hemmerling D, Lubitz A, Giese C, Wildenauer F-X, Frohme M (2010) Etablierung verschiedener Bead-basierter Multiplexmethoden mit einem Suspensions Array-System für molekular diagnostische Zwecke. *Wissenschaftliche Beiträge / Technische Hochschule Wildau*
88. Reimer T, Friese K (2000) Aktuelle Erkenntnisse zur Bedeutung der Zytokine bei der Wehenentstehung - Current Findings to the Meaning of Cytokines for Induction of Labour -. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 60:182–186
89. Romagnoli C, Frezza S, Cingolani A, De Luca A, Puopolo M, De Carolis MP, Vento G, Antinori A, Tortorolo G (2001) Plasma levels of interleukin-6 and interleukin-10 in preterm neonates evaluated for sepsis. *Eur J Pediatr* 160:345–350
90. Romanov YuA, Vtorushina V V., Dugina TN, Romanov AYu, Petrova N V. (2019) Human Umbilical Cord Blood Serum/Plasma: Cytokine Profile and Prospective Application in Regenerative Medicine. *Bull Exp Biol Med* 168:173–177
91. Romero R, Tartakovsky B (1992) The natural interleukin-1 receptor antagonist prevents interleukin-1-induced preterm delivery in mice. *Am J Obstet Gynecol* 167:
92. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginat J (2010) Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev* 21:
93. Sagawa K, Mochizuki M, Sugita S, Nagai K, Sudo T, Itoh K (1996) SUPPRESSION BY IL-10 AND IL-4 OF CYTOKINE PRODUCTION INDUCED BY TWO-WAY AUTOLOGOUS MIXED LYMPHOCYTE REACTION. *Cytokine* 8:

94. Schleußner E (2013) The Prevention, Diagnosis and Treatment of Premature Labor. Deutsches Aerzteblatt Online
95. Sharma A, Kumar D, Moore RM, Deshmukh A, Mercer BM, Mansour JM, Moore JJ (2020) Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), the critical intermediate of inflammation-induced fetal membrane weakening, primarily exerts its weakening effect on the choriodecidua rather than the amnion. *Placenta* 89:1–7
96. Sheridan JW, Metcalf D (1972) Studies on the bone marrow colony stimulating factor (CSF): Relation of tissue CSF to serum CSF. *J Cell Physiol* 80:
97. Simonsen KA, Anderson-Berry AL, Delair SF, Davies HD (2014) Early-Onset Neonatal Sepsis. *Clin Microbiol Rev* 27:
98. Speer, Gahr (2009) Pädiatrie. 3. Auflage edition. Springer-Verlag
99. Spriestersbach A, Röhrig B, du Prel J-B, Gerhold-Ay A, Blettner M (2009) Deskriptive Statistik. *Dtsch Arztebl* 578–583
100. Stauber M, Weyerstahl T (2007) Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe. 3. Auflage edition. Georg Thieme Verlag KG
101. Subramanian Iyer S, Cheng G (2012) Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Crit Rev Immunol* 23–63
102. Takahashi GW, Andrews DF, Lilly MB, Singer JW, Alderson MR (1993) Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on interleukin-8 production by human neutrophils and monocytes. *Blood* 81:357–64
103. Takeuchi T, Tanaka Y, Close D, Godwood A, Wu C-Y, Saurigny D (2015) Efficacy and safety of mavrilimumab in Japanese subjects with rheumatoid arthritis: Findings from a Phase IIa study. *Mod Rheumatol* 25:
104. Thomassen MJ, Raychaudhuri B, Bonfield TL, Malur A, Abraham S, Barna BP, Kavuru MS (2003) Elevated IL-10 Inhibits GM-CSF Synthesis in Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Autoimmunity* 36:285–290
105. Tutdibi E, Hunecke A, Lindner U, Monz D, Gortner L (2012) Levels of cytokines in umbilical cord blood in relation to spontaneous term labor. *J Perinat Med* 40:527–532
106. Ushach I, Zlotnik A (2016) Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *J Leukoc Biol* 100:

107. WEEKS J, REYNOLDS L, TAYLOR D, LEWIS J, WAN T, GALL S (1997) Umbilical cord blood interleukin-6 levels and neonatal morbidity. *Obstetrics & Gynecology* 90:815–818
108. Weissenbacher T, Laubender RP, Witkin SS, Gingelmaier A, Schiessl B, Kainer F, Friese K, Jeschke U, Dian D, Karl K (2012) Influence of maternal age, gestational age and fetal gender on expression of immune mediators in amniotic fluid. *BMC Res Notes* 5:375
109. Williamson DJ, Begley CG, Vadas MA, Metcalf D (1988) The detection and initial characterization of colony-stimulating factors in synovial fluid. *Clin Exp Immunol* 67–73
110. Winkler M, Rath W (1996) The role of cytokines in the induction of labor, cervical ripening and rupture of the fetal membranes. *Z Geburtshilfe Neonatol* 1–12
111. Witter AR, Okunnu BM, Berg RE (2016) The Essential Role of Neutrophils during Infection with the Intracellular Bacterial Pathogen *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Immunology* 197:1557–1565
112. Xiao J, Li J, Cai L, Chakrabarti S, Li X (2014) Cytokines and Diabetes Research. *J Diabetes Res* 2014:
113. Yin C, Tian Y, Zheng Y (1998) Study on relationship between detection of interleukin-6 and its mRNA and pregnancy induced hypertension. *Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology* 711–714
114. Zaretsky M V., Alexander JM, Byrd W, Bawdon RE (2004) Transfer of Inflammatory Cytokines Across the Placenta. *Obstetrics & Gynecology* 103:546–550
115. Zucali JR, Dinarello CA, Oblon DJ, Gross MA, Anderson L, Weiner RS (1986) Interleukin 1 stimulates fibroblasts to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating activity and prostaglandin E2. *Journal of Clinical Investigation* 77:
116. (2013) *Eosinophil Trafficking*. Elsevier

## 9. Danksagung

Meinen herzlichsten Dank möchte ich an folgende Adressanten entrichten, die in ganz unterschiedlicher Weise zur Begründung sowie Vollendung dieser Arbeit beigetragen haben:

**Prof. Dr. med. Michael Zemlin** – meinem Doktorvater, für die umfassende Unterstützung zur Bearbeitung dieser Fragestellung in seiner Abteilung, die allzeit uneingeschränkten Möglichkeiten in der Frage nach Rat und Kritik sowie das Vertrauen in mich, die Arbeit doch noch zu einem Abschluss bringen zu können.

**Dr. med. Thushari Gomes** – meiner Betreuerin, für die großzügige Überlassung des Themas sowie der mühevoll erhobenen Daten und die Betreuung dieser Arbeit inklusive aller Höhen und Tiefen.

**Roger und Marion Schreiber** – meinen Eltern, die immer für mich da sind und wirklich alles (Zeit, Energie, Nerven sowie etliche Nahrungsvorräte) gegeben haben, um mir die bestmögliche Unterstützung bieten zu können, wenngleich dies ganz gewiss nicht immer leicht war.

**Florian Himmighöfer** – mein Partner, der immer an mich geglaubt und mich stets wieder aufgebaut hat, selbst wenn für mich alle Hoffnung verloren schien. Außerdem mein bester Freund, der mir nicht nur eine Schulter zum Anlehnen geboten, sondern auch, wenn immer möglich, den Rücken freigehalten hat und ohne dessen Excel-Kenntnisse ich definitiv verzweifelt wäre.

**Jarno Emil Schreiber** – Sohn und größtes Glück dieser Erde, der mich zwar häufig erfolgreich davon abgehalten hat mit Konzentration bei der Sache zu sein, welcher aber für mich mit die größte Motivation war, die Ziellinie doch noch zu überschreiten.

**Freunden und Familie** – die immer wieder quälend nachgefragt, ermutigend zugesprochen und hier und da auf ganz unterschiedlichem Wege, für den nötigen Ansporn zur Vollendung dieser Arbeit gesorgt haben.

**Probandinnen aus Sri Lanka** – ohne deren großzügige Spende und selbstlose Einwilligung zur Teilnahme diese Daten nie hätten erhoben werden können.

**Labor der Frauen- und Kinderklinik des UKS** – welche vielleicht „im Untergrund“ agiert, jedoch einen ganz entscheidenden Beitrag zur Entwicklung der Fragestellung geleistet haben und für deren Hilfe ich überaus dankbar bin.

**Biometrie und Epidemiologie des UKS** – für die mehrfache Beratung, die Möglichkeit zur immer wiederkehrenden Konsultation sowie die Geduld und Mühe jegliche Probleme zu analysieren und zu beheben.

**Dr. med. Sonja Meyer und Frau Schien** – welche bereitwillig ihre Zeit und Energie geopfert haben, um meinen grammatikalischen Verfehlungen auf die Schliche zu kommen.

## **10. Curriculum vitae**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

