

Aus dem Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. U. Pohl

**Ontogenese der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten bei
humanen Neonaten in Abhängigkeit vom Gestationsalter**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Anna Gloning

aus

Freising

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Markus Sperandio

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Andreas Schulze
Prof. Dr. Thomas Lang

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. Claudia Nußbaum

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2013

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I	EINLEITUNG..... 1
1	Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten 2
1.1	Einfangen (Capture)..... 3
1.2	Rollen..... 3
1.2.1	Aufbau der Selektine 3
1.2.2	Funktion der Selektine 4
1.2.3	Selektinliganden 5
1.3	Feste Adhäsion..... 6
1.3.1	Einfluss von Chemokinen auf die Adhäsion 6
1.3.2	Aufbau der Integrine 7
1.3.3	Funktion der Integrine 8
1.3.4	Integrinliganden 8
1.4	Crawling und Transmigration..... 9
2	PMN-Rekrutierung bei Neonaten 10
2.1	Reife Neugeborene 10
2.2	Frühgeborene 11
3	Hypothese und Zielsetzung..... 12
II	MATERIAL UND METHODIK..... 13
1	Patienten 13
2	Versuchsablauf 14
3	Probenentnahme 14
4	PMN-Isolierung 15
5	Flusskammerversuche..... 17
5.1	Vorbereitung der Flusskammern 18
5.1.1	Beschichten der Kapillaren..... 18
5.1.2	Verkleben und Blocken der Kapillaren 19
5.2	Vorbereitung der PMN 20
5.3	Mikroskopischer Arbeitsplatz..... 21
5.4	Perfusion der Flusskammern 22
5.5	Messmethoden und Messparameter..... 22
5.5.1	Rollen..... 22
5.5.2	Rollgeschwindigkeit 23

5.5.3	Adhäsion	23
5.6	Einfluss von Betamethason auf die PMN-Rekrutierung	23
6	Durchflusszytometrie.....	24
6.1	FACS-Antikörper	24
6.2	Vorbereitung der Proben.....	24
6.3	Messmethoden und Messparameter.....	25
7	Statistische Auswertung.....	25
III	ERGEBNISSE.....	26
1	Patienten	26
1.1	Klinische Daten	26
1.2	Labordaten	26
2	PMN-Isolierung	28
3	PMN-Rollen und -Adhäsion in der Flusskammer	28
3.1	Rollen fetaler PMN.....	28
3.2	Mittlere Rollgeschwindigkeiten.....	30
3.3	Adhäsion fetaler PMN	30
3.4	Korrelation Adhärenz – Gestationsalter	32
3.5	Kontroll-Flusskammern.....	33
4	Betamethason.....	34
5	Ergebnisse der Durchflusszytometrie	35
IV	DISKUSSION.....	37
1	Diskussion der Methodik.....	37
1.1	PMN-Isolierung mit Ficoll	37
1.2	Flusskammermodell.....	38
1.3	Offline Videobildanalyse.....	39
2	Diskussion der Ergebnisse.....	40
2.1	Klinische Daten und Laborwerte	40
2.2	PMN-Rekrutierung bei Neonaten in Abhängigkeit vom Gestationsalter	42
2.3	Expression von Adhäsionsmolekülen auf neonatalen PMN.....	44
2.4	Beeinflussung der Ergebnisse durch externe Faktoren.....	46
3	Klinische Bedeutung und Ausblick	47
V	ZUSAMMENFASSUNG.....	51
VI	LITERATURVERZEICHNIS.....	53

VII	ANHANG.....	65
1	Veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit	65
2	Danksagung	67

Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CRP	C-reaktives Protein
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
FG	Frühgeborene
fMLP	N-Formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin
FOV	Field Of View
GA	Gestationsalter
G-CSF, GM-CSF	Granulozyten-(Makrophagen)-Kolonie stimulierender-Faktor
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IL-1, IL-6, IL-8	Interleukin-1, -6, -8
LAD-I, II, III	Leukozytenadhäsionsdefizienz-I, -II, -III
LFA-1	Lymphocyte-function-associated antigen-1
LPS	Lipopolysaccharid
Mac-1	Makrophagen-Antigen-1
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NG	Neugeborene
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NS-	Nabelschnur-
NSB	Nabelschnurblut
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PMN	Polymorphonukleäre Leukozyten
PSGL-1	P-selectin-glycoprotein-ligand-1
RAGE	Receptor for Advanced Glycation Endproducts
rhP- bzw. E-Selektin	Rekombinantes humanes P- bzw. E-Selektin
RG	Reife Neugeborene
SCR	Short Consensus Repeats
sLe ^x	Sialyl Lewis X
SSW	Schwangerschaftswochen
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha

I EINLEITUNG

Neugeborene und insbesondere Frühgeborene sind anfälliger für Infektionen als Kinder und Erwachsene. Trotz des frühen Einsatzes von Antibiotika und der Fortschritte in der Neugeborenen-Intensivpflege tragen bakterielle Infektionen weiterhin wesentlich zur neonatalen Morbidität und Mortalität bei. So sterben Schätzungen zufolge weltweit jährlich über eine Million Neugeborene an schweren Infektionen (Lawn *et al.*, 2006). Die Inzidenz der neonatalen Sepsis korreliert dabei invers mit dem Gestationsalter und beträgt in Bayern bei den Frühgeborenen < 25+0 Schwangerschaftswochen (SSW) bis zu 50% (Genzel-Boroviczeny *et al.*, 2006; Fanaroff *et al.*, 2007; Bayerische Arbeitsgemeinschaft für Qualitätssicherung in der stationären Versorgung, 2010). Vergleichbare Zahlen wurden auch für andere Industriestaaten (z.B. USA) veröffentlicht (Stoll & Hansen, 2003).

Die hohe Inzidenz von Infektionen bei Frühgeborenen lässt sich einerseits durch externe Faktoren erklären: invasive Eingriffe (wie z.B. Intubation, Gefäßzugänge) und die verminderte Barrierefunktion der neonatalen Haut stellen potentielle Eintrittspforten für Erreger dar. Die frühzeitliche Geburt kann außerdem durch eine intrauterine Infektion verursacht worden sein. Auf der anderen Seite treffen eingedrungene Erreger auf ein unreifes Immunsystem, das die Erreger nicht adäquat bekämpfen kann. Dabei wurde bei Neugeborenen sowohl eine Unreife der humoralen als auch der zellulären Immunantwort beschrieben (Levy, 2007).

Bei der angeborenen, unspezifischen Immunabwehr und insbesondere bei der Abwehr bakterieller Pathogene spielen die neutrophilen Granulozyten (= polymorphonukleäre Leukozyten, PMN) eine entscheidende Rolle. Sie werden ab der 14. Schwangerschaftswoche im Knochenmark aus hämatopoetischen Vorläuferzellen gebildet und gelangen als reife Neutrophile in die Blutzirkulation, von wo aus sie rasch auf inflammatorische Signale reagieren können (Maheshwari A. & Christensen R.D., 2005). Im Rahmen einer Infektion führt die Aktivierung dieser Zellen durch körpereigene oder Erreger-spezifische Substanzen zu ihrer Rekrutierung aus der Blutbahn in das betroffene Gewebe. Nach der Auswanderung beginnen die PMN mit der Phagozytose der Erreger. Durch die Verschmelzung der Phagosomen mit intrazellulären Vesikeln, welche reaktive Sauerstoffspezies enthalten („oxidative burst“), wird schließlich die Verdauung der aufgenommenen Mikroorganismen bewirkt (Burg & Pillinger, 2001).

Bei Störungen der Rekrutierung von Leukozyten und insbesondere von neutrophilen Granulozyten aus der Blutbahn ist eine suffiziente Eliminierung der Erreger im Gewebe nicht möglich. Die besondere Bedeutung der Leukozytenrekrutierung für eine intakte Immunabwehr zeigt sich auch in den Krankheitsbildern der Leukozytenadhäsionsdefizienz I, II und III, bei denen dieser Prozess aufgrund genetischer Defekte gestört ist. Die Betroffenen leiden unter rekurrierenden Infektionen, die infolge von Komplikationen bereits im frühen Kindesalter letal enden können (Nussbaum *et al.*, 2010). Aufgrund der zentralen Rolle der Leukozytenrekrutierung im Rahmen der Erregerabwehr sind die Mechanismen, welche zur Auswanderung von PMN aus der Gefäßbahn führen, in den letzten Jahren eingehend untersucht worden.

1 Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten

Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten verläuft in mehreren Einzelschritten (Einfangen, Rollen, Adhäsion, Crawling und Transmigration) und wird durch ein komplexes Zusammenspiel von Adhäsionsmolekülen, Oberflächenrezeptoren und Chemokinen gesteuert und reguliert. Die mehrstufige Kaskade ist in Abbildung 1 dargestellt. Im Folgenden sollen die einzelnen Schritte der PMN-Rekrutierung näher erläutert werden.

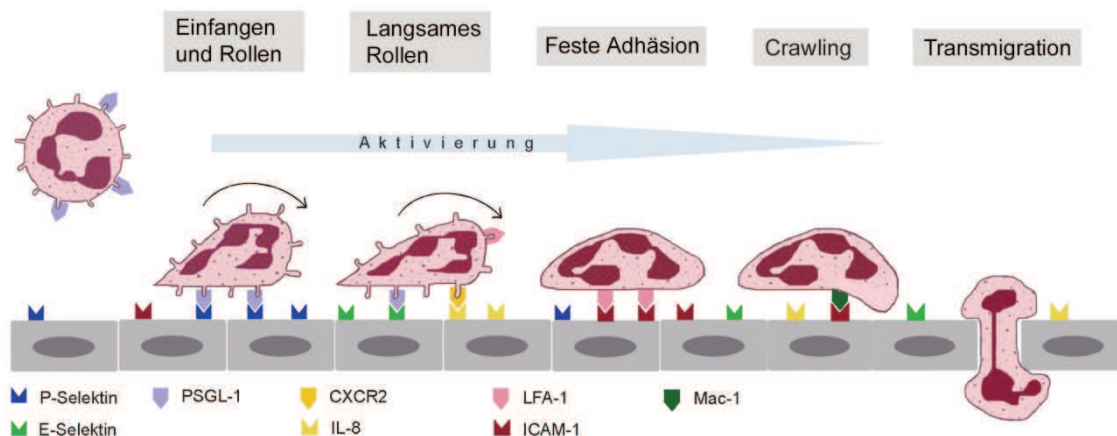


Abbildung 1: Rekrutierung neutrophiler Granulozyten modifiziert nach (Ley *et al.*, 2007). Im Rahmen von Entzündungen beginnt die Rekrutierung frei fließender neutrophiler Granulozyten mit ihrem Einfangen (Capture). Im nächsten Schritt rollen die PMN entlang des inflammatorisch veränderten Endothels (Rollen und langsames Rollen). Diese Prozesse werden durch Selektine und ihre Liganden (v.a. PSGL-1) vermittelt. Während des Rollens interagieren endothelial präsentierte Chemokine wie z.B. Interleukin-8 mit spezifischen Chemokinrezeptoren (z.B. CXCR2) auf der Oberfläche der PMN und bewirken dadurch eine Aktivierung von β_2 -Integrinen (LFA-1 und Mac-1). Dies begünstigt wiederum die feste Adhäsion der Neutrophilen unter anderem an den β_2 -Integrinliganden ICAM-1 und das anschließende Crawling, bei dem sich die PMN auf der Suche nach einer geeigneten Stelle für die Transmigration ins Gewebe langsam entlang der Endothelzellschicht bewegen.

1.1 Einfangen (Capture)

Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten bei Entzündungsprozessen erfolgt hauptsächlich in postkapillären Venolen (Kunkel *et al.*, 2000). Sie beginnt mit der Margination, bei der frei fließende PMN durch die schnelleren und teilweise aggregierten Erythrozyten an den Kapillarrand gedrängt werden. Dort treten sie erstmals mit dem inflammatorisch veränderten Endothel in Kontakt (primary capture) (Munn *et al.*, 1996). Das Einfangen frei fließender PMN kann außerdem durch bereits adhärente neutrophile Granulozyten vermittelt werden. Dieses Phänomen wird „secondary capture“ oder auch „secondary tethering“ genannt (Eriksson *et al.*, 2001).

1.2 Rollen

Die eingefangenen neutrophilen Granulozyten beginnen im nächsten Schritt auf der Endothelzellschicht zu rollen. Dieser Prozess dient dazu, die Zellen auf die nachfolgende feste Adhäsion vorzubereiten. Biomechanisch ist das Rollen als dynamisches Gleichgewicht zu sehen aus Entstehung von Bindungen an der Vorderseite der PMN-Endothelzell-Kontaktzone und Lösung der Bindungen an ihrer Hinterseite (Sperandio *et al.*, 2006a). Sowohl das Einfangen, als auch das Rollen der PMN werden durch so genannte Selektine und ihre Liganden vermittelt.

1.2.1 Aufbau der Selektine

Es gibt drei verschiedene Selektine: L-, P- und E-Selektin. Die Selektine sind Glykoproteine und gehören zur Familie der C-Typ-Lektine. Ihr Aufbau ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Das am N-Terminus gelegene C-Typ Lektin erkennt in Anwesenheit von Calcium die Kohlenhydratketten von Selektinliganden. Die darauf folgende „Epidermal-Growth-Factor-like-Domäne“ (EGF-like-Domäne) trägt zur Ausrichtung und Präsentation der Bindungsstelle für Selektinliganden bei (Sperandio *M.*, 2004). Eine variable Anzahl von „Short Consensus Repeats“ (SCR) unterscheidet die verschiedenen Selektine und verbindet die EGF-like-Domäne mit der Transmembrandomäne. Der C-Terminus wird von einer kurzen zytoplasmatischen Kette gebildet, für die Signal-Funktionen gezeigt werden konnten (Vestweber & Blanks, 1999).

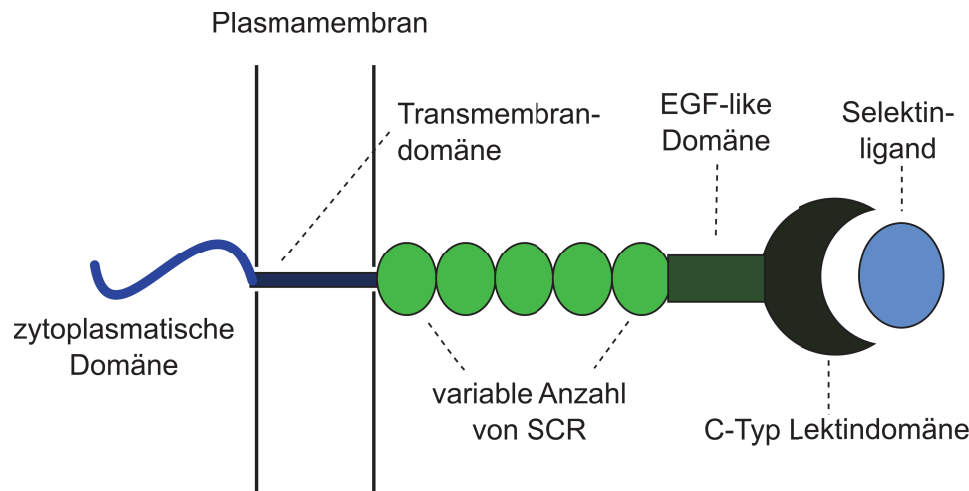


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Selektine modifiziert nach (Sperandio M., 2004). Selektine sind C-Typ-Lektine und binden an spezifische Kohlenhydratsequenzen auf Selektinliganden. Auf die C-Typ-Lektindomäne am N-Terminus folgt die EGF-like Domäne und je nach Selektintyp eine variable Anzahl von „Short Consensus Repeats“ (SCR). Der kurze zytoplasmatische Schwanz besitzt eine Signalübertragungsfunktion.

1.2.2 Funktion der Selektine

Die drei bekannten Selektine werden heute mit je einem Buchstaben bezeichnet, der für den Zelltyp steht, auf dem sie exprimiert werden oder erstmals entdeckt wurden. So wird P-Selektin in α -Granula von Thrombozyten (engl. platelets) und in Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen gespeichert. Bei einer Stimulation der Zellen durch Entzündungsmediatoren wie Histamin oder Thrombin wird es innerhalb von Minuten auf der Zelloberfläche präsentiert (Sperandio *et al.*, 2003b). Das endotheliale P-Selektin ist das wichtigste Adhäsionsmolekül für das Einfangen und initiale Rollen der PMN zu Beginn einer Entzündungsreaktion. In verschiedenen murinen Modellen konnte dies verdeutlicht werden: Bei Mäusen mit P-Selektin-Defizienz (*P-selektin*^{-/-}) beobachteten Mayadas *et al.* in der ersten Stunde nach Trauma-Induktion keine rollenden Leukozyten (Mayadas *et al.*, 1993). Analog dazu wurde in einem Peritonitis-Modell bei *P-selektin*^{-/-} Mäusen nach zwei und vier Stunden eine verminderte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten gezeigt, die aber zu späteren Zeitpunkten wieder ein normales Level erreichte (Bullard *et al.*, 1996).

E-Selektin wird im Gegensatz zu P-Selektin nicht in intrazellulären Vesikeln gespeichert. Bei einer Stimulation der Endothelzellen mit proinflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1) oder Lipopolysaccharid (LPS) wird es auf Transkriptionsebene hochreguliert und mit ca. zwei Stunden Verzögerung auf dem Endothel exprimiert (Sperandio *et al.*, 2003a). In *ex*

in vivo Flusskammerversuchen mit Mäusen konnten Smith *et al.* für P- und E-Selektin synergistische Funktionen nachweisen. So vervielfachte sich die Anzahl rollender Neutrophiler bei Koimmobilisation von P- und E-Selektin in Flusskammern verglichen mit einzeln präsentierten Proteinen. Beim Einfangen von PMN erwies sich E-Selektin als weniger potent (Smith *et al.*, 2004). Weitere Unterschiede konnten in Untersuchungen mit *E-selektin*^{-/-} Mäusen herausgearbeitet werden. Nach Zytokin-Stimulation wurde zum einen eine signifikant erhöhte Rollgeschwindigkeit der PMN gezeigt, zum anderen war die Anzahl adhärenter Zellen signifikant reduziert (Kunkel & Ley, 1996; Ley *et al.*, 1998). Daraus lässt sich ableiten, dass E-Selektin *in vivo* das langsame Rollen von neutrophilen Granulozyten vermittelt und zur Konversion des Rollens in eine feste Adhäsion beiträgt (Kuwano *et al.*, 2010).

L-Selektin wird konstitutiv auf den Mikrovilli der meisten Leukozyten exprimiert (von Andrian *et al.*, 1995). Das L-Selektin vermittelte Leukozytenrollen in entzündlich veränderten Gefäßen wird durch Interaktionen frei fließender mit bereits adhären Leukozyten ermöglicht („secondary tethering“) (Bargatze *et al.*, 1994). Durch Stimulation der Leukozyten z.B. mit fMLP oder Interleukin-8 (IL-8) wird L-Selektin enzymatisch von der Zelloberfläche abgespalten und ins Blutplasma abgegeben (= Shedding). Der physiologische Grund hierfür ist nicht eindeutig geklärt, es wurde jedoch gezeigt, dass das L-Selektin Shedding die Leukozyten-Rollgeschwindigkeit beeinflusst und einen regulatorischen Effekt auf die Leukozytenrekrutierung hat (Sperandio *et al.*, 2003b). Abgesehen von seiner Funktion als Rollrezeptor, spielt L-Selektin auch bei der Leukozytenadhäsion, der Transmigration und insbesondere bei der Vermittlung des Lymphocyte-Homing in hochendothelialen Venolen (HEV) eine wichtige Rolle (Tedder *et al.*, 1995; Khan & Kubes, 2003).

1.2.3 Selektinliganden

Für P-Selektin konnte *in vivo* bisher nur ein funktionell relevanter Ligand identifiziert werden: P-selectin-glycoprotein-ligand-1 (PSGL-1). PSGL-1 ist ein homodimeres Transmembranprotein, das auf fast allen Leukozyten exprimiert wird. Seine beiden Polypeptidketten sind über eine Disulfidbrücke verbunden und tragen auf der extrazellulären Domäne eine Vielzahl von O-Glykanen, welche das Selektin-bindende Tetrasaccharid sialyl Lewis X (sLe^x) enthalten, das essentiell für die Bindung an Selektine ist (Sperandio, 2006b). Bei Patienten mit dem Krankheitsbild LAD-II fehlt die Struktur sLe^x aufgrund eines Defekts im Gen des Golgi-GDP-Fukose-Transporters

(Slc35c1). Die dadurch bedingte Unfähigkeit der neutrophilen Granulozyten zu Rollen, äußert sich klinisch in rekurrierenden bakteriellen Infektionen während der ersten Lebensjahre (Yakubenia & Wild, 2006). PSGL-1 scheint auch für E-Selektin abhängiges Leukozyten-Einfangen verantwortlich zu sein, vermittelt aber nicht das langsame Rollen und den Übergang zur Adhäsion der Leukozyten. *In vivo* Untersuchungen weisen darauf hin, dass CD44 ein weiterer E-Selektinligand sein könnte (Katayama *et al.*, 2005). L-Selektin vermittelt das Leukozytenrollen beim „secondary capture“ durch Bindung an leukozytäres PSGL-1 (Sperandio *et al.*, 2003a).

1.3 Feste Adhäsion

Während des Rollens bewirkt die Interaktion neutrophiler Granulozyten mit endothelial präsentierten Chemokinen eine zunehmende Aktivierung und Clusterbildung leukozytärer Integrine, welche die anschließende feste Adhäsion der PMN an das Endothel vermitteln.

1.3.1 Einfluss von Chemokinen auf die Adhäsion

Im Rahmen einer Entzündungsreaktion werden die Endothelzellen durch inflammatorische Zytokine stimuliert, Chemokine zu bilden und auf ihrer Oberfläche zu präsentieren (Olson & Ley, 2002). Die Bindung der Chemokine an spezifische Rezeptoren auf rollenden PMN löst eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade mit konsekutiver Aktivierung der leukozytären Integrine aus (inside-out signaling). Die Integrin-Aktivierung äußert sich in Konformationsänderungen, welche eine Steigerung der Integrin-Affinität bewirken, sowie in einer dichteren Anordnung der Moleküle auf der Plasmamembran (= Clustering). Nur bei Leukozyten, die durch Stimulation aktiviert wurden, liegen die Integrine in einer Konformation vor, die eine Ligandenbindung ermöglicht (Ley *et al.*, 2007). Dies wird im Krankheitsbild der LAD-III deutlich, das durch eine fehlende Aktivierbarkeit von β_1 -, β_2 - und β_3 - Integrinen in hämatopoetischen Zellen gekennzeichnet ist. Die betroffenen Patienten leiden aufgrund der resultierenden Unfähigkeit zur Leukozytenadhäsion und zur Plättchenaggregation an rezidivierenden Infektionen und schweren Blutungen. Moser *et al.* konnten jüngst demonstrieren, dass das Molekül Kindlin-3 für die Aktivierung dieser drei Integrin-Klassen benötigt wird und ein Verlust der Kindlin-3 Funktion bei Mäusen den Phänotyp einer LAD-III hervorruft (Moser *et al.*, 2009). Genetische Analysen bestätigten schließlich eine Mutation im Kindlin-3 Gen als Ursache für die LAD III (Svensson *et al.*, 2009; Malinin *et al.*, 2009).

Bei neutrophilen Granulozyten spielt in diesem Zusammenhang das Chemokin IL-8 eine wichtige Rolle, das auf inflammatorisch veränderten Endothelzellen präsentiert wird und an seine Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 auf PMN bindet. DiVietro *et al.* konnten in Flusskammerexperimenten mit humanen PMN zeigen, dass der Übergang vom Rollen zur Adhäsion von IL-8 abhängig ist. Je höher die eingesetzte IL-8 Konzentration war, desto schneller erfolgte eine Adhäsion rollender Zellen und desto größer war die Avidität von β_2 -Integrinen kurz vor der Adhäsion (DiVietro *et al.*, 2001).

1.3.2 Aufbau der Integrine

Zur Familie der Integrine werden bei Säugern über 20 heterodimere Transmembranproteine gezählt. Für die Leukozytenadhäsion spielt aber vor allem die Subfamilie der β_2 -Integrine eine Rolle. Die β_2 -Integrine werden auch Leukozyten-Integrine genannt, weil sie ausschließlich auf hämatopoetischen Zellen exprimiert werden. Sie bestehen aus einer β_2 -Kette kombiniert mit einer von vier unterschiedlichen α -Ketten, woraus sich die folgenden vier Heterodimere ergeben: LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$ bzw. CD11a/CD18), Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$ bzw. CD11b/CD18), p150.95 ($\alpha_X\beta_2$ bzw. CD11c/CD18) und $\alpha_D\beta_2$ bzw. CD11d/CD18 (Luo *et al.*, 2007). Der Aufbau der β_2 -Integrine ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

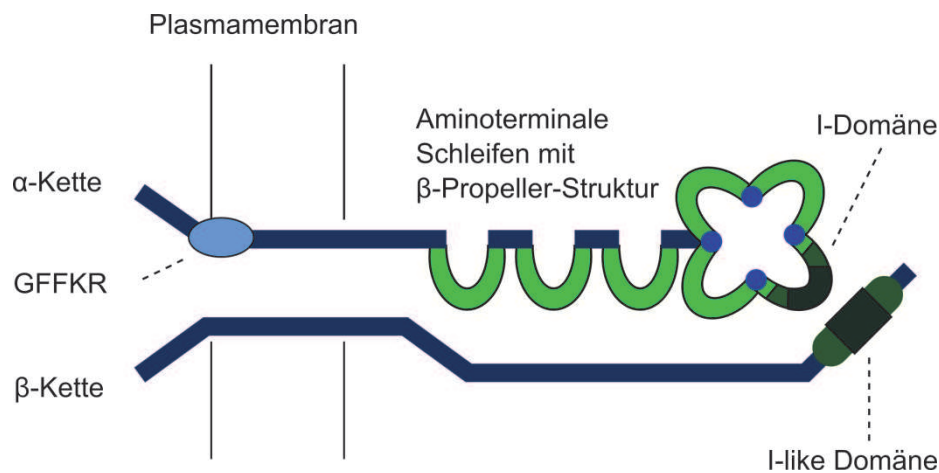


Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines β_2 -Integrins modifiziert nach (Harris *et al.*, 2000). Der extrazellulär gelegene N-terminale Anteil der α -Kette beinhaltet sieben homologe Schleifen, von denen vier in einer Propeller-Struktur angeordnet sind. Die für die Ligandenbindung (I-Domäne der α -Kette) und Ligandenerkennung (I-like Domäne der β -Kette) wichtigen Regionen sind in dunkelgrün dargestellt. Die GFFKR Sequenz (hellblau) im zytoplasmatischen Schwanz der α -Kette besitzt eine Aktivierungsfunktion.

Der extrazelluläre Bereich einer α -Kette besteht aus sieben Schleifen, die im N-terminalen Bereich zu einer β -Propeller-Struktur organisiert sind und eine für die

Ligandenbindung wichtige I-Domäne enthalten. Sowohl die I-Domäne, als auch die für die Ligandenerkennung zuständige I-like Domäne der β_2 -Kette beinhalten Bindungsstellen für bivalente Kationen (Mg^{2+}) und können ihre Funktion nur in deren Anwesenheit erfüllen. Die GFFKR-Region im zytoplasmatischen Abschnitt der α -Kette vermittelt die nicht-kovalente Bindung zwischen α - und β -Kette und scheint zudem die Ligandenbindung zu regulieren (Luo *et al.*, 2007).

1.3.3 Funktion der Integrine

Die Bedeutung der β_2 -Integrine zeigt sich beim Menschen im Krankheitsbild der Leukozyten-Adhäsions-Defizienz-I (LAD-I), das durch einen Funktionsverlust der β_2 -Kette verursacht wird. Die betroffenen Patienten leiden aufgrund einer Unfähigkeit zur Rekrutierung von Leukozyten an schweren bakteriellen Infektionen (Etzioni, 2007). In *Cd18^{-/-}* Mäusen konnte die Funktion der β_2 -Integrine noch weiter aufgeschlüsselt werden: Die Rollgeschwindigkeit der Leukozyten war in Maus-Venolen nach Stimulation um ein 4- bis 5-faches erhöht, während die Anzahl adhärenter Zellen stark erniedrigt war (Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1998; Jung *et al.*, 1998).

LFA-1 wird konstitutiv auf allen Leukozyten exprimiert und ist neben seiner wichtigen Rolle bei der festen Adhäsion zusätzlich am langsamen Rollen, der Aktivierung und der Transmigration durch das Endothel beteiligt. Mac-1 (= Komplement Rezeptor 3, CR3) wird neben seiner Expression auf der Oberfläche auch in intrazellulären Vesikeln von reifen Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen sowie manchen T- und B-Lymphozyten gespeichert und bei Stimulation auf der Zelloberfläche präsentiert (Sperandio & Ley, 2003b). Sein Aufgabenbereich umfasst die Vermittlung der Komplement-getriggerten Phagozytose durch Neutrophile und Makrophagen, die Leukozytenadhäsion, sowie das darauf folgende „intraluminale Crawling“ (Dustin M.L., 2001; Phillipson *et al.*, 2006). In vergleichenden Untersuchungen an *Lfa-1^{-/-}*, *Mac-1^{-/-}*, *Icam-1^{-/-}* und *Rage^{-/-}* Mäusen konnte eine teilweise überlappende, aber auch spezifische Rolle von LFA-1 und Mac-1 für die Leukozytenadhäsion herausgearbeitet werden (Ding *et al.*, 1999; Frommhold *et al.*, 2010). Die Bedeutung der anderen beiden β_2 - Integrine (CD11c/CD18 und CD11d/CD18) *in vivo* ist bisher unklar.

1.3.4 Integrinliganden

Bei der Leukozytenadhäsion und Transmigration binden Integrine an verschiedene Vertreter der Immunglobulin Superfamilie von Adhäsionsmolekülen. Eine entscheidende Rolle fällt dabei den „intercellular cell adhesion molecules“ (ICAMs)

und insbesondere dem ICAM-1 zu. ICAM-1 wird konstitutiv auf ruhenden Endothelzellen exprimiert und kann bei Stimulation durch proinflammatorisch wirksame Substanzen hochreguliert werden. Analog zu seinen Liganden LFA-1 und Mac-1 wurde für ICAM-1 eine Beteiligung an der Vermittlung des Leukozytenrollens und der -Adhäsion beschrieben (Smith *et al.*, 1988). So beobachteten Steeber *et al.* eine signifikant erhöhte Rollgeschwindigkeit in *Icam-1^{-/-}* Mäusen nach Trauma oder TNF- α -induzierter Entzündung (Steeber *et al.*, 1998). Im *in vivo* Mausmodell wurde zudem eine durch die Abwesenheit von ICAM-1 bedingte Beeinträchtigung der Emigration neutrophiler Granulozyten beobachtet (Sligh, Jr. *et al.*, 1993).

Während LFA-1 nur an Moleküle der ICAM-Familie bindet, sind für Mac-1 weitere Liganden bekannt. Insbesondere der endotheliale Receptor for Advanced Glycation Endproducts (= RAGE) scheint nach neusten Erkenntnissen eine wichtige Rolle bei der Mac-1 vermittelten Adhäsion zu spielen. Frommhold *et al.* beobachteten bei *Rage^{-/-} Icam-1^{-/-}* Mäusen eine signifikante Beeinträchtigung der Trauma-induzierten Leukozyten-Adhäsion, die sich aber nur bei Abwesenheit beider Moleküle zeigte (Frommhold *et al.*, 2010).

1.4 Crawling und Transmigration

Die Transmigration beschreibt den letzten Schritt der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten, bei dem sie die Endothelschicht und die Basalmembran passieren und in das extravasal gelegene Gewebe auswandern (Dejana, 2006). Bevor Neutrophile jedoch durch die Kapillarwand migrieren, kriechen sie entlang der luminalen Gefäßoberfläche auf der Suche nach einer geeigneten Stelle für die Diapedese. Dieser Prozess wird durch Mac-1 vermittelt und ist für eine effektive Transmigration der Neutrophilen von entscheidender Bedeutung. So konnte gezeigt werden, dass Neutrophile in *Mac-1^{-/-}* Mäusen die Endothelzellschicht an ungünstigen Stellen durchwandern und somit die Transmigration deutlich verzögern (Phillipson *et al.*, 2006). Verglichen mit den zuvor beschriebenen Schritten der Leukozytenrekrutierung sind die Mechanismen der Transmigration von Leukozyten *in vivo* weniger genau bekannt. Jüngere Arbeiten zeigen ein Überwiegen der parazellulären zur transzellulären Migration (Phillipson *et al.*, 2006).

Die hier beschriebenen Schritte der PMN-Rekrutierung in infiziertes bzw. entzündetes Gewebe beruhen auf Erkenntnissen, die in Studien im adulten System gewonnen

wurden. Über die Abläufe der PMN-Rekrutierung bei Neugeborenen und insbesondere Frühgeborenen ist bisher deutlich weniger bekannt.

2 PMN-Rekrutierung bei Neonaten

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten von Neonaten im Vergleich zu adulten PMN sowohl strukturelle als auch funktionelle Unterschiede aufweisen (Nussbaum & Sperandio, 2011). So scheint die Fähigkeit zur Migration in infiziertes Gewebe bei neonatalen PMN reduziert zu sein, was auf eine Beeinträchtigung verschiedener Komponenten der Rekrutierungskaskade, der Chemotaxis sowie eine schlechtere Verformbarkeit der Zellen zurückzuführen sein kann (Hill, 1987; Bektas *et al.*, 1990). Auch im Bereich der Phagozytose und der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wurden bei neonatalen PMN Einschränkungen beobachtet, für die zum Teil eine direkte Abhängigkeit von Gestationsalter und Geburtsgewicht gezeigt wurde (Wu *et al.*, 2005). Für die Untersuchung der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten wurden in den meisten Studien Zellen von reifen Neugeborenen ($\geq 37+0$ Schwangerschaftswochen) verwendet, während es bisher kaum Informationen über die Rekrutierungskaskade bei Frühgeborenen ($\leq 36+6$ Schwangerschaftswochen) gibt.

2.1 Reife Neugeborene

In Untersuchungen mit humanem Nabelschnurblut und in tierexperimentellen Versuchen wurden bei reifen Neugeborenen Einschränkungen im Bereich der Adhäsion und der Transmigration beobachtet (Eisenfeld *et al.*, 1990; Fortenberry *et al.*, 1994). Insbesondere die Expression der leukozytären Adhäsionsmoleküle Mac-1, LFA-1 und L-Selektin wurde bei Neugeborenen bereits eingehend untersucht (Anderson *et al.*, 1987; Anderson, 1989; Anderson *et al.*, 1991; Moriguchi *et al.*, 2006). Während sich die LFA-1-Expression bei reifen Neugeborenen und Erwachsenen in diesen Studien nicht unterschied, war die L-Selektin-Expression auf der Oberfläche neonataler PMN vermindert. Die Neutrophilen von reifen Neugeborenen waren außerdem kaum in der Lage, die Expression von Mac-1 nach chemotaktischer Stimulation hoch zu regulieren. Tchamtchi *et al.* beschrieben weiterhin eine signifikant niedrigere PSGL-1-Expression der PMN reifer Neugeborener im Vergleich zu adulten Zellen (Tchamtchi *et al.*, 2000). Über die Expression und Funktionalität des IL-8-Rezeptors CXCR2 ist bei Neugeborenen bisher noch nichts bekannt.

2.2 Frühgeborene

Deutlich weniger Studien wurden über die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten bei Frühgeborenen veröffentlicht. Zudem wurden in den meisten Fällen nur statische Messungen von Oberflächenrezeptoren durchgeführt, mit denen zwar quantitative Aussagen gemacht, nicht jedoch die Funktionalität der Rezeptoren und der Neutrophilen im Allgemeinen beurteilt werden können. In Modellen, welche die PMN-Rekrutierung unter Flussbedingungen untersuchen, können die physiologischen Verhältnisse wesentlich besser simuliert werden. Dennoch existieren bis dato keine Studien zur dynamischen PMN-Rekrutierung bei Frühgeborenen in Flusskammersystemen.

In vergleichenden durchflusszytometrischen Untersuchungen bei Früh- und Reifgeborenen zeigte sich eine Korrelation der Expression verschiedener für die Rekrutierungskaskade wichtiger Oberflächenrezeptoren mit dem Gestationsalter. So war die stimulierte Expression von Mac-1 und die L-Selektin-Expression auf PMN von Frühgeborenen (< 35. SSW) signifikant reduziert im Vergleich zu reifen Neugeborenen und adulten Kontrollen (Carr *et al.*, 1992; Strunk *et al.*, 2004). Analysen der PSGL-1- und CXCR2-Expression bei Frühgeborenen wurden bisher nicht publiziert. Die von Bektas *et al.* und Carr *et al.* untersuchte statische Adhäsion der PMN von Frühgeborenen an Nylonfasern und HUVEC offenbarte deutliche Unterschiede zu neonatalen und adulten Kontrollen (Bektas *et al.*, 1990; Carr *et al.*, 1992). Allerdings wurde in diesen Studien keine Differenzierung zwischen Frühgeborenen verschiedener Gestationsaltersstufen vorgenommen. Dass genau diese Unterscheidung aber interessant wäre, wird in vorangegangenen tierexperimentellen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe deutlich. Anhand eines neues Modells, welches eine intravitalmikroskopische Analyse der Mikrozirkulation in intra- und extraembryonalen Geweben erlaubt, gelang es kürzlich die Leukozytenrekrutierung bei murinen Feten *in vivo* zu analysieren (Publikation in Vorbereitung). Diesbezügliche Untersuchungen, die in Kooperation mit dem Labor von Prof. von Andrian (Boston, USA) durchgeführt wurden, zeigten interessanterweise, dass sich die Fähigkeit zur Rekrutierung von PMN bei Mäusen erst im Verlauf der Gestation entwickelt. So fanden sich in Dottersackgefäßen und in zerebralen Venolen von Mäusefeten am Tag 13 von 21 Gestationstagen weder rollende noch adhärenente Neutrophile. Mit fortschreitendem Gestationsalter kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg rollender und adhärenenter PMN in den beobachteten Gefäßen. Erst ab Tag 17 und später konnte sowohl Rollen als auch Adhäsion in größerer Zahl dargestellt werden. Es ist derzeit unklar, ob und

inwieweit es einen vergleichbaren „Reifungsprozess“ der PMN-Rekrutierung beim Menschen im Verlauf der fetalen Entwicklung gibt.

3 Hypothese und Zielsetzung

Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten ist ein entscheidender Schritt bei der Abwehr bakterieller Infektionen, welche die Morbidität und Mortalität Frühgeborener und reifer Neugeborener wesentlich beeinflussen. Unser Wissen über die prinzipiellen Abläufe während der Auswanderung von Granulozyten in infiziertes Gewebe wurde in den letzten Jahren durch zahlreiche Studien im adulten System wesentlich erweitert. Ob die bei Erwachsenen im Rahmen der PMN-Rekrutierung beobachteten Prozesse jedoch auch bei Neugeborenen und insbesondere Frühgeborenen in gleicher Weise ablaufen, wurde bisher nur unzureichend geklärt. Die Mehrzahl der bislang durchgeführten Studien befasste sich mit der Untersuchung isolierter Neutrophilenfunktionen unter Anwendung statischer Methoden, welche die Verhältnisse in der Mikrozirkulation nur eingeschränkt wiedergeben können. Bei der Untersuchung von Frühgeborenen wurden diese zudem unabhängig vom Gestationsalter in einer Gruppe analysiert. Ein Vergleich von Frühgeborenen verschiedener Gestationsaltersstufen wurde meist nicht vorgenommen. Unsere intravitalmikroskopischen Untersuchungen an murinen Feten und die bis dato publizierten Ergebnisse zur Expression von Adhäsionsmolekülen bei Früh- und Reifgeborenen weisen allerdings darauf hin, dass es einen vom Gestationsalter abhängigen Reifungsprozess der PMN-Rekrutierung geben könnte.

Unter der Hypothese, dass die Rekrutierungsfähigkeit neutrophiler Granulozyten vom Gestationsalter abhängig ist, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen bearbeitet:

- 1) Wie ändert sich das Rollverhalten fetaler neutrophiler Granulozyten im Verlauf der Schwangerschaft?
- 2) Wie ändert sich das Adhäsionsverhalten fetaler neutrophiler Granulozyten im Verlauf der Schwangerschaft?
- 3) Wie ändert sich die Expression adhäsionsrelevanter Oberflächenmoleküle auf PMN im Verlauf der fetalen Entwicklung?

II MATERIAL UND METHODIK

1 Patienten

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden vor Studienbeginn von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) bewilligt (Antrag Nr. 249-08). Im Zeitraum Oktober 2008 bis November 2009 fand in der 1. Universitätsfrauenklinik der LMU die Rekrutierung schwangerer Frauen statt. Bei Vorliegen einer schriftlichen Einverständniserklärung wurde bei der Geburt ihrer Kinder Nabelschnurblut entnommen, sofern keine der folgenden Ausschlusskriterien vorlagen: Spontangeburt, geplante Nabelschnurzell-Spende, HIV-Infektion der Schwangeren, Vorliegen von familiären Immundefekten oder angeborenen Fehlbildungen des Neugeborenen. Für die Kontrollgruppe spendeten gesunde Erwachsene venöses Blut. In Anlehnung an die tierexperimentellen Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe wurden folgende Versuchsgruppen gewählt:

- Gruppe 1: Frühgeborene zwischen 23+0 und 29+6 SSW
- Gruppe 2: Frühgeborene zwischen 30+0 und 36+6 SSW
- Gruppe 3: Reifgeborene $\geq 37+0$ SSW
- Gruppe 4: Kontrollgruppe (gesunde Erwachsene)

Das Gestationsalter wurde anhand des Datums der letzten Regelblutung der Schwangeren sowie durch Ultraschalluntersuchungen ermittelt. Außerdem wurden das Geschlecht und das Geburtsgewicht der Neugeborenen erfasst. Zusätzlich wurden aus dem Nabelschnurblut der pH-Wert, ein großes Blutbild, sowie der Plasmaspiegel von Interleukin-6 (IL-6) und C-reaktivem Protein (CRP) bestimmt. Bei Neugeborenen mit klinischem Verdacht auf eine Infektion wurden die Entzündungsparameter weiter kontrolliert. Da insbesondere bei den extremen Frühgeborenen nur sehr kleine Blutvolumina gewonnen werden konnten, war es nicht möglich, bei jedem Individuum alle Messungen durchzuführen. Die genaue Anzahl der Neugeborenen wird deshalb für die einzelnen Experimente jeweils in den Legenden der Abbildungen und Tabellen aufgeführt.

2 Versuchsablauf

In Abbildung 4 ist der zeitliche Ablauf der im Folgenden beschriebenen Versuche schematisch dargestellt. Parallel zur Gewinnung neutrophiler Granulozyten aus dem Nabelschnurblut wurden rektanguläre Mikroglaskapillaren mit unterschiedlichen rekombinanten Proteinen beschichtet und als Flusskammern verwendet. Die isolierten PMN wurden zudem für durchflusszytometrische Analysen herangezogen.

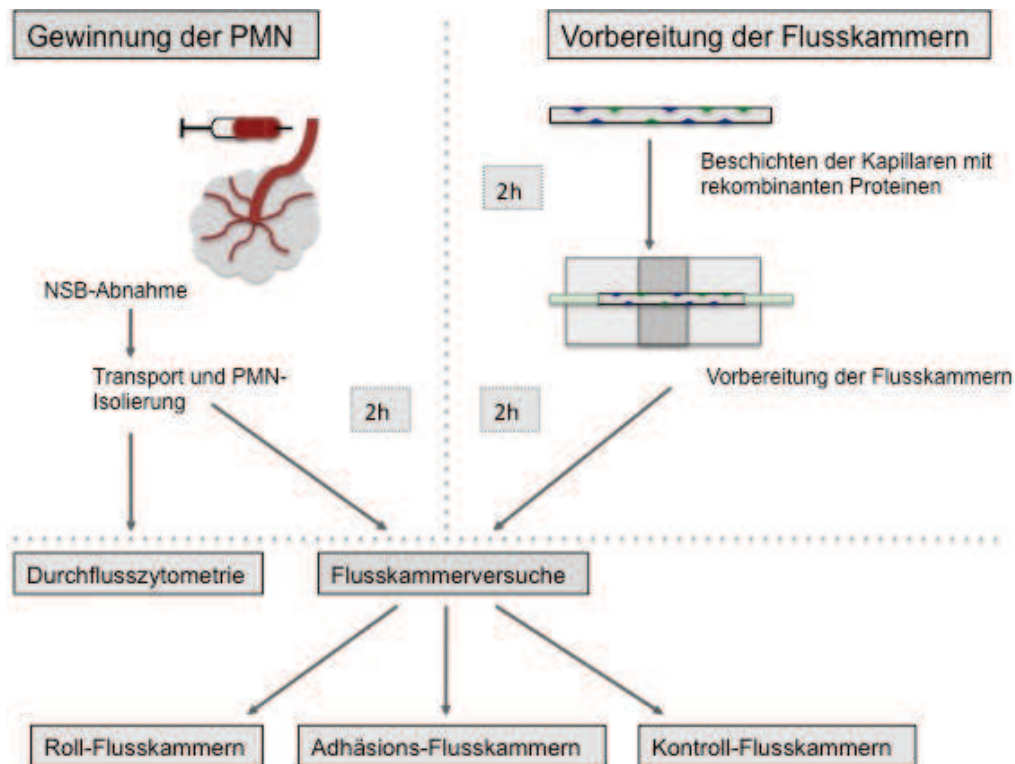


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes. Während die PMN durch Nabelschnurblut-(NSB-) Abnahme und anschließende Isolierung aus dem Vollblut gewonnen wurden, erfolgte parallel die Vorbereitung der verschiedenen Flusskammern. Dafür wurden Kapillaren mit rekombinanten Proteinen beschichtet und die unspezifische Adhäsion mit Casein geblockt. Mit den isolierten Zellen wurden dann einer oder mehrere der aufgeführten Versuche durchgeführt.

3 Probenentnahme

Innerhalb von 10 Minuten nach Abnabelung der Neugeborenen und Lösung der Plazenten wurde Blut aus den Nabelschnurgefäßen und den nabelschnurnahen placentaren Gefäßen in Natriumcitratröhrchen (Coagulation; 3 ml; SARSTEDT Monovette®; Nümbrecht; Deutschland) abgenommen. Die so gewonnenen Blutvolumina schwankten abhängig von der Beschaffenheit der Plazenta und der

Nabelschnur zwischen 3 und 10 ml. Um eine Koagulation zu verhindern, wurden die Röhren vorsichtig geschwenkt. Anschließend wurde das Blut in einer Transportbox in das Labor der Arbeitsgruppe Sperandio am Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin gebracht und innerhalb von 45 bis 90 Minuten nach Blutabnahme dort weiterverarbeitet. Für die adulte Kontrollgruppe wurde gesunden Erwachsenen jeweils 9 ml Blut durch periphere Venenpunktion in Natriumcitratröhren abgenommen. Analog zum neonatalen Blut begann die Weiterverarbeitung frühestens nach 45 min.

4 PMN-Isolierung

Da sowohl in den Flusskammerversuchen als auch in den durchflusszytometrischen Messungen die neutrophilen Granulozyten Gegenstand der Untersuchung waren, wurden diese Zellen zunächst aus dem Vollblut isoliert. Zu diesem Zweck wurde eine leicht modifizierte Version des Protokolls zur PMN-Isolation mittels Dichtezentrifugation auf Ficoll (LSM 1077; PAA Laboratories GmbH; Cölbe; Deutschland) und anschließender osmotischer Erythrozytenlyse verwendet (Quinn *et al.*, 2007). LSM 1077 ist ein neutrales hydrophiles Polysaccharid aus Saccharose mit einer Dichte von 1.077 g/ml, das zur Isolierung von Lymphozyten, Monozyten, neutrophilen Granulozyten oder subzellulären Partikeln aus dem Vollblut geeignet ist. Die verschiedenen Zellpopulationen werden während der Zentrifugation durch Dichtegradienten aufgetrennt. Die leichteren Thrombozyten verbleiben in der obersten Plasma-Phase, während die Lymphozyten und Monozyten sich in der Interphase zwischen Plasma und Ficoll sammeln. Die Erythrozyten und Granulozyten bilden den Bodensatz (Abb.5). Das antikoagulierte unverdünnte Vollblut wurde im Verhältnis Blut:Ficoll = 1:3 vorsichtig auf das Ficoll in ein Polypropylen-Röhrchen (50 ml; BD Falcon™ Conical Tubes; Heidelberg; Deutschland) geschichtet. Dieses wurde anschließend bei Raumtemperatur 20 Minuten lang mit einer Geschwindigkeit von 2500 U/min (= 800 g) zentrifugiert (Rotanta/K, Hettich Zentrifugen; Tuttlingen; Deutschland).

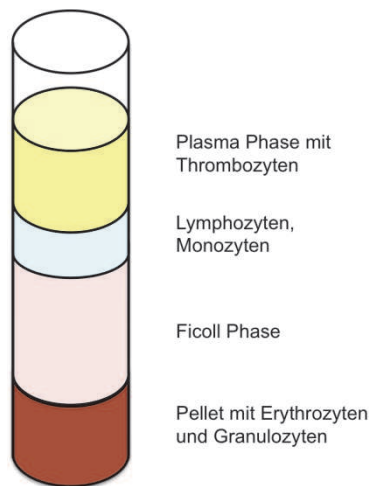


Abbildung 5: Zellsolierung durch Dichtezentrifugation auf LSM 1077 (Quinn et al., 2007). Bei der Zentrifugation von Vollblut auf Ficoll LSM 1077 werden die verschiedenen Zellpopulationen durch Dichtegradienten aufgetrennt. Die Granulozyten verbleiben zusammen mit den Erythrozyten in der untersten Phase. Durch Entfernen des Überstands und eine anschließende osmotische Lyse der Erythrozyten können die PMN isoliert werden.

Für die folgenden Waschvorgänge wurde ein Calcium- und Magnesium-freier Phosphatpuffer (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (10x); Invitrogen GmbH; Karlsruhe; Deutschland) in einer 1:10 Verdünnung mit Aqua ad iniectabilia (B.Braun; Melsungen; Deutschland) verwendet. Nach Absaugen der oberen 3 Schichten wurde der aus Granulozyten und Erythrozyten bestehende Bodensatz mit Phosphatpuffer gewaschen und 7 Minuten bei 1000 U/min (= 123 g) und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und der Waschvorgang einmal wiederholt.

Der im nächsten Schritt aufgeführte Erythrozyten-Lysepuffer wurde zubereitet, indem 20,05 g NH_4Cl (1,5 M) (Ammoniumchlorid; Merck; Darmstadt; Deutschland), 2,1 g NaHCO_3 (0,1 M) (Natriumhydrogencarbonat; Merck; Darmstadt; Deutschland) sowie 0,93 g EDTA (0,01 M) (Merck; Darmstadt; Deutschland) mit 250 ml Aqua ad iniectabilia vermischt wurden. Diese Suspension wurde 30 Minuten lang gerührt (Magnetrührer IKA®-combimag Ret; Staufen; Deutschland) und anschließend bei 4° Grad aufbewahrt. Für die Versuche wurde das jeweils benötigte Volumen 1:10 mit Aqua ad iniectabilia verdünnt.

Das gewaschene Granulozyten-Erythrozytenpellet wurde nun im Verhältnis Zellen:Lysepuffer = 1:7 mit dem Lysepuffer versetzt und 6 Minuten unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation der lysierten Zellen bei 1000 U/min (= 123 g) bei Raumtemperatur, der Überstand

wurde abgesaugt und verworfen. Das Pellet wurde dann weitere zweimal mit Phosphatpuffer gewaschen und jeweils 7 Minuten bei 1000 U/min (= 123 g) zentrifugiert. Für die anschließenden Versuche wurden die isolierten PMN in 1 ml Phosphatpuffer (ohne Calcium und Magnesium) aufgenommen und in einer Neubauer-Zählkammer (0,1 mm tief; Bright Line®; Bridgeville; USA) gezählt.

Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension entnommen und zusammen mit 90 µl Türkis Lösung (MERCK; Darmstadt; Deutschland) in ein Polypropylenröhrchen (1,5 ml; Sarstedt; Nümbrecht; Deutschland) gefüllt, gut vermischt und wenige Minuten stehen gelassen. Anschließend wurden 10 µl der gefärbten Zellen in die Zählkammer pipettiert und unter dem Mikroskop (Zeiss) ausgezählt. Neben der Anzahl der PMN wurden für die spätere Analyse der Reinheit des Isolationsverfahrens auch die Anzahl mononukleärer Zellen (Monozyten, Lymphozyten und Leukozytenvorstufen) in allen vier Quadranten erfasst.

Durch Färbung der neutrophilen Granulozyten mit Trypanblau (Trypan blue solution 0,4%, Sigma-Aldrich, Deutschland) wurde die Vitalität der Zellen nach dem Isolationsverfahren geprüft. Trypanblau wird nur von Zellen ohne intakte Zellmembran aufgenommen. Die Färbung der Zellen mit dieser Substanz erlaubt somit eine Differenzierung zwischen vitalen und abgestorbenen PMN.

5 Flusskammerversuche

Zur Klärung der Fragestellung wurde ein *in vitro* Flusskammermodell verwendet, das eine von Sperandio *et al.* (Sperandio *et al.*, 2006a) vorgestellte Modifikation des von Smith *et al.* (Smith *et al.*, 2004) etablierten *ex vivo* Modells darstellt. In einer rechteckigen Mikroglaskapillare, die mit rekombinanten Proteinen beschichtet und durch eine Hochpräzisionspumpe mit PMN perfundiert wird, können die *in vivo* Verhältnisse unter standardisierten Bedingungen simuliert werden. Als Stellvertreter für die Oberflächenmoleküle auf inflammatorisch veränderten Endothelzellen wurden P-Selektin, E-Selektin, IL-8 und ICAM-1 gewählt. Dass diese rekombinanten Proteine PMN-Rollen und -Adhäsion unter Flussbedingungen suffizient vermitteln können, wurde bereits in mehreren Studien gezeigt (Chesnutt *et al.*, 2006; Zarbock *et al.*, 2007). Da P- und E-Selektin im Rahmen der PMN-Rekrutierung *in vivo* zwar überlappende, nicht jedoch identische Funktionen übernehmen, wurden diese Moleküle getrennt eingesetzt. Das Roll- und das Adhäsionsverhalten der Neutrophilen wurden außerdem

unabhängig voneinander untersucht. Der Ablauf der Roll-Versuche unterschied sich in drei Punkten von den Adhäsions-Versuchen:

- 1) Zum Beschichten der Kapillaren wurden für die Roll-Kammern nur rekombinante Selektine verwendet, für die Adhäsion-Kammern wurden zusätzlich IL-8 und ICAM-1 eingesetzt.
- 2) Für die Perfusion der Flusskammern wurden die PMN auf eine niedrigere Arbeitskonzentration verdünnt.
- 3) Das Zellmedium für die Roll-Kammern enthielt kein Magnesium.

5.1 Vorbereitung der Flusskammern

5.1.1 Beschichten der Kapillaren

Zunächst wurden die 10 cm langen rechteckigen Glaskapillaren (0,2 x 2,0 mm, VitroCom; Mountain Lakes; USA) per Hand in Stücke von 3 cm Länge (Volumen ca. 12-15 μ l) gebrochen. Es wurden humane rekombinante Proteine (rekombinantes humanes P-Selectin, rekombinantes humanes E-Selectin, rekombinantes humanes ICAM-1, rekombinantes humanes CXCL8; R&D Systems; Minneapolis) verwendet, welche Leukozyten unter statischen und dynamischen Bedingungen binden. Sowohl für die Roll-, als auch für die Adhäsions-Versuche wurden die Kapillaren mit zwei unterschiedlichen Ansätzen von Protein-Kombinationen beschichtet. Je zwei Kapillaren enthielten dabei die unten beschriebenen Ansätze 1 bzw. 2. Um unspezifische Interaktionen in den Flusskammern auszuschließen, wurden zusätzlich Kontroll-Kammern mit anderen Protein-Kombinationen vorbereitet (Ansatz 3 bis 5). So wurden einige Kapillaren ohne Selektin beschichtet, weitere Kapillaren ohne IL-8 und zudem solche, die nur PBS + 0,1% BSA enthielten. Um die Abhängigkeit der PMN-Rekrutierung von Mg^{2+} und Ca^{2+} Ionen zu prüfen, wurden die isolierten Zellen einmalig in ein Zellmedium aufgenommen, das calcium- und magnesiumfrei zubereitet wurde und außerdem 5 mM EDTA (Titriplex®, MERCK; Darmstadt; Deutschland) enthielt. Die rekombinanten Proteine wurden während der folgenden Arbeitsschritte auf Eis gestellt.

Roll-Kammern:

Ansatz 1: rhP-Selektin (5 μ g/ml) in PBS 1x + 0,1% BSA

Ansatz 2: rhE-Selektin (5 μ g/ml) in PBS 1x + 0,1% BSA

Adhäsions-Kammern:

Ansatz 1: rhP-Selektin (10 µg/ml) + rhICAM-1 (4 µg/ml) + rhIL-8 (10 µg/ml) in PBS 1x + 0,1% BSA

Ansatz 2: rhE-Selektin (4 µg/ml) + rhICAM-1 (4 µg/ml) + rhIL-8 (10 µg/ml) in PBS 1x + 0,1% BSA

Kontroll-Kammern:

Ansatz 3: rhP-Selektin (10 µg/ml) + rhICAM-1 (4 µg/ml) in PBS 1x + 0,1% BSA

Ansatz 4: rhICAM-1 (4 µg/ml) + rhIL-8 (10 µg/ml) in PBS 1x + 0,1% BSA

Ansatz 5: PBS 1x + 0,1% BSA

Die jeweiligen Ansätze wurden in Polypropylenröhrchen (1,5 ml, Sarstedt, Nümbrecht; Deutschland) pipettiert und nach kurzem Mischen zum Beschichten der Kapillaren verwendet. Hierfür wurden die Kapillaren nacheinander in die schräg gehaltenen Röhrchen getaucht, bis sie sich voll Flüssigkeit gesaugt hatten. Daraufhin wurden sie in einer feuchten Kammer für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

5.1.2 Verkleben und Blocken der Kapillaren

Um unspezifische Bindungen der Zellen mit der Glaskapillarwand zu vermeiden, wurden die Kapillaren nach dem Beschichten mit Casein 5% (Casein from bovine milk, Sigma-Aldrich; Deutschland) in PBS geblockt. Hierzu wurden zunächst 2 cm lange Verbindungsschlauch-Stücke von einem Perfusionsbesteck (23G, 0,6 mm; ECOFLO®) abgeschnitten und die Hälfte davon mit je einem ca. 20 cm langen Einlauf-Schlauch PE 50 (I.D. 0,58 mm, O.D. 0,965 mm; Intramedic Polyethylene Tubing; Clay Adams; Parsippany; N.J.) verklebt (2-Komponentenkleber, Uhu). Nach dem Trocknen wurde die Einlaufschläuche mit Hilfe von Kanülen Gr. 1 (Microlance 3, 0,6 x 30 mm; BD; Heidelberg; Deutschland) mit jeweils 1 ml Casein durchgespült und vorsichtig über ein Kapillarende gestülpt. Die übrigen Schlauchstücke wurden an die andere Kapillarseite aufgesteckt. Die Kapillaren wurden dann mit einem in Alkohol getränkten Tupfer gesäubert.

Damit die verklebten Kapillaren später plan aufliegen, wurde als nächstes ein Objektträger (ca. 76 x 26 x 1 mm; Marienfeld; Lauda-Königshofen; Deutschland) mit einem Glasschneider in mehrere schmale (ca. 1 cm breite) Streifen zerlegt, die dann jeweils quer auf die Mitte eines zweiten Objektträgers geklebt wurden (siehe Abb. 6).

Auf die oberen, schmalen Objektträger-Stücke wurde je eine Kapillare inklusive Schlauchsystem flach rechtwinklig aufgelegt, beschwert und im Bereich der Verbindungsschlauch-Stücke großzügig angeklebt. Die Kapillaren wurden dann mit Casein geblockt, indem 0,3 bis 0,4 ml der Suspension langsam durch die Kapillaren gespült wurden. Nach 2 Stunden wurde das überschüssige Casein durch Spülen der Kapillaren mit PBS 1x entfernt.

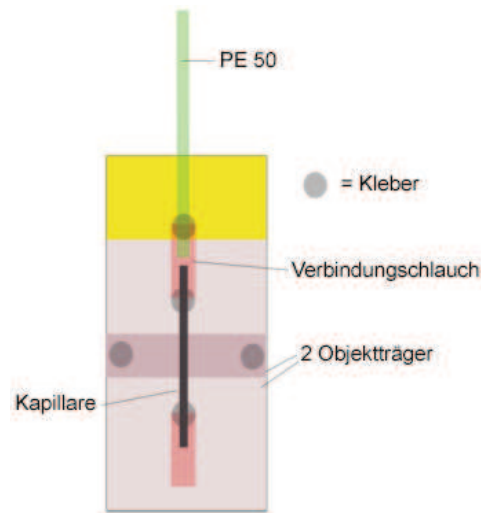


Abbildung 6: Aufbau einer Flusskammer. Eine Flusskammer besteht aus einer ca. 3 cm langen beschichteten Mikroglaskapillare, die an einem Ende über ein Verbindungsstück mit einem Einlaufschlauch PE 50 verklebt wird. Am anderen Ende wird ein kurzer Auslaufschlauch angebracht. Die Kapillare wird mittig auf einer Konstruktion aus durchsichtigen Objektträgern positioniert und mit Klebstoff befestigt.

5.2 Vorbereitung der PMN

Für die Adhäsions-Versuche wurde eine Arbeitskonzentration von 500.000 PMN/ml gewählt, die Roll-Untersuchungen wurden mit 250.000 PMN/ml durchgeführt. Die gewünschten Konzentrationen wurden durch entsprechendes Verdünnen der zuvor isolierten Neutrophilen mit einem Zellmedium erreicht. Das Zellmedium für die Roll-Versuche setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen, die alle abgewogen, vermischt und 20 Minuten lang gerührt wurden: 200 ml D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Low Glucose, without L-Glutamin; Invitrogen GmbH; Karlsruhe; Deutschland), 2 g (1%) BSA (Bovine Serum Albumin, PAA; Cölbe; Deutschland), 22,22 mg (1 mM) CaCl₂ (wasserfrei, MERCK; Darmstadt; Deutschland), 19,04 mg (1 mM) MgCl₂ (wasserfrei, MERCK; Darmstadt; Deutschland). Für alle

Flusskammerversuche wurden die Zellsuspensionen in 5 ml Spritzen (B.Braun) aufgezogen.

5.3 Mikroskopischer Arbeitsplatz

Der Arbeitsplatz ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

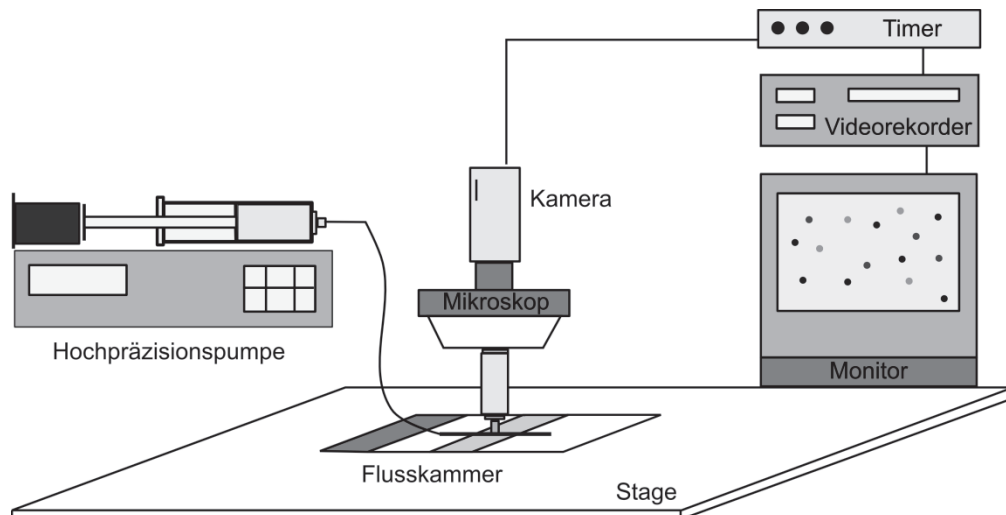


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Arbeitsplatzes. Die Flusskammern wurden auf dem Kreuztisch eines Mikroskops positioniert, welches mit einer Kamera, einem Monitor und einem Videorekorder verbunden war. Mit Hilfe eines Timers wurde außerdem der zeitliche Verlauf der Versuche dokumentiert. Eine Hochpräzisionspumpe ermöglichte die kontrollierte Perfusion der Flusskammern mit den zu untersuchenden Zellen.

Die zu untersuchende Flusskammer wurde auf dem Kreuztisch eines aufrechten Mikroskops, der in horizontaler und vertikaler Achse beweglich war, in einer Petrischale unter dem Objektiv positioniert. Das verwendete Mikroskop (Olympus, BX51; Hamburg; Deutschland) war über eine CCD-Kamera (Kappa®; Gleichen; Deutschland) mit einem Videorekorder (Panasonic; Japan) und einem Monitor (Sony; Japan) verbunden. So konnte die Kapillare durchleuchtet, auf einem Monitor sichtbar gemacht, und gleichzeitig die Versuche für die spätere offline Auswertung auf VHS-Kassetten aufgezeichnet werden. Für die Versuche wurde ein Wasser-Immersions-Objektiv (20x, NA 0,95; Olympus; Hamburg; Deutschland) verwendet. Zur Dokumentation von Aufnahmedatum, -zeit und Versuchsdauer war zusätzlich ein Videozeitgenerator (Video Timer, FOR.A Company limited; Japan) angeschlossen.

5.4 Perfusion der Flusskammern

Zur Perfusion der Flusskammer wurde eine Hochpräzisionspumpe (Harvard Apparatus; Holliston; March-Hugstetten; Deutschland) benutzt, mit der die Flussbedingungen für die Versuche kontrolliert wurden. Zum Fokussieren der Flusskammer wurde zwischen das Immersions-Objektiv und die zu untersuchende Kapillare ein Tropfen destilliertes Wasser gegeben. Der untersuchte Kapillarausschnitt wurde für alle Flusskammern einheitlich im Abstand von 1,2 bis 1,3 cm zum Pumpen-nahen Kapillarende gewählt. Nachdem die Spritze mit der Zellsuspension in den Einlaufschlauch gesteckt und in die Perfusionspumpe eingespannt worden war, wurde die Pumpe gestartet. Die Flussgeschwindigkeit wurde dabei mit 0,115 ml/min so gewählt, dass in der Flusskammer entsprechend den physiologischen Verhältnissen in postkapillären Venolen Scherkräfte von 1 bis 1,5 dyn/cm² herrschten (Smith *et al.*, 2004). Die Videoaufnahme wurde gleichzeitig gestartet und der Fluss in der Kapillare über 10 Minuten aufgezeichnet. Es wurden jeweils die beiden sich in der Mitte der Flusskammer befindenden (bezogen auf die Breite der Kapillare) Fields of View (FOV) für 30 Sekunden im Wechsel betrachtet. Sobald 10 Minuten abgelaufen waren, wurden Perfusion und Videoaufnahme gestoppt und die untersuchte Flusskammer durch eine neue ersetzt. Die Zellsuspension wurde vor der Verbindung der Spritze mit der neuen Flusskammer noch mehrfach geschwenkt, um die enthaltenen PMN wieder gleichmäßig zu verteilen.

5.5 Messmethoden und Messparameter

Die Auswertung der auf VHS-Kassetten aufgezeichneten Flusskammerversuche erfolgte an einem Monitor, welcher an einen Videorekorder angeschlossen war. Folgende Messparameter wurden anhand der Bildsequenzen erhoben:

1. Anzahl rollender PMN pro FOV
2. Rollgeschwindigkeit der Neutrophilen
3. Anzahl adhärenter PMN pro FOV

5.5.1 Rollen

Die quantitative Bestimmung des PMN-Rollens erfolgte durch Zählen aller rollenden Zellen, die im Verlauf von einer Minute in den beiden beobachteten FOVs zu beobachten waren. Daraus wurde die Anzahl rollender Neutrophiler pro FOV nach einer, drei, fünf, sieben und zehn Minuten errechnet.

5.5.2 Rollgeschwindigkeit

Die Rollgeschwindigkeit der neutrophilen Granulozyten wurde mit Hilfe einer Computer-Software wie zuvor beschrieben ermittelt (Pries & Gaehtgens, 1987). Einzelne rollende PMN wurden dabei auf nachfolgenden Videobildern markiert und ihre Verschiebung von Bild zu Bild ermittelt. Auf diese Weise konnte anhand der Distanz, welche ein Neutrophiler in einer Sekunde zurücklegte, seine Geschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$ errechnet werden. Die mittlere Rollgeschwindigkeit wurde nach Möglichkeit aus den Geschwindigkeiten von 20 PMN pro Flusskammerversuch bestimmt.

5.5.3 Adhäsion

Die Quantifizierung der Adhäsion erfolgte wie zuvor beschrieben (Frommhold *et al.*, 2010) durch Auszählen aller PMN, die im Bereich der beiden beobachteten FOVs über einen Zeitraum von mindestens 20 Sekunden adhären waren. Die Anzahl adhärenter Zellen wurde dabei jeweils nach einer, drei, fünf, sieben und zehn Minuten bestimmt.

5.6 Einfluss von Betamethason auf die PMN-Rekrutierung

Einige der in die Studie eingeschlossenen Schwangeren mit drohender Frühgeburt wurden pränatal zur Induktion der fetalen Lungenreifung mit dem Glukokortikoid Betamethason (Celestan® Depot, Essex Pharma GmbH, München, Deutschland) behandelt. Für Glukokortikoide ist ein hemmender Effekt auf das Leukozytenrollen, die -Adhäsion (Davenpeck *et al.*, 1998) und weitere Leukozytenfunktionen (Lazzarin *et al.*, 1984; Fuenfer *et al.*, 1987) beschrieben worden. Um einen Einfluss der maternalen Betamethason-Einnahme auf die Rekrutierung neonataler PMN in den Flusskammern auszuschließen, stellten wir weiterführende Untersuchungen an. Zum einen führten wir Flusskammerversuche mit dem Blut von drei gesunden adulten Spendern durch, das wir vor der PMN-Isolierung jeweils zur Hälfte für 30 Minuten mit $0,02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Betamethason (Celestan®, Essex Pharma) inkubierten. In den daraufhin durchgeführten Adhäsionskammern wurden die Interaktionen vorbehandelter und unbehandelter PMN dann quantifiziert und verglichen. Außerdem dokumentierten wir die mütterliche Celestan-Behandlung, um im Anschluss an die neonatalen Flusskammerversuche die Werte der Neugeborenen behandelter und unbehandelter Mütter zu vergleichen.

6 Durchflusszytometrie

Um quantitative Unterschiede bei der Expression relevanter Adhäsionsmoleküle als Ursache für ein verändertes Roll- und Adhäsionsverhalten zu prüfen, untersuchten wir die isolierten neonatalen und adulten PMN außerdem durchflusszytometrisch (FACSflow cytometer; BD; Heidelberg).

6.1 FACS-Antikörper

Für die Durchflusszytometrie wurden monoklonale Maus-Antikörper gegen die humanen Oberflächenmoleküle CD162 (PSGL-1), CD11a (LFA-1), CD11b (Mac-1) und CD182 (CXCR2) von der Firma BD PharMingen, Heidelberg, Deutschland, bezogen. Als Isotypkontrolle wurden unspezifische Kontroll-Antikörper von R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland verwendet. Ein sekundärer, Phycoerythrin-(PE)-Fluoreszenz-markierter Ziegen-anti-Maus-Antikörper der Firma BD PharMingen, Heidelberg, Deutschland, diente zur Fluoreszenzmarkierung der primären, nicht Fluoreszenz-markierten Antikörper.

6.2 Vorbereitung der Proben

Die unten genannten Waschvorgänge und die Verdünnung der Antikörper erfolgten mit einem Puffer, der aus PBS 1x (D-PBS; Invitrogen) und 2,5% BSA (PAA) hergestellt wurde. Im Anschluss an die PMN-Isolierung wurden jeweils 2 ml dieses Puffers zusammen mit etwa 200.000 Neutrophilen auf FACS-Röhrchen (BD) verteilt und 7 Minuten bei 1000 U/min (= 123 g) zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurden je 50 µl der primären Antikörper oder der Isotyp-Kontrolle in einer Konzentration von 5 µg/ml (CD162, CD11a, CD11b) bzw. 12,5 µg/ml (CD182) auf die Zellen gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Puffer gewaschen und nach Absaugen des Überstandes für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln mit jeweils 50 µl des sekundären Antikörpers (Konzentration: 5 µg/ml) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Verdünnen der Reagenzien mit jeweils 2 ml des FACS-Puffers und eine anschließende 7-minütige Zentrifugation der Röhrchen bei 1000 U/min (= 123 g) beendet. Nach Absaugen des Überstands wurden die Zellen mit 0,5% Paraformaldehyd (eigene Herstellung) in PBS 1x (D-PBS; Invitrogen) fixiert.

6.3 Messmethoden und Messparameter

Die Messungen erfolgten am FACSort Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Heidelberg). Für alle Proben wurden mindestens 10.000 Zellen analysiert. Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe der CELLQuest Software (Becton Dickinson) aufgearbeitet und graphisch dargestellt.

7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte EDV-gestützt mit SigmaStat 3.5 (Systat software company GmbH). Für den Vergleich mehrerer Gruppen wurde eine Kruskal-Wallis ANOVA on ranks durchgeführt, an die sich ein Student-Newman-Keuls oder Dunn's post hoc Test anschloss. Um auf eine nicht-lineare Korrelation zu testen, wurde der Spearman Korrelationskoeffizient berechnet. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte jeweils als Mittelwert \pm Standardfehler (Flusskammerversuche und FACS) bzw. Standardabweichung (Klinische Daten).

III ERGEBNISSE

1 Patienten

1.1 Klinische Daten

Insgesamt wurden 50 Neugeborene in die Studie eingeschlossen. Davon fielen 19 Neugeborene in die Gruppe 1 (mittleres Gestationsalter (GA) 27+4 SSW), 17 Neugeborene in die Gruppe 2 (mittleres GA 32+4 SSW) und 14 Neugeborene in die Gruppe 3 (mittleres GA 38+5 SSW). Außerdem spendeten 23 gesunde Freiwillige venöses Blut für die adulte Kontrollgruppe. Die Geschlechterverteilung konnte nicht beeinflusst werden, da alle im Versuchszeitraum geborenen und die Einschlusskriterien erfüllenden Neugeborenen in die Studie aufgenommen wurden. So fanden sich in den beiden Gruppen der Frühgeborenen mehr männliche Neugeborene (73,7% bzw. 64,7%). Das mittlere Geburtsgewicht der drei Gruppen unterschied sich, wie zu erwarten war, signifikant (1047 ± 245 g vs. 1833 ± 392 g vs. 3342 ± 461 g; $p < 0,05$).

Gruppe	GA	Männlich (%)	Geburtsgewicht (g)
FG ≤ 30. SSW , n = 19	27 4/7 ± 1 6/7 *	73,7	1047 ± 245 *
FG > 30. SSW , n = 17	32 4/7 ± 1 5/7 *	64,7	1833 ± 392 *
RG , n = 14	38 5/7 ± 1 1/7 *	50,0	3342 ± 461 *

Tabelle 1: Klinische Daten der Neugeborenen. Dargestellt sind das Gestationsalter (GA), der prozentuale Anteil des männlichen Geschlechts (Männlich), und das Geburtsgewicht der drei Versuchsgruppen (1. Gruppe: Frühgeborene ≤ 30. SSW, 2. Gruppe: Frühgeborene > 30. SSW, 3. Gruppe: Reifgeborene). Mittelwerte ± Standardabweichung. * $p < 0,05$ vs. der anderen beiden Gruppen.

1.2 Labordaten

Aus dem Nabelschnurblut der Neugeborenen wurden im Kliniklabor jeweils ein Differentialblutbild, das C-reaktive Protein (CRP), Interleukin-6 (IL-6) und der arterielle pH-Wert bestimmt. Bei den Frühgeborenen und bei Reifgeborenen mit klinischem Verdacht auf eine Infektion erfolgte innerhalb der ersten 48 Lebensstunden eine erneute Kontrolle der Entzündungsparameter. Da bei den Neugeborenen zum Teil

nur sehr kleine Blutvolumina gewonnen werden konnten, war es nicht möglich, bei allen Individuen alle Laborwerte zu bestimmen (genaue Anzahl s. Tabellen).

Die korrigierte Leukozytenzahl lag bei den reifen Neugeborenen signifikant höher als bei den Frühgeborenen ($15,1 \pm 6,1 \times 10^9/l$ vs. $6,8 \pm 1,5 \times 10^9/l$ bzw. $7,1 \pm 2,3 \times 10^9/l$; $p < 0,05$). Der prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten konnte aus oben genannten Gründen nur in Einzelfällen bestimmt werden, weshalb keine statistische Auswertung der Neutrophilenfraktionen durchgeführt wurde. Für den Hämatokrit zeigten sich in der Gruppe der Frühgeborenen ≤ 30 . SSW signifikant niedrigere Werte als bei den Reifgeborenen ($40,0\% \pm 8,0\%$ vs. $46,9\% \pm 4,6\%$; $p < 0,05$). Die Thrombozyten- und die Normoblastenzahlen unterschieden sich zwischen den Gruppen nicht.

Gruppe	Leukozyten ($\times 10^9/l$)	Neutrophile (%)	Normoblasten (/100 Leukos)	Hk (%)	Thrombozyten ($\times 10^9/l$)
FG ≤ 30. SSW	$7,1 \pm 2,3$ n = 16	$29,0 \pm 19,0$ n = 10	$18,9 \pm 14,1$ n = 16	$40,0 \pm 8,0$ [#] n = 16	$227,5 \pm 102,9$ n = 16
FG > 30. SSW	$6,8 \pm 1,5$ n = 14	$29,6 \pm 12,0$ n = 5	$13,0 \pm 10,4$ n = 14	$42,0 \pm 6,0$ n = 14	$221,0 \pm 44,3$ n = 14
RG	$15,1 \pm 6,1$ * n = 11	$45,2 \pm 12,8$ \$ n = 5	$4,8 \pm 2,2$ n = 5	$46,9 \pm 4,6$ n = 11	$266,3 \pm 36,3$ n = 11

Tabelle 2: Laborwerte aus dem Nabelschnurblut. Aus dem Nabelschnurblut wurden im Kliniklabor die Leukozytenzahl, der prozentuale Neutrophilen-Anteil, die Normoblasten (pro 100 Leukozyten), der Hämatokrit (Hk) und die Thrombozytenzahl bestimmt. Mittelwerte \pm Standardabweichung. * $p < 0,05$ vs. der anderen beiden Gruppen, # $p < 0,05$ vs. RG, \$ keine statistische Auswertung.

Das CRP im Nabelschnurblut lag bei allen drei Gruppen im Normbereich ($< 0,5$ mg/dl) und zeigte auch in den ersten 48 Lebensstunden bei den reifen Neugeborenen keine Änderung (siehe Tabelle 3). Am 1. Lebenstag wiesen jedoch 35% der Frühgeborenen ≤ 30 . SSW und 13% der moderaten Frühgeborenen, am 2. Lebenstag sogar 52% der extremen Frühgeborenen und 31% der Frühgeborenen > 30 . SSW ein erhöhtes CRP auf. Ein pathologisches IL-6 im Nabelschnurblut fand sich bei 8% der Reifgeborenen, bei 19% der Frühgeborenen > 30 . SSW und bei 12% der extremen Frühgeborenen. Der arterielle Nabelschnur-pH extremer Frühgeborener war im Vergleich zu den anderen Gruppen signifikant erniedrigt.

Gruppe	NS- CRP (mg/dl)	NS- IL-6 (pg/ml)	CRP 1.LT (mg/dl)	CRP 2.LT (mg/dl)	NS- pH
FG ≤ 30. SSW	< 0,5 n = 18	12% > 50 n = 18	35% > 0,5 n = 18	52% > 0,5 n = 18	7,26 ± 0,1 * n = 19
FG > 30. SSW	< 0,5 n = 16	19% > 50 n = 16	13% > 0,5 n = 16	31% > 0,5 n = 16	7,35 ± 0,0 n = 17
RG	< 0,5 n = 11	8% > 50 n = 12	< 0,5 n = 5	< 0,5 n = 5	7,33 ± 0,1 n = 14

Tabelle 3: Entzündungsparameter. Dargestellt sind die Entzündungsparameter CRP und IL-6 aus dem Nabelschnurblut (NS-) der drei Versuchsgruppen, sowie im peripheren Venenblut am 1. und 2. Lebenstag (LT); Außerdem wurde der pH aus dem Nabelarterienblut gemessen. Mittelwerte ± Standardabweichung. * $p < 0,05$ vs. der anderen beiden Gruppen.

2 PMN-Isolierung

Die PMN wurden bei Neugeborenen aus Nabelschnurblut und bei adulten Kontrollen aus peripher venösem Blut durch Dichtezentrifugation auf Ficoll und anschließender Erythrozytenlyse gewonnen. Die durchschnittliche Reinheit der Isolation erreichte 97% bei Erwachsenen, 89% bei Neugeborenen und 76% bei Frühgeborenen. Durch eine Färbung der isolierten neutrophilen Granulozyten mit Trypanblau prüften wir zusätzlich die Vitalität der Zellen nach dem Isolationsverfahren, die bei 97% Vitalität lag.

3 PMN-Rollen und -äsion in der Flusskammer

Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten von Frühgeborenen, Reifgeborenen und Erwachsenen wurde in unterschiedlich beschichteten Flusskammern bei einer Wandschubspannung von $\sim 1 \text{ dyn/cm}^2$ untersucht (= 0,115 ml/min). Je nach Zellausbeute wurden mit den PMN der einzelnen Neugeborenen bis zu zwei Flusskammerversuche pro Ansatz durchgeführt.

3.1 Rollen fetaler PMN

Das Rollverhalten der neutrophilen Granulozyten wurde in Flusskammern untersucht, die mit P- bzw. E-Selektin beschichtet waren. Durch Auszählen aller Zellen, die im Verlauf einer Minute in den beiden beobachteten FOVs rollten, wurde das PMN-Rollen quantifiziert. Daraus wurde die Anzahl rollender PMN pro FOV nach einer, drei, fünf,

sieben und zehn Minuten bestimmt. In P- oder E-Selektin Flusskammern, die mit PMN von Erwachsenen perfundiert wurden, beobachteten wir während der 10-minütigen Versuchszeit eine kontinuierliche Zunahme der Anzahl rollender Zellen (Abb. 8A und B). Verglichen mit adulten Kontrollen war das PMN-Rollen bei reifen Neugeborenen signifikant vermindert und bei Frühgeborenen noch stärker reduziert. Insbesondere zeigten neutrophile Granulozyten von extremen Frühgeborenen sowohl auf P-, als auch auf E-Selektin fast kein Rollen.

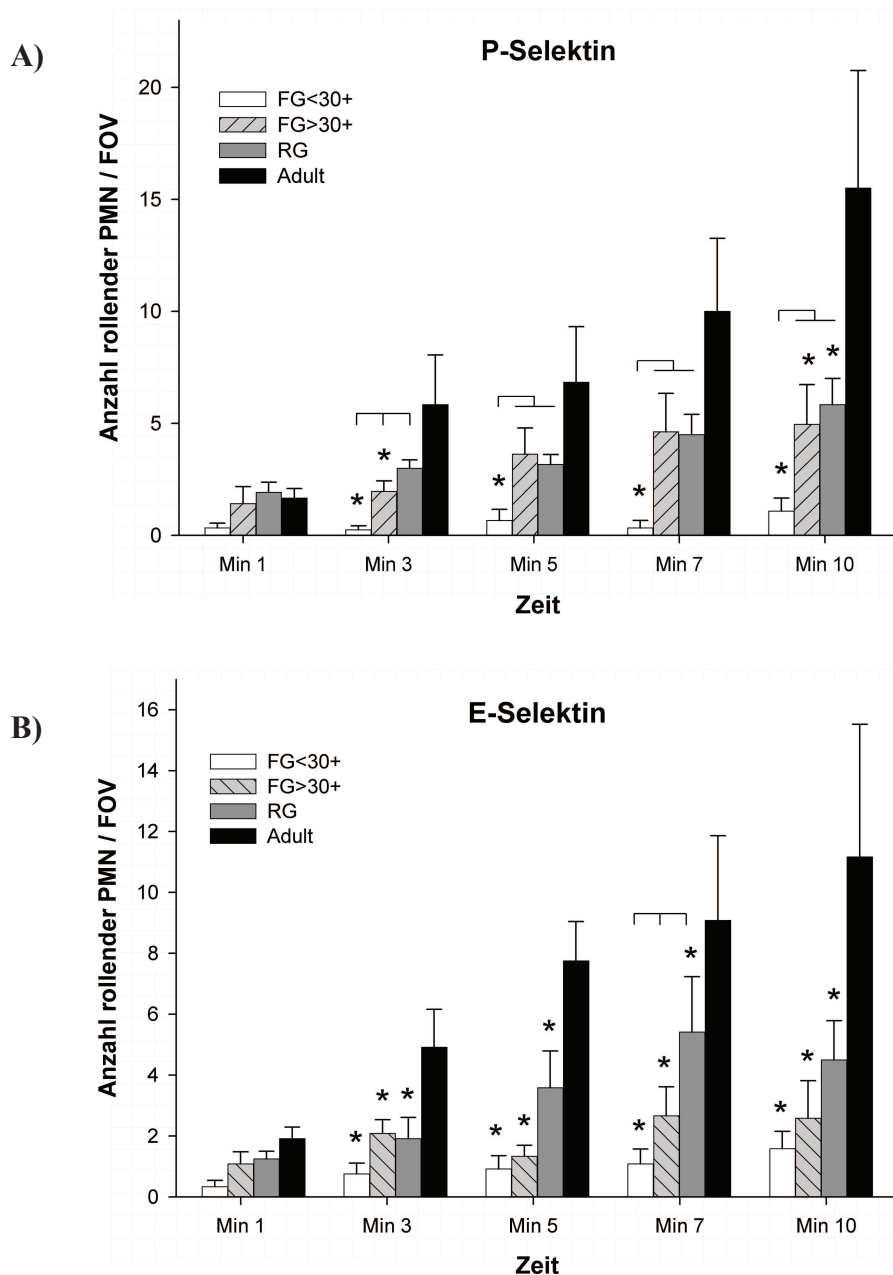


Abbildung 8: Roll-Flusskammern mit P- bzw. E-Selektin. Dargestellt ist die Anzahl rollender PMN pro FOV in mit P- (A) bzw. E-Selektin (B) beschichteten Flusskammern. $n = 6$ pro Gruppe. Das Rollen wurde in Minute (Min) 1, 3, 5, 7 und 10 in den folgenden Versuchsgruppen untersucht: Frühgeborene ≤ 30 . SSW (FG<30+), Frühgeborene > 30 . SSW (FG>30+), Reifgeborene (RG) und Erwachsene (Adult). * zeigt signifikante Unterschiede gegenüber der adulten Kontrollgruppe an, eckige Klammern weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen hin ($p < 0,05$). Mittelwerte \pm Standardfehler.

3.2 Mittlere Rollgeschwindigkeiten

Auch bei den Rollgeschwindigkeiten von PMN beobachteten wir Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 9). Mit Hilfe einer Computer-Software wurden die Rollgeschwindigkeiten durch Messung der Distanz, welche Neutrophile in einer Sekunde zurücklegten, ausgerechnet. Verglichen mit PMN von Erwachsenen und reifen Neugeborenen, welche ähnliche Rollgeschwindigkeiten aufwiesen, rollten die Zellen von moderaten Frühgeborenen signifikant langsamer auf P-Selektin (Adult: $7,3 \pm 1,5 \mu\text{m/s}$, Reifgeborene: $6,9 \pm 1,4 \mu\text{m/s}$, Frühgeborene: $3,4 \pm 0,8 \mu\text{m/s}$; $p < 0,05$) und E-Selektin (Adult: $3,6 \pm 0,4 \mu\text{m/s}$, Reifgeborene: $3,5 \pm 0,5 \mu\text{m/s}$, Frühgeborene: $2,3 \pm 0,2 \mu\text{m/s}$; $p < 0,05$). Da in der Gruppe der extremen Frühgeborenen insgesamt nur sehr wenige Zellen rollten, konnten wir für diese Neugeborenen keine verlässlichen Rollgeschwindigkeiten bestimmen.

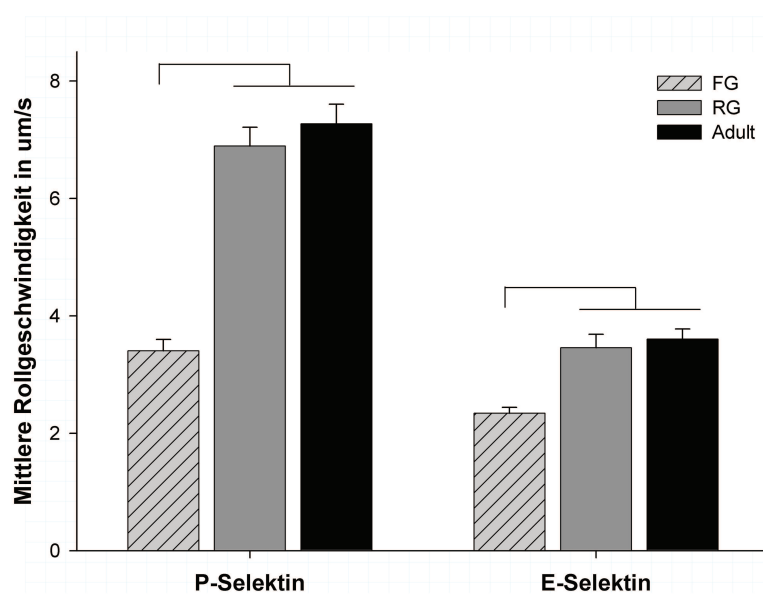


Abbildung 9: Mittlere Rollgeschwindigkeiten der PMN in Roll- Flusskammern. Dargestellt sind die mittleren Rollgeschwindigkeiten der PMN von Frühgeborenen > 30. SSW (FG), Reifgeborenen (RG) und Erwachsenen (Adult) in Roll-Flusskammern. $n = 6$. Eckige Klammern zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen an ($p < 0,05$). Mittelwerte \pm Standardfehler.

3.3 Adhäsion fetaler PMN

Als nächstes untersuchten wir die PMN-Adhäsion in Flusskammern, die mit einer Kombination von P- oder E-Selektin, dem CXCR2-Chemokin IL-8 und dem Integrinliganden ICAM-1 beschichtet waren. Die Quantifizierung erfolgte durch

Auszählen aller adhärenter PMN im Bereich eines FOV nach einer, drei, fünf, sieben und zehn Minuten (siehe Abb. 10 A und B).

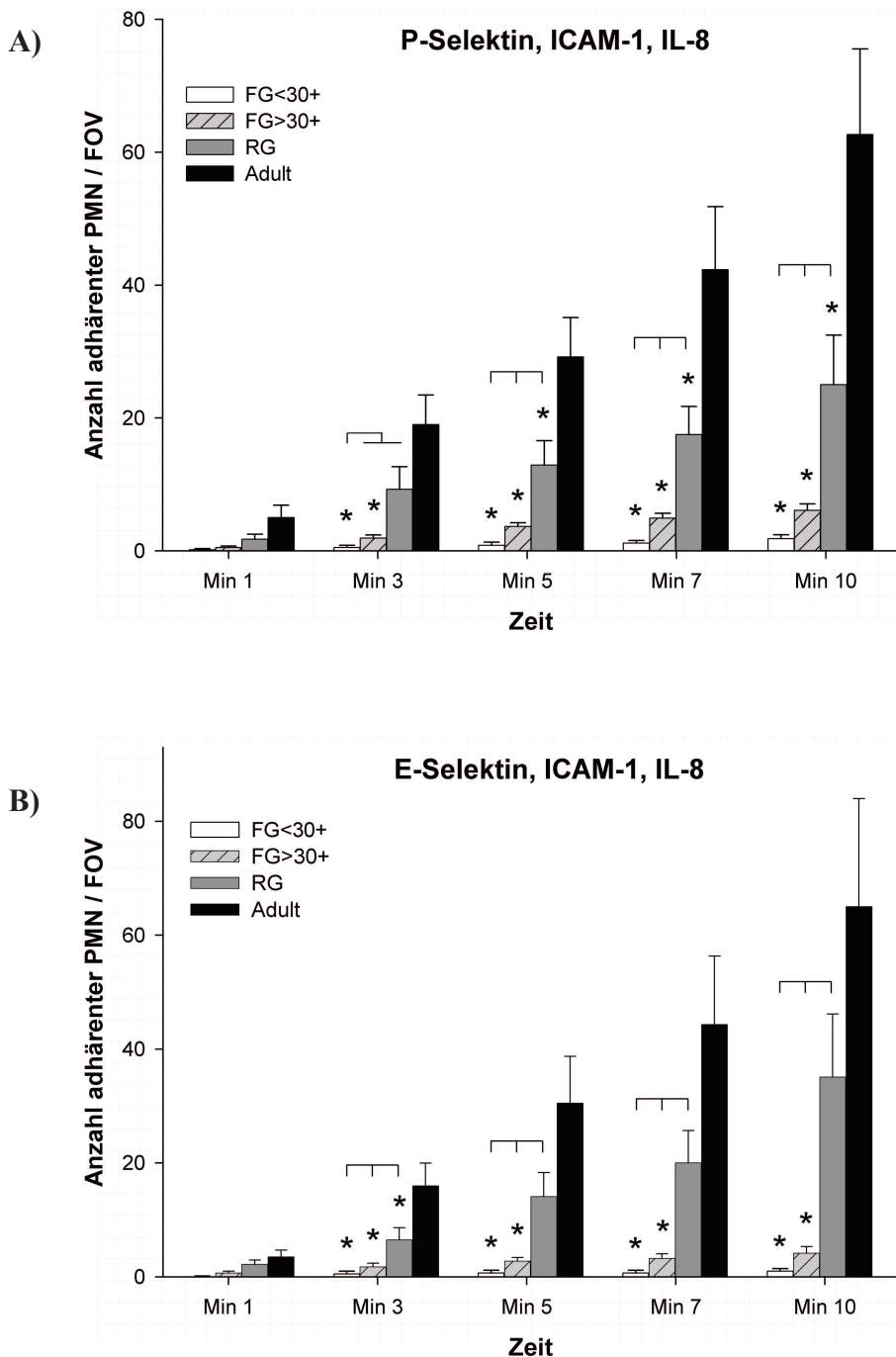


Abbildung 10: Adhäsion in Flusskammern mit P- bzw. E-Selektin, ICAM-1 und Interleukin-8. Dargestellt ist die Anzahl adhärenter PMN pro FOV in mit P-Selektin (A) bzw. E-Selektin (B), IL-8 und ICAM-1 beschichteten Flusskammern. $n = 6$ pro Gruppe. Die Adhärenz wurde in Minute (Min) 1, 3, 5, 7 und 10 in den folgenden Versuchsgruppen untersucht: Frühgeborene ≤ 30 . SSW (FG<30+), Frühgeborene > 30 . SSW (FG>30+), Reifgeborene (RG) und Erwachsene (Adult). * zeigt signifikante Unterschiede gegenüber der adulten Kontrollgruppe an, eckige Klammern weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen hin ($p < 0,05$). Mittelwerte \pm Standardfehler.

Wir konnten beobachten, dass die Fähigkeit neutrophiler Granulozyten unter Flussbedingungen zu adhären, sehr stark vom Gestationsalter der Neugeborenen abhängig war. Während Neutrophile extremer Frühgeborener im Laufe der 10-minütigen Perfusion fast keine Adhäsion zeigten, gab es in der Gruppe der moderaten Frühgeborenen wenige adhärenente Zellen. Einen weiteren signifikanten Anstieg in der Anzahl adhärenente Zellen sahen wir bei der Perfusion der Flusskammern mit PMN reifer Neugeborener, dennoch wurde das Niveau der adulten Kontrolle nicht erreicht.

3.4 Korrelation Adhärenz – Gestationsalter

Aufgrund der niedrigen Geburtenrate von Frühgeborenen wurden in den Flusskammerversuchen jeweils nur zwei Gruppen von Frühgeborenen unterschiedlichen Gestationsalters verglichen. Deshalb untersuchten wir weiterhin, inwiefern die Anzahl adhärenente PMN in der Flusskammer nach 10 Minuten mit dem Gestationsalter der Neugeborenen korreliert (siehe Abb.11).

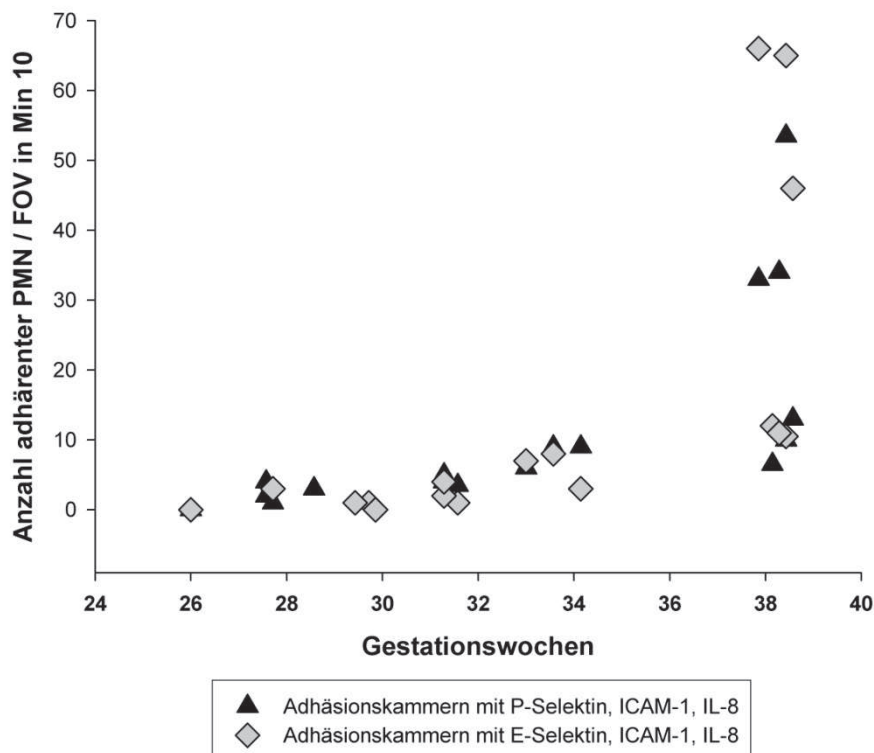


Abbildung 11: Korrelation von Adhärenz und Gestationsalter. Aufgetragen ist die Anzahl adhärenente PMN pro FOV in Minute 10 in Abhängigkeit vom Gestationsalter der Neugeborenen. Die Adhäsion wurde in mit P- bzw. E-Selektin, IL-8 und ICAM-1 beschichteten Flusskammern untersucht. Für beide Ansätze korrelierte die Adhäsion signifikant mit dem Gestationsalter der Kinder ($r = 0,9$ bzw. $0,84$, $p < 0,01$). $n = 18$

Für beide Ansätze zeigte sich eine signifikante Korrelation mit dem Gestationsalter (Spearman-Korrelationskoeffizient $r = 0,9$ bzw. $0,84$, $p < 0,01$), d.h. je höher das Gestationsalter und damit je reifer die Neugeborenen waren, desto mehr PMN waren nach 10 Minuten adhären.

3.5 Kontroll-Flusskammern

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Interaktionen in den Flusskammern für die jeweils eingesetzten Proteine spezifisch waren, wurden verschiedene Kontroll-Flusskammern durchgeführt (siehe Abb. 12). In Kapillaren, die nur mit PBS inkubiert wurden, zeigte sich keinerlei Adhärenz bei der Perfusion mit adulten PMN ($n = 3$). Die Notwendigkeit von Selektinen bzw. Selektin-abhängigem Rollen für die Vermittlung der Adhäsion wurde in Flusskammern untersucht, deren Kapillaren nur mit ICAM-1 und IL-8 beschichtet waren ($n = 2$). Auch hier wurden keine Interaktionen mit der Kapillarwand beobachtet. Durch Weglassen des Chemokins IL-8 konnte die Adhäsion ebenso deutlich reduziert werden ($n = 3$). Weiterhin wurde die Abhängigkeit des Selektin-vermittelten PMN-Rollens und der Integrin-vermittelten Adhäsion vom Vorhandensein der Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} geprüft. Die Zugabe des Komplexbildners EDTA in das Zellmedium hatte eine komplette Blockierung der PMN-Interaktionen mit der Kapillarwand zur Folge ($n = 2$).

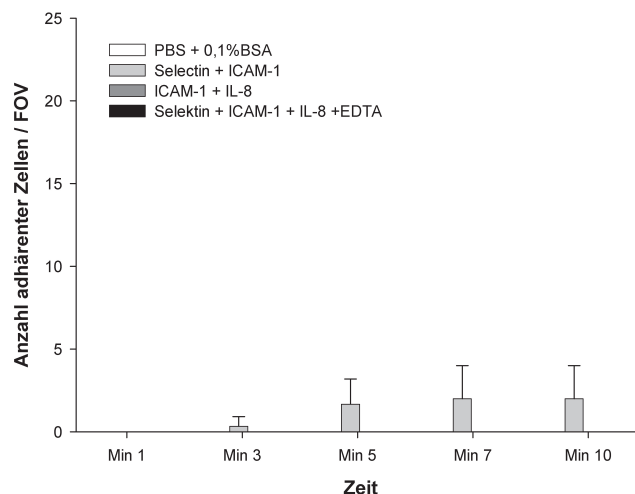


Abbildung 12: Kontroll-Flusskammern. Zum Ausschluss unspezifischer Interaktionen wurden verschiedene Kontroll-Kammern eingesetzt. Hier zeigte sich keinerlei Adhärenz (Kammern mit PBS + 0,1% BSA/ ohne Selektin/ mit Zugabe von EDTA) bzw. nur geringe Adhärenz (Kammern ohne IL-8). $n = 2-3$. Mittelwerte \pm Standardfehler.

4 Betamethason

Die Schwangeren mit drohender Frühgeburt erhielten zur Induktion der fetalen Lungenreife pränatal das Medikament Betamethason. Da für Glukokortikoide ein hemmender Einfluss auf das Leukozytenrollen und die -Adhäsion bekannt ist (Davenpeck *et al.*, 1998), dokumentierten wir die Betamethason-Einnahme der Schwangeren innerhalb der letzten 14 Tage vor der Geburt (siehe Tabelle 4), um im Anschluss an die Flusskammerversuche die Werte der Neugeborenen von pränatal behandelten und unbehandelten Schwangeren zu vergleichen. Aufgrund der zum Teil sehr kleinen Gruppengrößen wurde keine statistische Auswertung der Daten vorgenommen, in einer Gegenüberstellung der Ergebnisse ließ sich jedoch kein einheitlicher Effekt der Betamethason-Behandlung auf das Roll- und Adhäsionsverhalten neonataler PMN in Flusskammern erkennen (Daten nicht dargestellt).

Gruppe	Betamethason erhalten (%)	Anzahl Betamethason-Gaben	Letzte Gabe (Tage vor Geburt)
≤ 30. SSW, n = 19	94,8	1,7 ± 0,7	3,3 ± 4,4
> 30. SSW, n = 17	76,5	1,5 ± 0,5	13,5 ± 17,5

Tabelle 4: Betamethason-Einnahme der Schwangeren. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Neugeborenen von Müttern, welche pränatal zur Lungenreifeinduktion das Medikament Celestan® (Inhaltsstoff Betamethason, Essex Pharma) erhalten hatten. Außerdem wird die Anzahl der Celestan-Gaben sowie der Zeitpunkt der letzten Celestan-Gabe vor der Geburt gezeigt. Es werden die beiden Versuchsgruppen der Frühgeborenen ≤ 30. SSW bzw. > 30. SSW unterschieden. Mittelwerte ± Standardabweichung.

In einem nächsten Schritt untersuchten wir den Einfluss von Betamethason auf die PMN-Adhäsion in Flusskammern, indem wir das venöse Blut adulter Spender vor der PMN-Isolierung 30 Minuten lang mit Betamethason inkubierten. Es zeigte sich auch hier kein signifikanter Unterschied in der Anzahl adhärenter Neutrophiler verglichen mit unbehandelten Zellen (siehe Abb. 13).

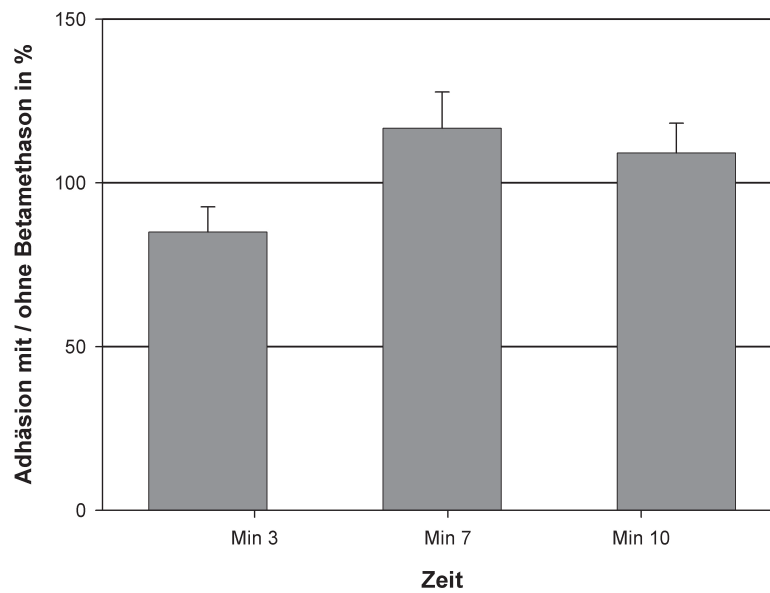


Abbildung 13: Einfluss von Betamethason auf die PMN-Adhäsion in Flusskammern. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Adhärenz adulter PMN mit Betamethason-Vorbehandlung an der Adhärenz adulter PMN ohne Vorbehandlung (= 100%) \pm Standardfehler in den Minuten (Min) 3, 7 und 10; $n = 3$.

5 Ergebnisse der Durchflusszytometrie

Aufgrund der beobachteten altersabhängigen Unterschiede bei der PMN-Rekrutierung untersuchten wir in einem nächsten Schritt die Expression der Oberflächenmoleküle PSGL-1, CXCR2, Mac-1 und LFA-1 auf den isolierten neutrophilen Granulozyten mittels Durchflusszytometrie (siehe Abb. 14). Während sich für die CXCR2- und die LFA-1-Expression keine Unterschiede zwischen den vier Gruppen ergaben, zeigte sich bei der Expression von PSGL-1 und Mac-1 eine zu den Flusskammerversuchen analoge Staffelung zwischen den Gruppen. Die PSGL-1-Oberflächenexpression auf adulten Zellen war signifikant höher als die Expression auf PMN reifer Neugeborener, Frühgeborener > 30. SSW und extremer Frühgeborener (MFI: $240,0 \pm 25,0$ (Adult) vs. $154,2 \pm 26,0$ (reife NG) bzw. $102,7 \pm 13,9$ (FG > 30. SSW) bzw. $82,3 \pm 17,8$ (FG \leq 30. SSW); $p < 0,05$). Die Mac-1 Expression verhielt sich ähnlich (MFI: $242,6 \pm 67,5$ (Adult) vs. $112,6 \pm 27,4$ (reife NG) bzw. $35,3 \pm 4,2$ (FG > 30. SSW) bzw. $82,6 \pm 17,8$ (FG \leq 30. SSW); $p < 0,05$).

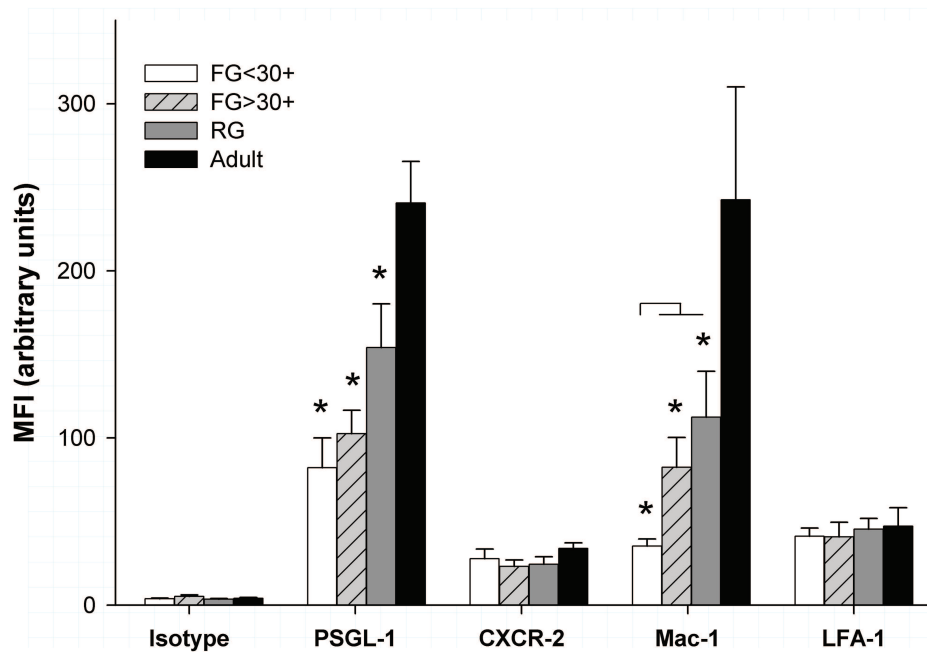


Abbildung 14: Durchflusszytometrische Messung der Expression von PSGL-1, CXCR2, Mac-1 und LFA-1 auf PMN. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI, arbitrary units) analog zur Oberflächenexpression von PSGL-1, CXCR-2, Mac-1, LFA-1 und der Isotyp-Kontrolle auf den PMN der vier Versuchsgruppen: Frühgeborene ≤ 30 . SSW (FG<30+), Frühgeborene > 30 . SSW (FG>30+), Reifgeborene (RG) und Erwachsene (Adult). * zeigt signifikante Unterschiede gegenüber der adulten Kontrollgruppe an, eckige Klammern weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen hin ($p < 0,05$). $n = 6$ für die Isotyp-Kontrolle und PSGL-1, $n = 5$ für CXCR2, Mac-1 und LFA-1. Mittelwerte \pm Standardfehler.

IV DISKUSSION

1 Diskussion der Methodik

1.1 PMN-Isolierung mit Ficoll

Ziel dieser Arbeit war es, die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten bei Frühgeborenen und reifen Neugeborenen zu untersuchen. Um eine Fokussierung auf die neutrophilen Granulozyten zu ermöglichen und dabei eine einheitliche PMN-Konzentration in den Flusskammern zu gewährleisten, wurden diese Zellen zunächst aus Vollblut isoliert und entsprechend ihrer Reinheit auf eine standardisierte Konzentration gebracht. Die PMN-Isolierung erfolgte wie zuvor beschrieben mittels Dichtezentrifugation auf Ficoll und anschließender Erythrozytenlyse (Quinn *et al.*, 2007). In zahlreichen Voruntersuchungen konnten mit diesem Isolationsverfahren vitale und funktionell aktive Granulozyten mit hoher Ausbeute und Reinheit gewonnen werden (Glasser & Fiederlein, 1990; Venaille *et al.*, 1994). Im Gegensatz zu anderen Isolationsverfahren wie der magnetischen Selektion von Antikörper-markierten PMN (Zahler *et al.*, 1997) stellt die Dichtezentrifugation eine kostengünstige und einfach durchzuführende Methode dar. Ein häufig geäußerter Kritikpunkt an der PMN-Isolierung ist die Hochregulierung der leukozytären Oberflächenrezeptoren Mac-1 und LFA-1 im Sinne einer Zellaktivierung (Macey *et al.*, 1995; Pallister *et al.*, 2006). Da in unserer Fragstellung aber eine Entzündungssituation simuliert wurde, in der neutrophile Granulozyten aktiviert werden und vermehrt Adhäsionsmoleküle exprimieren, wirkte sich dieser Effekt nicht nachteilig auf unser Modell aus. Darüber hinaus wurden die untersuchten Zellen in allen Gruppen auf dieselbe Weise isoliert und unterlagen damit gleichermaßen einer möglichen Beeinflussung durch das Isolationsverfahren. Um dennoch auszuschließen, dass durch die Isolierung vorzeitig aktivierte PMN unspezifische Bindungen mit der Kapillarwand eingingen, führten wir einige Kontrollexperimente in unbeschichteten Flusskammern durch, in denen wir keine wesentlichen Interaktionen mit der Kapillarwand beobachten konnten. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass die Adhäsion in beschichteten Flusskammern nicht in größerem Maße auf unspezifische Bindungen aktivierter PMN zurückzuführen ist. Weiterhin kann kritisiert werden, dass der Einfluss anderer Komponenten des Vollblutes, welche *in vivo* am Rekrutierungsprozess beteiligt sind, durch die PMN-

Isolierung außer Acht gelassen wird. Beispielsweise wird das PMN-Einfangen normalerweise durch die Anwesenheit fließender Erythrozyten begünstigt (Melder *et al.*, 2000), welche die Granulozyten an den Gefäßrand drängen. Trotz dieser Einschränkung funktionierte die PMN-Rekrutierung in den Flusskammern bei adulten, immunkompetenten Granulozyten jedoch sehr gut, so dass das Modell zur Klärung unserer Fragestellung gut geeignet ist.

1.2 Flusskammermodell

Bisherige Studien zur PMN-Rekrutierung humaner Feten haben sich häufig auf Messungen der Expression von Adhäsionsmolekülen anhand statischer Methoden wie ELISA oder Durchflusszytometrie beschränkt (Carr *et al.*, 1992; Rebuck *et al.*, 1995; McEvoy *et al.*, 1996). In einem ebenso verbreiteten Ansatz wurden Leukozyten auf beschichtete Deckgläser oder HUVEC Monolayer pipettiert, um nach Absinken der Zellen ihre Adhärenz an diese Oberflächen zu bestimmen (Anderson *et al.*, 1990; Carr *et al.*, 1992). Die Vorzüge der genannten Methoden sind in der einfachen Durchführbarkeit und der Kostengünstigkeit des benötigten Materials zu sehen. Mit der reinen Messung von Adhäsionsmolekülen mittels Durchflusszytometrie oder ELISA können jedoch nur quantitative Aussagen gemacht werden, ohne die Funktionalität zu beurteilen. Ein weiterer Nachteil dieser statischen Modelle ist die fehlende Berücksichtigung rheologischer Faktoren, welche *in vivo* und *in vitro* einen großen Einfluss auf die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten haben (Zarbock & Ley, 2009). Die Ergebnisse dieser Studien sind deshalb nur eingeschränkt auf die physiologischen Verhältnisse übertragbar.

Um derartige Probleme zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Studie eine von Sperandio *et al.* vorgeschlagene Modifikation (Sperandio *et al.*, 2006a) des von Smith *et al.* publizierten Flusskammermodells (Smith *et al.*, 2004) eingesetzt. Dieser Flusskammer-Assay bietet die Möglichkeit, die Hämodynamik postkapillärer Venolen, in denen die PMN-Rekrutierung normalerweise stattfindet, durch kontrollierte Flussbedingungen zu simulieren (Lawrence, 2001). Die Flussgeschwindigkeit wurde dabei mit 0,115 ml/min so gewählt, dass in den Flusskammern entsprechend den physiologischen Verhältnissen in postkapillären Venolen Wandschubspannungen von $\sim 1-1,5 \text{ dyn/cm}^2$ herrschten (Smith *et al.*, 2004). Durch die einheitliche Festlegung der Flussbedingungen wurde die Reproduzierbarkeit der Experimente gewährleistet und verschiedene Versuchsgruppen konnten miteinander verglichen werden. Zudem

ermöglichte das Modell die separate Untersuchung einzelner Schritte der PMN-Rekrutierungskaskade durch unterschiedliche Kombinationen der für die Beschichtung gewählten Proteine. Die einfache Handhabung und das geringe Totraumvolumen des von uns verwendeten Flusskammersystems stellen weiterhin Vorzüge gegenüber anderen kommerziell erhältlichen Flusskammersystemen, wie beispielsweise dem häufig eingesetzten Parallel Plate Flow Chamber System dar, das große Probenvolumina benötigt (Lawrence *et al.*, 1987).

Doch trotz dieser Vorteile weisen die Flusskammern auch einige Unterschiede zu echten Blutgefäßen auf: die Kammergeometrie und die Schwerkraft begünstigen eine mit der Dauer des Versuchs und der Entfernung vom Einlaufschlauch zunehmende Akkumulation rollender und adhärenter Zellen. Um die Vergleichbarkeit der Experimente zu garantieren, wählten wir somit für die Position des Mikroskop-Objektivs einen einheitlichen Abstand vom Kapillarbeginn. Darüber hinaus ist es schwierig einzuschätzen, ob die Adhäsionsmoleküle gleichmäßig in den Flusskammern verteilt wurden. Mögliche lokale Schwankungen der Rezeptordichte wurden berücksichtigt, indem wir in jeder Flusskammer mehrere FOVs beobachteten und daraus die mittlere Anzahl rollender bzw. adhärenter Zellen pro FOV errechneten. Zusammenfassend ist das in der vorliegenden Studie verwendete Flusskammermodell ein in der Literatur vielfach beschriebenes und validiertes Modell, welches die Analyse des leukozytären Rekrutierungsprozesses unter standardisierten Bedingungen erlaubt und deshalb hervorragend dazu geeignet ist, die eingangs formulierte Fragestellung zu bearbeiten.

1.3 Offline Videobildanalyse

Das PMN-Rollen, die Rollgeschwindigkeiten und die Adhäsion wurden mittels offline Analyse der Videoaufzeichnungen quantifiziert. Die dafür verwendete Auswertungsmethode ist seit langer Zeit in unserer Arbeitsgruppe etabliert und wurde auch in aktuellen Studien eingesetzt (Moser *et al.*, 2009; Frommhold *et al.*, 2010). Da es sich um eine manuelle Methode handelt, ist sie für untersucherabhängige systematische Fehler anfällig. Nachdem jedoch alle Auswertungen von derselben Person durchgeführt wurden, sind die beschriebenen Gruppen-Unterschiede der PMN-Rekrutierung eher nicht auf eine inter-Rater Variabilität zurückzuführen. Eventuelle systematische Fehler der auswertenden Person würden in diesem Modell, in dem ein Gruppenvergleich und nicht die Bestimmung absoluter Werte im Vordergrund stand, außerdem nicht ins

Gewicht fallen. Systematische Fehler könnten zwar generell durch den Einsatz von Computer-gestützten automatischen Auswertungsprogrammen vermieden werden, welche die leukozytären Interaktionen objektiv analysieren (Rao *et al.*, 2002; Mangan *et al.*, 2005). Da die Genauigkeit dieser Algorithmen aber stark von der Bildqualität abhängt (Sperandio *et al.*, 2006a) und die Preise solcher Programme immer noch sehr hoch sind, hat sich ihre Verwendung bisher nicht durchgesetzt.

2 Diskussion der Ergebnisse

2.1 Klinische Daten und Laborwerte

Die in der vorliegenden Studie untersuchten neutrophilen Granulozyten wurden aus dem Nabelschnurblut von Neugeborenen verschiedener Gestationsaltersstufen gewonnen. Um die Repräsentativität dieser Neugeborenen für ihre jeweiligen Altersgruppen zu prüfen, wurden einige klinische Daten und Laborwerte erfasst. Nach Übertragen auf Standard-Perzentilenkurven für Neugeborene (Roos R. *et al.*, 2003) lag das mittlere Geburtsgewicht im Verhältnis zum mittleren Gestationsalter in allen Gruppen zwischen der 50. und 75. Perzentile. Während die Geschlechter bei den reifen Neugeborenen gleichmäßig verteilt waren, dominierte in den Gruppen der Frühgeborenen (Frühgeborene ≤ 30 . SSW bzw. > 30 . SSW) das männliche Geschlecht. Aufgrund fehlender Daten zu geschlechterspezifischen Unterschieden der PMN-Rekrutierung kann der Einfluss dieser ungleichen Verteilung auf die Studienergebnisse an dieser Stelle zwar nicht sicher beurteilt werden. Da die Analyse nur männlicher Neugeborener jedoch vergleichbare Ergebnisse ergab (Daten nicht gezeigt) kann vermutet werden, dass die Studienergebnisse durch die ungleichmäßige Geschlechterverteilung nicht wesentlich beeinflusst wurden. Aus dem Nabelschnurblut der Neugeborenen wurden im Kliniklabor je ein Blutbild, ein Differentialblutbild, der arterielle pH-Wert sowie die Entzündungsparameter CRP und IL-6 bestimmt. Die Leukozytenzahl und der prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten nehmen bekanntlich im Verlauf der Gestation kontinuierlich zu (Maheshwari A. & Christensen R.D., 2005) und waren demzufolge im Nabelschnurblut der von uns untersuchten Frühgeborenen deutlich niedriger als bei reifen Neugeborenen. Auch die Thrombozytenzahl, die Normoblasten und der Hämatokrit stimmten mit den altersentsprechenden Normwerten (Ohls R.K., 2005) überein. Der mittlere arterielle pH-Wert entsprach zwar in allen Gruppen dem Referenzbereich, doch die extremen

Frühgeborenen wiesen deutlich niedrigere Werte auf als die anderen beiden Gruppen. Dies kann durch den unterschiedlich hohen Einfluss von pränatalem Stress auf die Neugeborenen erklärt werden: Während der Geburtsmodus bei allen reifen Neugeborenen eine elektive Sectio cesarea war, gingen der Entscheidung zur frühzeitigen Sectio bei allen extremen Frühgeborenen vorzeitige Wehen oder andere für die Feten mit intrauterinem Stress verbundene Situationen voraus. Dieser intrauterine Stress äußerte sich in einem Abfall der arteriellen Nabelschnur-pH-Werte. Im Allgemeinen hängt die PMN-Funktion vom pH-Wert des umgebenden Milieus ab (Trevani *et al.*, 1999). Da wir die Neutrophilen für unsere Versuchsreihe jedoch isolierten und in ein Zellmedium mit einheitlichem, physiologischen pH-Wert brachten, kann davon ausgegangen werden, dass die unterschiedlich hohen Nabelschnur-pH-Werte der Neugeborenen keine Auswirkungen auf die Studienergebnisse hatten.

Das Akute-Phase-Protein CRP und das Zytokin IL-6 sind im klinischen Alltag wichtige Indikatoren für bakterielle Infektionen von Neugeborenen. Während das IL-6 bereits bis zu zwei Tage vor der Entwicklung klinischer Symptome erhöht sein kann und damit einen Frühmarker für Infektionen darstellt, steigt das CRP erst mit zeitlicher Verzögerung an (Kuster *et al.*, 1998; Rego *et al.*, 2010). Bei intrauterinen Infektionen, die zu den häufigsten Ursachen für Frühgeburtlichkeit zählen, zeigen sich dementsprechend normalerweise bereits deutlich erhöhte IL-6-Werte im Nabelschnurblut (Krueger *et al.*, 2001), während das CRP im Nabelschnurblut unter Umständen noch negativ sein kann (Rego *et al.*, 2010). In der vorliegenden Studie lagen die CRP-Werte im Nabelschnurblut bei allen Neugeborenen im Normbereich. Die IL-6-Spiegel waren bei den meisten Neugeborenen ebenfalls negativ bzw. nur moderat erhöht, so dass davon ausgegangen werden kann, dass zum Zeitpunkt der Probengewinnung bei keinem der Feten eine massive intrauterine Infektion vorlag. Während die Werte reifer Neugeborener auch im weiteren Verlauf unauffällig waren, entwickelten knapp ein Drittel der moderaten und sogar 52% der extremen Frühgeborenen in den ersten zwei Lebenstagen erhöhte Entzündungsparameter. Diese Beobachtungen passen zu Voruntersuchungen, in denen eine positive Korrelation der Sepsisrate mit dem Gestationsalter von Neugeborenen gezeigt wurde (Bayerische Arbeitsgemeinschaft für Qualitätssicherung in der stationären Versorgung, 2010). Somit kann angenommen werden, dass die in unsere Studie eingeschlossenen Neugeborenen für ihre Alterskollektive repräsentativ waren.

2.2 PMN-Rekrutierung bei Neonaten in Abhängigkeit vom Gestationsalter

Vor dem Hintergrund der hohen Infektanfälligkeit Frühgeborener wurde in der vorliegenden Studie die für die Immunabwehr bakterieller Infektionen essentielle Rekrutierung neutrophiler Granulozyten im Verlauf der fetalen Entwicklung untersucht. Für extreme Frühgeborene (≤ 30 . SSW) zeigte sich unter Flussbedingungen eine beinahe komplette Abwesenheit von PMN-Rollen und -Adhäsion. Mit steigendem Gestationsalter verbesserte sich die PMN-Rekrutierung der Neugeborenen stetig. Dennoch erreichten in unserem Versuchsaufbau auch reife Neugeborene nicht das Niveau von adulten Kontrollen. Diese Beobachtungen stehen mit Voruntersuchungen im Einklang, in denen Unterschiede zwischen der Funktion neutrophiler Granulozyten von reifen Neugeborenen und Frühgeborenen verglichen mit Erwachsenen aufgedeckt wurden (Urlichs & Speer C.P., 2004).

Über Auffälligkeiten der PMN-Adhäsion und -Migration bei Früh- und Neugeborenen wurde in der Vergangenheit schon berichtet. Die meisten Publikationen stammen aus den 1980er und frühen 1990er Jahren (Anderson *et al.*, 1981; Bektas *et al.*, 1990; Carr *et al.*, 1992). Bezüglich der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten in Richtung verschiedener Substanzen wie Zymosan, Casein oder fMLP zeigten diese Studien bei Frühgeborenen deutliche Einschränkungen verglichen mit Erwachsenen auf. Die Beobachtungen zur Adhäsion neonataler PMN waren dagegen kontrovers: Während Bektas *et al.* passend zu den Ergebnissen unserer Studie über eine verminderte Adhärenz neutrophiler Granulozyten von Frühgeborenen berichteten, sahen Anderson *et al.* bei der Adhärenz unstimulierter Neutrophiler von Früh- bzw. Neugeborenen und Erwachsenen keine Unterschiede. Nach chemotaktischer Stimulation der PMN mit fMLP waren die Zellen Früh- bzw. Neugeborener ebenfalls kaum in der Lage, ihre Adhärenz zu steigern. Im Gegensatz dazu stehen die Beobachtungen der Arbeitsgruppe um Carr, die eine Hyperadhärenz unstimulierter PMN von Früh- und Reifgeborenen an HUVEC Monolayer sahen. Verglichen mit adulten PMN ließ sich die Adhärenz neonataler Granulozyten durch chemotaktische Stimulation allerdings kaum weiter steigern. Die Widersprüchlichkeit dieser Aussagen ist vermutlich auf methodische Unterschiede zurückzuführen, denn die PMN der Neugeborenen wurden in den genannten Studien zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen (Nabelschnurblut vs. periphere Venenpunktion am 1.-4. Lebenstag) und in verschiedenen Modellen untersucht. Da die PMN-Adhäsion in diesen Modellen außerdem nur unter statischen Bedingungen analysiert wurde, obwohl sie bekanntlich einem deutlichen Einfluss von

Scherkräften unterliegt (Zarbock & Ley, 2009), müssen die Ergebnisse vorsichtig interpretiert werden. Unter Flussbedingungen wurde die Adhäsion neutrophiler Granulozyten bisher nur bei reifen Neugeborenen untersucht, ohne mögliche ontogenetische Unterschiede zu berücksichtigen (Anderson *et al.*, 1991; Mariscalco *et al.*, 1998). Hier zeigten sich bei den Neugeborenen deutliche Einschränkungen verglichen mit adulten Kontrollen.

Das Leukozyten-Einfangen und -Rollen wird unter Flussbedingungen durch Selektin-Selektinliganden Interaktionen vermittelt (Lawrence & Springer, 1991; Lawrence *et al.*, 1997). Wir beobachteten, dass die Fähigkeit neutrophiler Granulozyten auf immobilisiertem P- oder E-Selektin zu rollen, bei extremen Frühgeborenen stark vermindert ist und sich mit zunehmendem Reifegrad der Neugeborenen stetig verbessert. Eine Beeinträchtigung des PMN-Rollens auf P- oder E-Selektin Monolayern und Histamin- oder IL-1-stimulierten HUVEC war zuvor für reife Neugeborene beschrieben worden (Abbassi *et al.*, 1993; Mariscalco *et al.*, 1998). Bezüglich der Rollgeschwindigkeiten konnten diese Studien keinen Unterschied zwischen reifen Neugeborenen und adulten Kontrollen feststellen. Dies ist im Einklang mit unseren Experimenten, welche gleiche Rollgeschwindigkeiten bei Neutrophilen von reifen Neugeborenen und Erwachsenen aufzeigten. Die PMN von Frühgeborenen rollten dagegen in unserem Modell signifikant langsamer auf P- und E-Selektin. Ähnliche Beobachtungen machten Mariscalco *et al.* bei neugeborenen Kaninchen, deren Leukozyten in inflammatorisch veränderten Mesenterialvenen verglichen mit adulten Tieren eine signifikant niedrigere Rollgeschwindigkeit aufwiesen (Mariscalco *et al.*, 2002). Die Ursache für diese verminderte Rollgeschwindigkeit ist unklar. Während des Rollens werden leukozytäre Integrine durch Selektine und Chemokine aktiviert, was sich in Konformationsänderungen äußert. Während Integrine in einem intermediären Aktivitätsstatus eine Reduktion der Rollgeschwindigkeit vermitteln, ist für die feste Adhäsion eine komplette Aktivierung nötig (Zarbock & Ley, 2009). Möglicherweise ist bei PMN Frühgeborener dieser Übergang von einem intermediären in den kompletten Aktivitätsstatus gestört, so dass die rollenden Neutrophilen zwar ihre Geschwindigkeit verlangsamen, aber nicht adhären können. Dies könnte erklären, warum die mittlere Rollgeschwindigkeit bei Frühgeborenen niedriger als bei reifen Neugeborenen und Erwachsenen ist. Es ist außerdem bekannt, dass die PMN-Rollgeschwindigkeit durch die enzymatische Abspaltung von aktiviertem L-Selektin (= L-Selektin-Shedding) von der Leukozytenoberfläche reguliert wird. Durch eine Blockierung des L-Selektin-

Sheddings konnte in Voruntersuchungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Reduktion der Leukozyten-Rollgeschwindigkeit induziert werden (Walcheck *et al.*, 1996; Sperandio *et al.*, 2003b). Da das L-Selektin-Shedding nach Stimulation bei Frühgeborenen im Vergleich zu reifen Neugeborenen und Erwachsenen reduziert ist (Rebuck *et al.*, 1995) kann vermutet werden, dass die verminderte Rollgeschwindigkeit der PMN von Frühgeborenen in unserem Modell auch auf eine Beeinträchtigung des L-Selektin-Sheddings zurückzuführen ist.

2.3 Expression von Adhäsionsmolekülen auf neonatalen PMN

In der Vergangenheit wurde bei Neugeborenen über eine verminderte L-Selektin-Expression sowie einen niedrigeren totalen Zellgehalt an L-Selektin-Molekülen verglichen mit adulten Zellen berichtet (Rebuck *et al.*, 1995; Koenig *et al.*, 1996). Wir konnten weiterhin zeigen, dass die Expression des P-Selektin-Glykoprotein-Liganden-1 (PSGL-1), dem Haupt-Selektinliganden auf Neutrophilen, vom Reifungsgrad der Neugeborenen abhängt und während der Gestation ansteigt. Dies könnte, wie von Tcharmthi *et al.* vorgeschlagen, für die verminderte Fähigkeit neonataler PMN zu rollen verantwortlich sein (Tcharmthi *et al.*, 2000). Dennoch erlauben die Ergebnisse unseres experimentellen Ansatzes es nicht, eine solche Kausalität zu beweisen. Die für die Vermittlung des PMN-Rollens essentielle Bindung von Selektinen an PSGL-1 ist bekanntlich nur möglich, wenn der Selektinligand zuvor bestimmte posttranslationale Modifikationen erfahren hat. So wurde für die wichtige α 1,3-Fukosylierung von Hidalgo *et al.* eine Abhängigkeit vom Reifegrad der Leukozyten gezeigt. Ein erheblicher Anteil der untersuchten neonatalen CD34+ Stammzellen und Vorläuferzellen exprimierte dysfunktionales PSGL-1, was sich in einer Beeinträchtigung der Interaktionen dieser Zellen mit dem Gefäßendothel äußerte. Dass dieser Defekt auf einer mangelnden α 1,3-Fukosylierung von PSGL-1 beruhte, wurde durch die Zugabe von rekombinanter α 1,3-Fukosyltransferase VI bestätigt, die einen Anstieg der Bindungen an Selektine bewirkte (Hidalgo *et al.*, 2002; Hidalgo & Frenette, 2005). Es ist vorstellbar, dass auch andere Glykosylierungsschritte vom Reifegrad der Leukozyten abhängen. Eine qualitative Veränderung von PSGL-1 durch unvollständige Glykosylierung könnte bei Frühgeborenen möglicherweise auch zu deren eingeschränkter Fähigkeit zum Leukozytenrollen beitragen.

Weiterhin wurden in der Vergangenheit quantitative Unterschiede in der Expression leukozytärer Integrine und Selektine für die verminderte Rekrutierung neonataler

Neutrophiler verantwortlich gemacht. Die meisten und zum Teil kontroversen Ergebnisse wurden dabei über die Expression des β_2 -Integrins Mac-1 veröffentlicht. In einigen Studien wurde gezeigt, dass sich die Mac-1-Expression auf ruhenden PMN reifer Neugeborener und Erwachsener nicht unterscheidet, die neonatalen Zellen bei chemotaktischer Stimulation jedoch kaum in der Lage sind, die Oberflächenexpression hoch zu regulieren (Carr *et al.*, 1992; Moriguchi *et al.*, 2006). Ein Grund dafür könnte die von McEvoy *et al.* beschriebene Korrelation des totalen Zellgehalts an Mac-1 Molekülen zum Gestationsalter sein (McEvoy *et al.*, 1996). Diese erklärt außerdem die von Henneke *et al.* und Strunk *et al.* beobachtete verminderte Mac-1-Expression auf der PMN-Oberfläche Frühgeborener (Henneke *et al.*, 2003; Strunk *et al.*, 2004). Gegensätzliche Ergebnisse lieferten die von Rebuck *et al.* durchgeführten Untersuchungen, welche keinen Unterschied in der stimulierten Mac-1-Expression auf PMN von Neugeborenen und Erwachsenen feststellen konnten (Rebuck *et al.*, 1995). Die Widersprüchlichkeit dieser Befunde ist vermutlich auf methodische Unterschiede bei der Vorbereitung der Zellen zurückzuführen (Rebuck *et al.*, 1995). Die Ergebnisse unserer Studie stützen die große Mehrheit der genannten Publikationen hinsichtlich des zwischen Neugeborenen und Erwachsenen herrschenden Unterschiedes bei der Mac-1-Expression, denn auch wir beobachteten eine deutliche Abhängigkeit der Mac-1-Expression vom Gestationsalter. Es ist wahrscheinlich, dass die verminderte Mac-1-Expression zur Reduktion der PMN-Adhäsion bei Neugeborenen beiträgt. Voruntersuchungen zur LFA-1-Expression und dem totalen Zellgehalt von neonatalen und adulten PMN an LFA-1-Molekülen zeigten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen unserer durchflusszytometrischen Analysen keine Gruppenunterschiede (Rebuck *et al.*, 1995; McEvoy *et al.*, 1996).

Es ist zwar möglich, dass die starke Beeinträchtigung der PMN-Rekrutierung bei extremen Frühgeborenen einzig durch die verminderte Expression und qualitative Veränderungen von Adhäsionsmolekülen auf Neutrophilen zurückzuführen ist. Es ist aber durchaus denkbar, dass die beobachtete Abnahme der PMN-Rekrutierung zusätzlich durch eine verminderte Antwort neonataler Neutrophiler auf chemotaktische Stimulation hervorgerufen wird (Fox *et al.*, 2005). Obwohl wir keine Unterschiede bei der Expression des Chemokinrezeptors CXCR2 sahen, der durch Bindung des CXCL-Chemokins IL-8 die intravaskuläre PMN-Aktivierung vermittelt (Frommhold *et al.*, 2008), können wir Veränderungen intrazellulärer Signalwege, welche die PMN-Aktivierung betreffen, nicht ausschließen. In diesem Kontext wurde zuvor berichtet,

dass nachgeordnete Signale bei der LPS-vermittelten PMN-Aktivierung bei Neugeborenen abgeschwächt sind (Al-Hertani *et al.*, 2007). Dagegen sprechen jedoch die Ergebnisse von *in vivo* Untersuchungen der Leukozytenrekrutierung bei Mäusen, die kürzlich in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden. Anhand eines neuen experimentellen fetalen *in vivo* Modells, das eine direkte Beobachtung der Mikrozirkulation in murinen Feten erlaubt, wurde analog zu den hier dargestellten Ergebnissen eine starke Abnahme von Rollen und Adhäsion in 13 und 14 Tage alten Mäusefeten im Vergleich zu Neugeborenen bzw. 18 Tage alten Feten aufgezeigt (normale Tragezeit: 21 Tage).

2.4 Beeinflussung der Ergebnisse durch externe Faktoren

Es ist bekannt, dass Kortikosteroide einen hemmenden Effekt auf das Leukozytenrollen, die -Adhäsion (Davenpeck *et al.*, 1998) und weitere Leukozytenfunktionen (Lazzarin *et al.*, 1984; Fuenfer *et al.*, 1987) haben. Nahezu alle in die Studie eingeschlossenen extremen Frühgeborenen und etwa drei Viertel der moderaten Frühgeborenen standen unter dem Einfluss einer mütterlichen Kortikosteroid-Einnahme, die dem Zweck der fetalen Lungenreifeinduktion diente, hingegen war keines der reifen Neugeborenen davon betroffen. Um den Einfluss einer pränatalen Betamethason-Behandlung auf die PMN-Funktion in den Flusskammern zu prüfen, führten wir deshalb separate Experimente durch. Dabei zeigte sich, dass adulte PMN, die wir mit Betamethason in einer Konzentration vorbehandelten, wie sie im Nabelschnurblut von Neonaten vorliegt (Ballard, 1975), in gleichem Maße wie unbehandelte Kontrollen in Flusskammern adhären waren. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse der vorliegenden Studie durch eine Betamethason-Behandlung der Schwangeren nicht in größerem Maße beeinflusst wurden. Darüber hinaus zeigten sich im direkten Vergleich von moderaten Frühgeborenen, welche einer antenatalen Betamethason-Therapie ausgesetzt waren, mit Neugeborenen ohne Steroid-Exposition keine klaren Unterschiede bei der PMN-Rekrutierung, wobei die Aussagefähigkeit dieser Beobachtung durch die geringe Fallzahl eingeschränkt ist.

Weiterhin ist bekannt, dass die Funktionalität neutrophiler Granulozyten durch die Immunlage beeinflusst wird. So wurde bei septischen Erwachsenen über Einschränkungen im Bereich der PMN-Rekrutierung, der Chemotaxis und des respiratory burst berichtet (Benjamim *et al.*, 2002; Alves-Filho *et al.*, 2008; Reddy & Standiford, 2010). Die Autoren sehen die Ursache für die beeinträchtigte PMN-

Rekrutierung vor allem in einer Überproduktion von Zytokinen, Chemokinen und Stickstoffmonoxid. Bei reifen Neugeborenen mit Sepsis wurde ebenfalls eine Beeinträchtigung der Chemotaxis beobachtet (Turkmen *et al.*, 2000), die PMN-Rekrutierung wurde bei septischen Neugeborenen dagegen noch nicht untersucht. Da die Entzündungswerte im Nabelschnurblut der von uns untersuchten Neugeborenen negativ oder nur minimal erhöht waren, gehen wir davon aus, dass zum Zeitpunkt der Blutabnahme bei keinem der Neugeborenen eine schwere intrauterine Infektion vorgelegen hat, welche die Defizite der Frühgeborenen im Bereich der PMN-Rekrutierung erklären könnte. In diesem Zusammenhang wurde interessanterweise kürzlich gezeigt, dass neugeborene Mäuse sogar zu einer überschießenden Entzündungsantwort fähig sind (Zhao *et al.*, 2008). So reagierten murine Neugeborene auf eine LPS-Stimulation mit einem regelrechten „Zytokin-Sturm“, der mit einem schlechten Outcome der Tiere einherging. Da unsere Versuche zeigen, dass unter starker Stimulation mit IL-8 bei Frühgeborenen kaum PMN-Endothel-Interaktionen vermittelt werden, kann die überschießende Zytokin-Antwort in diesem Zusammenhang möglicherweise als Kompensationsversuch der verminderten PMN-Rekrutierung gedeutet werden. Um dies zu prüfen und einen direkten Zusammenhang zwischen der PMN-Funktion und der Erkrankung an einer Sepsis bei Frühgeborenen zu klären, sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

3 Klinische Bedeutung und Ausblick

In der vorliegenden Studie konnten wir zeigen, dass die Granulozytenfunktion im Rahmen der PMN-Rekrutierung einem ontogenetischen Reifungsprozess unterliegt, der primär vom Gestationsalter abhängt und sich bei humanen Frühgeborenen in einer deutlichen Beeinträchtigung des PMN-Rollens und der -Adhäsion äußert. Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese Beeinträchtigung der Immunabwehr zur hohen Anfälligkeit der Neugeborenen für bakterielle Infektionen beiträgt. Andererseits dürfte die abgeschwächte Immunantwort der Frühgeborenen aber gewissermaßen den physiologischen Bedürfnissen des fetalen Lebens entsprechen. So werden Frühgeborene in einer Situation geboren, in der ihr Immunsystem noch an die speziellen Bedingungen des Mutterleibs angepasst ist. Da ihre intrauterine Umgebung normalerweise steril ist, besteht während der frühen und mittleren Gestation noch keine Notwendigkeit für ein ausgereiftes Immunsystem. Im Gegenteil hätte eine überschießende TH1-Immunantwort im Rahmen von Infektionen sogar negative Folgen im Sinne einer Abstoßungsreaktion

gegenüber mütterlichen Antigenen, welche wiederum eine Frühgeburt auslösen könnte (Clapp, 2006). Aus diesem Grund wird bei Feten die TH1-Antwort zugunsten der TH2-Antwort unterdrückt. Der Mangel an den von TH1-Zellen sezernierten Zytokinen wie TNF- α , Interleukinen oder Interferon- γ hat eine erhöhte Anfälligkeit der Neugeborenen für Infektionen zur Folge (Levy, 2007). Im weiteren Verlauf der Gestation kommt es zu einer Reifung der Funktion der Zellen des angeborenen Immunsystems (Whitelaw & Parkin, 1988), auf welche die Neugeborenen bei der Abwehr postnataler Infektionen ganz besonders angewiesen sind (Wynn *et al.*, 2008). Zusätzlich findet postnatal noch eine weitere Ausreifung der Immunabwehr statt. So beobachteten Eisenfeld *et al.* postnatal und im Verlauf der ersten zweieinhalb Lebensjahre einen kontinuierlichen Anstieg der PMN-Adhärenz im Vergleich zu gesunden, reifen Neugeborenen (Eisenfeld *et al.*, 1990). Für die fetale Abwehrfunktion sind neben der Ausreifung der Leukozyten aber auch Veränderungen des Differentialblutbildes im Verlauf der Gestation von Bedeutung. So steigt neben der Gesamtleukozytenzahl auch der prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten mit zunehmendem Gestationsalter kontinuierlich an (Forestier *et al.*, 1991). Somit verfügen die Feten mit zunehmendem Gestationsalter über eine größere Anzahl an reifen PMN. Diese Besonderheiten des fetalen und neonatalen Abwehrsystems müssen bei der Entwicklung zukünftiger therapeutischer Strategien berücksichtigt werden.

In der Vergangenheit wurden bereits einige immunmodulatorische Ansätze zur Prävention und Therapie der neonatalen Sepsis vorgestellt. Häufig wurde ein Mangel an hämatopoetischen Stammzellen und die daraus resultierende neonatale Neutropenie für die erhöhte Infektanfälligkeit von Frühgeborenen und reifen Neugeborenen verantwortlich gemacht (Christensen, 1988; Cadnapaphornchai & Faix, 1992; Ohls R.K., 2005). Durch den Einsatz der proliferationsfördernden Substanzen G-CSF und GM-CSF (Granulozyten- bzw. Granulozyten Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor) versprach man sich, die Immunabwehr der Neugeborenen über eine Steigerung der Neutrophilenzahlen im peripheren Blut zu verbessern. Weshalb dieser Therapieansatz jedoch keine Abnahme der Mortalität bewirken konnte (Carr *et al.*, 2009), ist durch die Ergebnisse unserer Studie erklärbar. Zwar rief die Gabe von GM-CSF wie erhofft einen Anstieg der absoluten Neutrophilenzahlen im Blutkreislauf der Früh- und Neugeborenen hervor (Carr *et al.*, 2009), doch wie unsere Experimente verdeutlichen, sind diese Zellen in vielerlei Hinsicht noch unreif. Die gesteigerte Anzahl dysfunktionaler Abwehrzellen vermochte es somit nicht, die Erregerabwehr der

Neugeborenen wesentlich zu verbessern. Man könnte folglich annehmen, dass eine Transfusion immunkompetenter, adulter PMN bei Neugeborenen mit Sepsisverdacht und Neutropenie zu einer Verbesserung des klinischen Zustands führen würde. Die wenigen dazu veröffentlichten Studien kamen jedoch zu kontroversen Ergebnissen. Während die Arbeitsgruppe um Christensen einen klaren Überlebensvorteil für neutropene, septische Neugeborene sahen, die Granulozyten-Transfusionen erhalten hatten (Christensen *et al.*, 1982), erreichten Baley *et al.* und Wheeler *et al.* in ihren Studien keine Senkung der Mortalität (Baley *et al.*, 1987; Wheeler *et al.*, 1987). Diese Studien verfügen allerdings über eine geringe Aussagekraft, da sie zum Teil nur vier bis fünf Neugeborene pro Versuchsgruppe (Wheeler *et al.*, 1987) enthielten und alle in den 1980er Jahren durchgeführt wurden, als die intensivmedizinische Versorgung insbesondere von extremen Frühgeborenen weniger fortgeschritten war als heute. Beispielsweise war die Verwendung von rekombinantem Surfactant in den USA zu diesem Zeitpunkt noch nicht zugelassen (Hamvas *et al.*, 1996), was sich sicherlich auf das Outcome der untersuchten Neugeborenen auswirkte. Zur Beurteilung des tatsächlichen Effekts von Granulozyten-Transfusionen bei septischen Neugeborenen wären weitere groß angelegte Studien nötig (Mohan & Brocklehurst, 2003). Es muss allerdings bedacht werden, dass der Erfolg dieser Therapie-Strategie eine intakte Funktion neonataler Endothelzellen voraussetzt. Diesbezügliche Untersuchungen bei humanen Frühgeborenen sind bisher rar, es wurde lediglich über eine verminderte Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle berichtet (Lorant *et al.*, 1999). Eine kürzlich in unserem Labor durchgeführte Versuchsreihe deckte jedoch weitere Einschränkungen auf: Die isolierten Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) extremer Frühgeborener (≤ 30 . Schwangerschaftswoche) waren nur in reduziertem Umfang in der Lage, unter Flussbedingungen adulte neutrophile Granulozyten zu rekrutieren. Erst mit zunehmendem Gestationsalter erlangten die Endothelzellen die Fähigkeit, in größerem Maße mit adulten PMN zu interagieren (Publikation in Vorbereitung).

Auch andere Ansätze zur Reduktion der hohen Sepsisrate Neugeborener, wie prophylaktische Immunglobulin-Therapien (Ohlsson & Lacy, 2004) oder die Zufuhr von Glutamin (Tubman *et al.*, 2008), konnten keine wesentliche Erfolge erzielen. Dennoch sollte die Idee, das neonatale Abwehrsystem durch immunmodulatorische Therapien zu unterstützen, unbedingt weiterverfolgt werden. Im Tiermodell gibt es bereits neue viel versprechende Entdeckungen. Durch eine Vorbehandlung

neugeborener Mäuse mit Toll-like-Rezeptor-Agonisten wie LPS konnten Wynn *et al.* das murine Immunsystem gewissermaßen primen und erreichten dadurch eine effektivere PMN-Rekrutierung (Wynn *et al.*, 2008). Die Autoren sehen in der Weiterentwicklung dieser Beobachtungen das Potenzial für eine zukünftige prophylaktische Anwendung bei Frühgeborenen, welche die Sepsis-bedingte Mortalität der Neugeborenen reduzieren könnte (Wynn *et al.*, 2009).

V ZUSAMMENFASSUNG

Schwerwiegende Infektionen bei Neugeborenen und insbesondere Frühgeborenen tragen wesentlich zur neonatalen Morbidität und Mortalität bei. Die erhöhte Infektanfälligkeit ist unter anderem auf eine gestörte inflammatorische Antwort gegenüber eingedrungenen Pathogenen zurückzuführen. Bei der Abwehr bakterieller Mikroorganismen spielen neutrophile Granulozyten (PMN) eine entscheidende Rolle. Trotz des wachsenden Verständnisses der immunologischen Vorgänge bei Neugeborenen ist bis dato unklar, wie sich die PMN-Rekrutierung im Verlauf der Gestation entwickelt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten bei Neugeborenen in Abhängigkeit vom Gestationsalter zu untersuchen.

Wir analysierten das Roll- und Adhäsionsverhalten neutrophiler Granulozyten aus dem Nabelschnurblut von Frühgeborenen und reifen Neugeborenen (24. SSW – 41. SSW) in einem *in vitro* Flusskammermodell. Dafür wurden Mikroglaskapillaren mit den rekombinanten humanen Proteinen P- bzw. E-Selektin, dem CXCR2 Chemokin Interleukin-8 und dem Integrinliganden ICAM-1 beschichtet, welche *in vivo* auf inflammatorisch veränderten Endothelzellen exprimiert werden und durch Bindung ihrer leukozytären Liganden die PMN-Rollen und die -Adhäsion vermitteln. Mit Hilfe einer Hochpräzisionspumpe wurden die Kapillaren unter standardisierten Bedingungen mit zuvor isolierten neonatalen PMN perfundiert und ihre Interaktionen mit der Flusskammeroberfläche unter einem Mikroskop beobachtet. Zusätzlich wurde das Expressionsmuster verschiedener Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche von neonatalen Neutrophilen mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Insgesamt wurden 50 Neugeborene verschiedener Gestationsaltersstufen, die im Hinblick auf relevante klinische Parameter und Laborwerte für ihre Alterskollektive repräsentativ waren, in unsere Studie eingeschlossen. In den Flusskammerversuchen konnten wir zeigen, dass die Fähigkeit neutrophiler Granulozyten unter Flussbedingungen zu rollen und zu adhären signifikant mit dem Gestationsalter korreliert. Während die Neutrophilen von extremen Frühgeborenen (≤ 30 . SSW) kaum rollten oder adhären waren, beobachteten wir mit zunehmendem Gestationsalter einen Anstieg der PMN-Interaktionen mit der Kapillarwand. Dennoch erreichten auch reife Neugeborene in unserem Modell nicht das Niveau adulter Kontrollen. Die neutrophilen Granulozyten von Frühgeborenen rollten außerdem signifikant langsamer als die Zellen

reifer Neugeborener oder Erwachsener. Diese Beobachtungen gingen mit einer wesentlichen Reduktion der Expression des Roll- Liganden PSGL-1 und des Adhäsions- Liganden Mac-1 auf Neutrophilen von Früh- und Reifgeborenen einher, während sich die Expression des Interleukin-8-Rezeptors CXCR2 und des β_2 -Integrins LFA-1 zwischen Neugeborenen und Erwachsenen nicht unterschied. Die Beeinflussung der Studienergebnisse durch eine maternale Betamethason-Behandlung zur Lungenreifeinduktion der Feten konnte durch entsprechende Kontrollversuche ausgeschlossen werden.

Im Verlauf der fetalen Entwicklung unterliegt die PMN-Rekrutierung einem Reifungsprozess, der primär vom Gestationsalter abhängt. Die Unfähigkeit extremer Frühgeborener, neutrophile Granulozyten zu rekrutieren, trägt in diesem Zusammenhang mit hoher Wahrscheinlichkeit zu deren Anfälligkeit für lebensbedrohliche Infektionen bei. Um auf der Basis dieser neuen Erkenntnisse in Zukunft Strategien zur Prävention und Therapie der neonatalen Sepsis entwickeln zu können, sind allerdings noch weitere Untersuchungen nötig.

VI LITERATURVERZEICHNIS

Abbassi O, Kishimoto TK, McIntire LV, Anderson DC, & Smith CW (1993). E-selectin supports neutrophil rolling in vitro under conditions of flow. *J Clin Invest* **92**, 2719-2730.

Al-Hertani W, Yan SR, Byers DM, & Bortolussi R (2007). Human newborn polymorphonuclear neutrophils exhibit decreased levels of MyD88 and attenuated p38 phosphorylation in response to lipopolysaccharide. *Clin Invest Med* **30**, E44-E53.

Alves-Filho JC, de FA, Spiller F, Souto FO, & Cunha FQ (2008). The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock* **30 Suppl 1**, 3-9.

Anderson DC, Hughes BJ, & Smith CW (1981). Abnormal mobility of neonatal polymorphonuclear leukocytes. Relationship to impaired redistribution of surface adhesion sites by chemotactic factor or colchicine. *J Clin Invest* **68**, 863-874.

Anderson DC, Freeman KL, Heerdt B, Hughes BJ, Jack RM, & Smith CW (1987). Abnormal stimulated adherence of neonatal granulocytes: impaired induction of surface Mac-1 by chemotactic factors or secretagogues. *Blood* **70**, 740-750.

Anderson DC (1989). Neonatal neutrophil dysfunction. *Am J Pediatr Hematol Oncol* **11**, 224-226.

Anderson DC, Rothlein R, Marlin SD, Krater SS, & Smith CW (1990). Impaired transendothelial migration by neonatal neutrophils: abnormalities of Mac-1 (CD11b/CD18)-dependent adherence reactions. *Blood* **76**, 2613-2621.

Anderson DC, Abbassi O, Kishimoto TK, Koenig JM, McIntire LV, & Smith CW (1991). Diminished lectin-, epidermal growth factor-, complement binding domain-cell adhesion molecule-1 on neonatal neutrophils underlies their impaired CD18-independent adhesion to endothelial cells in vitro. *J Immunol* **146**, 3372-3379.

Baley JE, Stork EK, Warkentin PI, & Shurin SB (1987). Buffy coat transfusions in neutropenic neonates with presumed sepsis: a prospective, randomized trial. *Pediatrics* **80**, 712-720.

Ballard PL, Granberg P, Ballard RA (1975). Glucocorticoid levels in maternal and cord serum after prenatal betamethasone therapy to prevent respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* **56**, 1548-1554.

- Bargatze RF, Kurk S, Butcher EC, & Jutila MA (1994). Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells. *J Exp Med* **180**, 1785-1792.
- Bayerische Arbeitsgemeinschaft für Qualitätssicherung in der stationären Versorgung (2010). Bayerische Neonatalerhebung, Deskriptive Neonatalstatistik 2009 (Version 1.2).
- Bektas S, Goetze B, & Speer CP (1990). Decreased adherence, chemotaxis and phagocytic activities of neutrophils from preterm neonates. *Acta Paediatr Scand* **79**, 1031-1038.
- Benjamim CF, Silva JS, Fortes ZB, Oliveira MA, Ferreira SH, & Cunha FQ (2002). Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. *Infect Immun* **70**, 3602-3610.
- Bullard DC, Kunkel EJ, Kubo H, Hicks MJ, Lorenzo I, Doyle NA, Doerschuk CM, Ley K, & Beaudet AL (1996). Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. *J Exp Med* **183**, 2329-2336.
- Burg ND & Pillinger MH (2001). The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol* **99**, 7-17.
- Cadnapaphornchai M & Faix RG (1992). Increased nosocomial infection in neutropenic low birth weight (2000 grams or less) infants of hypertensive mothers. *J Pediatr* **121**, 956-961.
- Carr R, Pumford D, & Davies JM (1992). Neutrophil chemotaxis and adhesion in preterm babies. *Arch Dis Child* **67**, 813-817.
- Carr R, Brocklehurst P, Dore CJ, & Modi N (2009). Granulocyte-macrophage colony stimulating factor administered as prophylaxis for reduction of sepsis in extremely preterm, small for gestational age neonates (the PROGRAMS trial): a single-blind, multicentre, randomised controlled trial. *Lancet* **373**, 226-233.
- Chesnutt BC, Smith DF, Raffler NA, Smith ML, White EJ, & Ley K (2006). Induction of LFA-1-dependent neutrophil rolling on ICAM-1 by engagement of E-selectin. *Microcirculation* **13**, 99-109.
- Christensen RD (1988). Developmental changes in pluripotent hematopoietic progenitors. *Early Hum Dev* **16**, 195-205.

- Christensen RD, Rothstein G, Anstall HB, & Bybee B (1982). Granulocyte transfusions in neonates with bacterial infection, neutropenia, and depletion of mature marrow neutrophils. *Pediatrics* **70**, 1-6.
- Clapp DW (2006). Developmental regulation of the immune system. *Semin Perinatol* **30**, 69-72.
- Davenpeck KL, Zagorski J, Schleimer RP, & Bochner BS (1998). Lipopolysaccharide-induced leukocyte rolling and adhesion in the rat mesenteric microcirculation: regulation by glucocorticoids and role of cytokines. *J Immunol* **161**, 6861-6870.
- Dejana E (2006). The transcellular railway: insights into leukocyte diapedesis. *Nat Cell Biol* **8**, 105-107.
- Ding ZM, Babensee JE, Simon SI, Lu H, Perrard JL, Bullard DC, Dai XY, Bromley SK, Dustin ML, Entman ML, Smith CW, & Ballantyne CM (1999). Relative contribution of LFA-1 and Mac-1 to neutrophil adhesion and migration. *J Immunol* **163**, 5029-5038.
- DiVietro JA, Smith MJ, Smith BR, Petruzzelli L, Larson RS, & Lawrence MB (2001). Immobilized IL-8 triggers progressive activation of neutrophils rolling in vitro on P-selectin and intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* **167**, 4017-4025.
- Dustin M.L. (2001). β 2-Integrins and their ligands in inflammation. In *Physiology of inflammation*, ed. Ley K., pp. 204-221. Oxford University Press, New York.
- Eisenfeld L, Krause PJ, Herson V, Savidakis J, Bannon P, Maderazo E, Woronick C, Giuliano C, & Banco L (1990). Longitudinal study of neutrophil adherence and motility. *J Pediatr* **117**, 926-929.
- Eriksson EE, Xie X, Werr J, Thoren P, & Lindbom L (2001). Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo. *J Exp Med* **194**, 205-218.
- Etzioni A (2007). Leukocyte adhesion deficiencies: molecular basis, clinical findings, and therapeutic options. *Adv Exp Med Biol* **601**, 51-60.
- Fanaroff AA, Stoll BJ, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Stark AR, Bauer CR, Donovan EF, Korones SB, Laptook AR, Lemons JA, Oh W, Papile LA, Shankaran S, Stevenson DK, Tyson JE, & Poole WK (2007). Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants. *Am J Obstet Gynecol* **196**, 147-148.

- Forestier F, Daffos F, Catherine N, Renard M, & Andreux JP (1991). Developmental hematopoiesis in normal human fetal blood. *Blood* **77**, 2360-2363.
- Fortenberry JD, Marolda JR, Anderson DC, Smith CW, & Mariscalco MM (1994). CD18-dependent and L-selectin-dependent neutrophil emigration is diminished in neonatal rabbits. *Blood* **84**, 889-897.
- Fox SE, Lu W, Maheshwari A, Christensen RD, & Calhoun DA (2005). The effects and comparative differences of neutrophil specific chemokines on neutrophil chemotaxis of the neonate. *Cytokine* **29**, 135-140.
- Frommhold D, Ludwig A, Bixel MG, Zarbock A, Babushkina I, Weissinger M, Cauwenberghs S, Ellies LG, Marth JD, Beck-Sickinger AG, Sixt M, Lange-Sperandio B, Zernecke A, Brandt E, Weber C, Vestweber D, Ley K, & Sperandio M (2008). Sialyltransferase ST3Gal-IV controls CXCR2-mediated firm leukocyte arrest during inflammation. *J Exp Med* **205**, 1435-1446.
- Frommhold D, Kamphues A, Hepper I, Pruenster M, Lukic IK, Socher I, Zablotzkaya V, Buschmann K, Lange-Sperandio B, Schymeinsky J, Ryschich E, Poeschl J, Kupatt C, Nawroth PP, Moser M, Walzog B, Bierhaus A, & Sperandio M (2010). RAGE and ICAM-1 cooperate in mediating leukocyte recruitment during acute inflammation in vivo. *Blood* **116**, 841-849.
- Fuenfer MM, Herson VC, Raye JR, Woronick CL, Eisenfeld L, Ingardia CJ, Block CF, & Krause PJ (1987). The effect of betamethasone on neonatal neutrophil chemotaxis. *Pediatr Res* **22**, 150-153.
- Genzel-Boroviczeny O, MacWilliams S, Von PM, & Zoppelli L (2006). Mortality and major morbidity in premature infants less than 31 weeks gestational age in the decade after introduction of surfactant. *Acta Obstet Gynecol Scand* **85**, 68-73.
- Glasser L & Fiederlein RL (1990). The effect of various cell separation procedures on assays of neutrophil function. A critical appraisal. *Am J Clin Pathol* **93**, 662-669.
- Hamvas A, Wise PH, Yang RK, Wampler NS, Noguchi A, Maurer MM, Walentik CA, Schramm WF, & Cole FS (1996). The influence of the wider use of surfactant therapy on neonatal mortality among blacks and whites. *N Engl J Med* **334**, 1635-1640.
- Harris ES, McIntyre TM, Prescott SM, & Zimmerman GA (2000). The leukocyte integrins. *J Biol Chem* **275**, 23409-23412.

- Henneke P, Osmer I, Bauer K, Lamping N, Versmold HT, & Schumann RR (2003). Impaired CD14-dependent and independent response of polymorphonuclear leukocytes in preterm infants. *J Perinat Med* **31**, 176-183.
- Hidalgo A, Weiss LA, & Frenette PS (2002). Functional selectin ligands mediating human CD34(+) cell interactions with bone marrow endothelium are enhanced postnatally. *J Clin Invest* **110**, 559-569.
- Hidalgo A & Frenette PS (2005). Enforced fucosylation of neonatal CD34+ cells generates selectin ligands that enhance the initial interactions with microvessels but not homing to bone marrow. *Blood* **105**, 567-575.
- Hill HR (1987). Biochemical, structural, and functional abnormalities of polymorphonuclear leukocytes in the neonate. *Pediatr Res* **22**, 375-382.
- Jung U, Norman KE, Scharffetter-Kochanek K, Beaudet AL, & Ley K (1998). Transit time of leukocytes rolling through venules controls cytokine-induced inflammatory cell recruitment in vivo. *J Clin Invest* **102**, 1526-1533.
- Katayama Y, Hidalgo A, Chang J, Peired A, & Frenette PS (2005). CD44 is a physiological E-selectin ligand on neutrophils. *J Exp Med* **201**, 1183-1189.
- Khan AI & Kubes P (2003). L-selectin: an emerging player in chemokine function. *Microcirculation* **10**, 351-358.
- Koenig JM, Simon J, Anderson DC, Smith E, & Smith CW (1996). Diminished soluble and total cellular L-selectin in cord blood is associated with its impaired shedding from activated neutrophils. *Pediatr Res* **39**, 616-621.
- Krueger M, Nauck MS, Sang S, Hentschel R, Wieland H, & Berner R (2001). Cord blood levels of interleukin-6 and interleukin-8 for the immediate diagnosis of early-onset infection in premature infants. *Biol Neonate* **80**, 118-123.
- Kunkel EJ & Ley K (1996). Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo. *Circ Res* **79**, 1196-1204.
- Kunkel EJ, Dunne JL, & Ley K (2000). Leukocyte arrest during cytokine-dependent inflammation in vivo. *J Immunol* **164**, 3301-3308.
- Kuster H, Weiss M, Willeitner AE, Detlefsen S, Jeremias I, Zbojan J, Geiger R, Lipowsky G, & Simbruner G (1998). Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 for early diagnosis of neonatal sepsis 2 days before clinical manifestation. *Lancet* **352**, 1271-1277.

- Kuwano Y, Spelten O, Zhang H, Ley K, & Zarbock A (2010). Rolling on E- or P-selectin induces the extended but not high-affinity conformation of LFA-1 in neutrophils. *Blood* **116**, 617-624.
- Lawn JE, Wilczynska-Ketende K, & Cousens SN (2006). Estimating the causes of 4 million neonatal deaths in the year 2000. *Int J Epidemiol* **35**, 706-718.
- Lawrence MB, McIntire LV, & Eskin SG (1987). Effect of flow on polymorphonuclear leukocyte/endothelial cell adhesion. *Blood* **70**, 1284-1290.
- Lawrence MB & Springer TA (1991). Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* **65**, 859-873.
- Lawrence MB, Kansas GS, Kunkel EJ, & Ley K (1997). Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L,P,E). *J Cell Biol* **136**, 717-727.
- Lawrence MB (2001). In Vitro Models of Leukocyte Adhesion. In *Physiology of inflammation*, ed. Ley K., pp. 204-221. Oxford University Press.
- Lazzarin A, Luerti M, Uberti-Foppa C, Zavattini G, Rossi A, & Tornaghi R (1984). Polymorphonuclear leucocytes functions from premature infants after prevention of respiratory distress syndrome with betamethasone and ambroxol. *Biol Res Pregnancy Perinatol* **5**, 130-134.
- Levy O (2007). Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol* **7**, 379-390.
- Ley K, Allietta M, Bullard DC, & Morgan S (1998). Importance of E-selectin for firm leukocyte adhesion in vivo. *Circ Res* **83**, 287-294.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, & Nourshargh S (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* **7**, 678-689.
- Lorant DE, Li W, Tabatabaei N, Garver MK, & Albertine KH (1999). P-selectin expression by endothelial cells is decreased in neonatal rats and human premature infants. *Blood* **94**, 600-609.
- Luo BH, Carman CV, & Springer TA (2007). Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* **25**, 619-647.

- Macey MG, McCarthy DA, Vordermeier S, Newland AC, & Brown KA (1995). Effects of cell purification methods on CD11b and L-selectin expression as well as the adherence and activation of leucocytes. *J Immunol Methods* **181**, 211-219.
- Maheshwari A. & Christensen R.D. (2005). Developmental Granulocytopoiesis. In *Avery's Neonatology*, eds. MacDonald M., Mullett M.D., & Seshia M.M.K., pp. 1388-1396. Lippincott Williams & Wilkins.
- Malinin NL, Zhang L, Choi J, Ciocea A, Razorenova O, Ma YQ, Podrez EA, Tosi M, Lennon DP, Caplan AI, Shurin SB, Plow EF, & Byzova TV (2009). A point mutation in KINDLIN3 ablates activation of three integrin subfamilies in humans. *Nat Med* **15**, 313-318.
- Mangan PR, O'Quinn D, Harrington L, Bonder CS, Kubes P, Kucik DF, Bullard DC, & Weaver CT (2005). Both Th1 and Th2 cells require P-selectin glycoprotein ligand-1 for optimal rolling on inflamed endothelium. *Am J Pathol* **167**, 1661-1675.
- Mariscalco MM, Tchamitchi MH, & Smith CW (1998). P-Selectin support of neonatal neutrophil adherence under flow: contribution of L-selectin, LFA-1, and ligand(s) for P-selectin. *Blood* **91**, 4776-4785.
- Mariscalco MM, Vergara W, Mei J, Smith EO, & Smith CW (2002). Mechanisms of decreased leukocyte localization in the developing host. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**, H636-H644.
- Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, & Wagner DD (1993). Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell* **74**, 541-554.
- McEvoy LT, Zakem-Cloud H, & Tosi MF (1996). Total cell content of CR3 (CD11b/CD18) and LFA-1 (CD11a/CD18) in neonatal neutrophils: relationship to gestational age. *Blood* **87**, 3929-3933.
- Melder RJ, Yuan J, Munn LL, & Jain RK (2000). Erythrocytes enhance lymphocyte rolling and arrest in vivo. *Microvasc Res* **59**, 316-322.
- Mohan P & Brocklehurst P (2003). Granulocyte transfusions for neonates with confirmed or suspected sepsis and neutropaenia. *Cochrane Database Syst Rev* CD003956.
- Moriguchi N, Yamamoto S, Isokawa S, Andou A, & Miyata H (2006). Granulocyte functions and changes in ability with age in newborns; Report no. 1: flow

- cytometric analysis of granulocyte functions in whole blood. *Pediatr Int* **48**, 17-21.
- Moser M, Bauer M, Schmid S, Ruppert R, Schmidt S, Sixt M, Wang HV, Sperandio M, & Fassler R (2009). Kindlin-3 is required for beta2 integrin-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells. *Nat Med* **15**, 300-305.
- Munn LL, Melder RJ, & Jain RK (1996). Role of erythrocytes in leukocyte-endothelial interactions: mathematical model and experimental validation. *Biophys J* **71**, 466-478.
- Nussbaum C, Moser M, & Sperandio M (2010). Leukocyte adhesion deficiency-III: when leukocytes cannot stop. *Pediatr Res* **67**, 339.
- Nussbaum C, Sperandio M (2011). Innate immune cell recruitment in the fetus and neonate. *J Reprod Immunol*.
- Ohls R.K. (2005). Developmental Erythropoiesis. In *Avery's Neonatology*, eds. MacDonald M.G., Mullett M.D., & Seshia M.M.K., pp. 1397-1401. Lippincott Williams & Wilkins.
- Ohlsson A & Lacy JB (2004). Intravenous immunoglobulin for preventing infection in preterm and/or low-birth-weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* CD000361.
- Olson TS & Ley K (2002). Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **283**, R7-28.
- Pallister I, Bhatia R, Katpalli G, Allison D, Parker C, & Topley N (2006). Alteration of polymorphonuclear neutrophil surface receptor expression and migratory activity after isolation: comparison of whole blood and isolated PMN preparations from normal and postfracture trauma patients. *J Trauma* **60**, 844-850.
- Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, & Kubes P (2006). Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med* **203**, 2569-2575.
- Pries AR & Gaehtgens P (1987). Digital video image-shearing device for continuous microvessel diameter measurement. *Microvasc Res* **34**, 260-267.
- Quinn MT, DeLeo FR, & Gary MB (2007). Neutrophil Methods and Protocols. In *Isolation of Human Neutrophils From Venous Blood*, ed. Nauseef WM, pp. 15-20. Humana Press, New Jersey.

- Rao RM, Haskard DO, & Landis RC (2002). Enhanced recruitment of Th2 and CLA-negative lymphocytes by the S128R polymorphism of E-selectin. *J Immunol* **169**, 5860-5865.
- Rebuck N, Gibson A, & Finn A (1995). Neutrophil adhesion molecules in term and premature infants: normal or enhanced leucocyte integrins but defective L-selectin expression and shedding. *Clin Exp Immunol* **101**, 183-189.
- Reddy RC & Standiford TJ (2010). Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis. *Curr Opin Hematol* **17**, 18-24.
- Rego MA, Martinez FE, Elias J, & Mussi-Pinhata MM (2010). Diagnostic value of interleukin-6 and C-reactive protein on early onset bacterial infection in preterm neonates with respiratory distress. *J Perinat Med* **38**, 527-533.
- Roos R., Genzel-Boroviczény O., & Proquitté H. (2003). Checkliste Neonatologie. pp. 414. Thieme.
- Scharffetter-Kochanek K, Lu H, Norman K, van NN, Munoz F, Grabbe S, McArthur M, Lorenzo I, Kaplan S, Ley K, Smith CW, Montgomery CA, Rich S, & Beaudet AL (1998). Spontaneous skin ulceration and defective T cell function in CD18 null mice. *J Exp Med* **188**, 119-131.
- Sligh JE, Jr., Ballantyne CM, Rich SS, Hawkins HK, Smith CW, Bradley A, & Beaudet AL (1993). Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8529-8533.
- Smith CW, Rothlein R, Hughes BJ, Mariscalco MM, Rudloff HE, Schmalstieg FC, & Anderson DC (1988). Recognition of an endothelial determinant for CD 18-dependent human neutrophil adherence and transendothelial migration. *J Clin Invest* **82**, 1746-1756.
- Smith ML, Sperandio M, Galkina EV, & Ley K (2004). Autoperfused mouse flow chamber reveals synergistic neutrophil accumulation through P-selectin and E-selectin. *J Leukoc Biol* **76**, 985-993.
- Sperandio M, Smith ML, Forlow SB, Olson TS, Xia L, McEver RP, & Ley K (2003a). P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules. *J Exp Med* **197**, 1355-1363.
- Sperandio & Ley (2003b). Molecular Mechanisms of Leukocyte Adhesion. In *Molecular Basis for microcirculatory disorders*, eds. G.W.Schmid-Schönbein & D.N.Granger.

- Sperandio M (2004). Blocking Leukocyte Rolling: Does it have a Role in Disease Prevention? *Vascular Disease Prevention* 1, 185-195.
- Sperandio M, Pickard J, Unnikrishnan S, Acton ST, & Ley K (2006a). Analysis of leukocyte rolling in vivo and in vitro. *Methods Enzymol* **416**, 346-371.
- Sperandio M (2006b). Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *FEBS J* **273**, 4377-4389.
- Steeber DA, Campbell MA, Basit A, Ley K, & Tedder TF (1998). Optimal selectin-mediated rolling of leukocytes during inflammation in vivo requires intercellular adhesion molecule-1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7562-7567.
- Stillie R, Farooq SM, Gordon JR, & Stadnyk AW (2009). The functional significance behind expressing two IL-8 receptor types on PMN. *J Leukoc Biol* **86**, 529-543.
- Stoll BJ & Hansen N (2003). Infections in VLBW infants: studies from the NICHD Neonatal Research Network. *Semin Perinatol* **27**, 293-301.
- Strunk T, Temming P, Gembruch U, Reiss I, Bucsky P, & Schultz C (2004). Differential maturation of the innate immune response in human fetuses. *Pediatr Res* **56**, 219-226.
- Svensson L, Howarth K, McDowall A, Patzak I, Evans R, Ussar S, Moser M, Metin A, Fried M, Tomlinson I, & Hogg N (2009). Leukocyte adhesion deficiency-III is caused by mutations in KINDLIN3 affecting integrin activation. *Nat Med* **15**, 306-312.
- Tcharmtchi MH, Smith CW, & Mariscalco MM (2000). Neonatal neutrophil interaction with P-selectin: contribution of P-selectin glycoprotein ligand-1 and sialic acid. *J Leukoc Biol* **67**, 73-80.
- Tedder TF, Steeber DA, & Pizcueta P (1995). L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. *J Exp Med* **181**, 2259-2264.
- Trevani AS, Andonegui G, Giordano M, Lopez DH, Gamberale R, Minucci F, & Geffner JR (1999). Extracellular acidification induces human neutrophil activation. *J Immunol* **162**, 4849-4857.
- Tubman TR, Thompson SW, & McGuire W (2008). Glutamine supplementation to prevent morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* CD001457.

- Turkmen M, Satar M, & Atici A (2000). Neutrophil chemotaxis and random migration in preterm and term infants with sepsis. *Am J Perinatol* **17**, 107-112.
- Urlichs F & Speer C.P. (2004). Neutrophil Function in Preterm and Term Infants. *NeoReviews* **5**, 417-430.
- Venaille TJ, Misso NL, Phillips MJ, Robinson BW, & Thompson PJ (1994). Effects of different density gradient separation techniques on neutrophil function. *Scand J Clin Lab Invest* **54**, 385-391.
- Vestweber D & Blanks JE (1999). Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* **79**, 181-213.
- Volante E, Moretti S, Pisani F, & Bevilacqua G (2004). Early diagnosis of bacterial infection in the neonate. *J Matern Fetal Neonatal Med* **16 Suppl 2**, 13-16.
- von Andrian UH, Hasslen SR, Nelson RD, Erlandsen SL, & Butcher EC (1995). A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell* **82**, 989-999.
- Walcheck B, Kahn J, Fisher JM, Wang BB, Fisk RS, Payan DG, Feehan C, Betageri R, Darlak K, Spatola AF, & Kishimoto TK (1996). Neutrophil rolling altered by inhibition of L-selectin shedding in vitro. *Nature* **380**, 720-723.
- Wheeler JG, Chauvenet AR, Johnson CA, Block SM, Dillard R, & Abramson JS (1987). Buffy coat transfusions in neonates with sepsis and neutrophil storage pool depletion. *Pediatrics* **79**, 422-425.
- Whitelaw A & Parkin J (1988). Development of immunity. *Br Med Bull* **44**, 1037-1051.
- Wu YC, Huang YF, Lin CH, & Shieh CC (2005). Detection of defective granulocyte function with flow cytometry in newborn infants. *J Microbiol Immunol Infect* **38**, 17-24.
- Wynn JL, Scumpia PO, Winfield RD, Delano MJ, Kelly-Scumpia K, Barker T, Ungaro R, Levy O, & Moldawer LL (2008). Defective innate immunity predisposes murine neonates to poor sepsis outcome but is reversed by TLR agonists. *Blood* **112**, 1750-1758.
- Wynn JL, Neu J, Moldawer LL, & Levy O (2009). Potential of immunomodulatory agents for prevention and treatment of neonatal sepsis. *J Perinatol* **29**, 79-88.

- Yakubenia S & Wild MK (2006). Leukocyte adhesion deficiency II. Advances and open questions. *FEBS J* **273**, 4390-4398.
- Zahler S, Kowalski C, Brosig A, Kupatt C, Becker BF, & Gerlach E (1997). The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method. *J Immunol Methods* **200**, 173-179.
- Zarbock A, Lowell CA, & Ley K (2007). Spleen tyrosine kinase Syk is necessary for E-selectin-induced alpha(L)beta(2) integrin-mediated rolling on intercellular adhesion molecule-1. *Immunity* **26**, 773-783.
- Zarbock A & Ley K (2009). Neutrophil adhesion and activation under flow. *Microcirculation* **16**, 31-42.
- Zhao J, Kim KD, Yang X, Auh S, Fu YX, & Tang H (2008). Hyper innate responses in neonates lead to increased morbidity and mortality after infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 7528-7533.

VII ANHANG

1 Veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit

Originalarbeiten

Nussbaum C, **Gloning A**, Pruenster M, Frommhold D, Bierschenk S, Genzel-Boroviczény O, von Andrian U, Quackenbush E, Sperandio M (2013). Neutrophil and endothelial adhesive function during human fetal ontogeny. *J Leukoc Biol* 93(2):175-84

Vorträge

Nussbaum C, **Gloning A**, Pruenster M, Bierschenk S, Genzel-Boroviczény O, Sperandio M. Rekrutierung neutrophiler Granulozyten bei Früh- und Reifgeborenen in Abhängigkeit vom Gestationsalter.

(Dr. von Haunersches Kinderspital Research Symposium, Juni 2009, Herrsching)

Gloning A, Nussbaum C, Pruenster M, Bierschenk S, Genzel-Boroviczény O, Sperandio M. Leukozytenrekrutierung bei Früh- und Reifgeborenen in Abhängigkeit vom Gestationsalter.

(Kolloquium über experimentelle Pathophysiologie, Walter-Brendel-Zentrum der LMU, Juni 2009, München)

Nussbaum C, **Gloning A**, Pruenster M, Bierschenk S, Genzel-Boroviczény O, Sperandio M. PMN recruitment during human fetal development. *J Vasc Res* 2009, Vol. 46, Suppl. 3

(Gemeinsame Jahrestagung der Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie e.V. und der Schweizerischen Gesellschaft für Mikrozirkulation, Oktober 2009, Bern, Schweiz)

Nussbaum C, **Gloning A**, Pruenster M, Bierschenk S, Genzel-Boroviczény O, Sperandio M. Ontogeny of human PMN recruitment involves maturation of neutrophil and endothelial cell functions. *Eur J Pediatr* 2010;169:388

(46. Jahrestagung für pädiatrische Forschung, Februar 2010, Göttingen)

Nussbaum C, **Gloning A**, Krajewski N, Pruenster M, Genzel-Boroviczény O, Quakenbush E, von Andrian U, Frommhold D, Sperandio M. Neutrophil recruitment during fetal development.

(Fetal and Neonatal Physiology, Juli 2010, Winchester, Großbritannien)

Nussbaum C, **Gloning A**, Schmid S, Schweige N, Krajewski N, Pruenster M, Frommhold D, Genzel-Boroviczény O, Quakenbush E, von Andrian U, Sperandio M. Ontogeny of neutrophil recruitment in the murine and human fetus.

(45th Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation, April 2011, Kreta, Griechenland)

Nussbaum C, **Gloning A**, Pruenster M, Genzel-Boroviczény O, Sperandio M. Ontogeny of polymorphonuclear neutrophil recruitment in the human fetus and neonate.

(Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Immunologie, Mai 2011, Ittingen)

Poster

Nussbaum C, **Gloning A**, Pruenster M, Bierschenk S, Genzel-Boroviczény O, Sperandio M. Development of fetal neutrophil recruitment during human gestation.

(Neutrophil granulocytes revisited: International symposium on novel functions of neutrophil granulocytes, September 2009, Lübeck)

Gloning A, Nussbaum C, Pruenster M, Bierschenk S, Genzel-Boroviczény O, Sperandio M. Ontogenese der humanen Leukozytenrekrutierung: funktionelle Reifung von neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen in Abhängigkeit vom Gestationsalter.

(Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, Juni 2010, Saarbrücken)

Nussbaum C, **Gloning A**, Pruenster M, Bierschenk S, Genzel-Boroviczény O, Sperandio M. Ontogenetic regulation of human polymorphonuclear neutrophil recruitment.

(90. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, März 2011, Regensburg)

2 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. M. Sperandio und Frau Dr. med. C. Nußbaum durchgeführt. Die Patientenrekrutierung erfolgte in der Neonatologie der Universitätsfrauenklinik unter der Leitung von Frau Prof. Dr. med. O. Genzel-Boroviczény.

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei einigen Personen bedanken, ohne deren Hilfe die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. med. U. Pohl für die Aufnahme an das Walter-Brendel-Zentrum und den damit verbundenen Einstieg in die experimentelle Medizin.

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. M. Sperandio für die Aufnahme in sein Team, für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit und für das in mich gesetzte Vertrauen. Mit Geduld und Verständnis führte er mich an die Grundzüge wissenschaftlichen Denkens heran. Seine fachliche Kompetenz als akademischer Lehrer, seine Begeisterungsfähigkeit und Kreativität sowie seine herausragenden menschlichen Qualitäten haben mich tief beeindruckt und sind zugleich Vorbild und Ansporn für meinen weiteren Lebensweg.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. med. C. Nußbaum für ihre hervorragende Betreuung und Unterstützung in allen Phasen der Entstehung dieser Arbeit bedanken. Ihr außerordentliches Engagement, ihre Zuverlässigkeit und ihre Sorgfalt bei der Planung und Durchführung der Versuche haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Sie lehrte mich wissenschaftlich zu arbeiten, unterstützte mich bei der Durchführung der Experimente und regte mich dazu an, die Ergebnisse kritisch zu hinterfragen. In fachlichen wie persönlichen Belangen war sie mir jederzeit ein Vorbild und eine wertvolle Ansprechpartnerin. Für die bis heute andauernde freundschaftliche Verbundenheit danke ich ihr in besonderem Maße.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Frau Prof. Dr. med. O. Genzel-Boroviczény, die mir diese Arbeit vermittelte, mich in der Neonatologie der Frauenklinik exzellent

betreute und mir auf diesem Weg die klinische Neonatologie nahebrachte, wodurch mein zukünftiger beruflicher Werdegang erheblich beeinflusst wurde. Dank ihrer Unterstützung und dank des Einsatzes ihres neonatologischen Teams, wurde ich stets zuverlässig über anstehende Geburten von Frühgeborenen informiert und konnte eine große Zahl an Neugeborenen in die Studie einschließen.

Auch bei Frau Dr. M. Pruenster möchte ich mich herzlich für ihre zahlreichen fachkundigen Ratschläge und Ideen bei der Planung und Durchführung der Experimente bedanken. Insbesondere bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen unterstützte sie mich tatkräftig und ließ mich von ihren Erfahrungen profitieren. Für ihre geduldige Anleitung und das freundschaftliche Verhältnis bin ich ihr in besonderem Maße dankbar.

Unserer medizinisch-technischen Assistentin Frau S. Bierschenk möchte ich für ihren Ideenreichtum bei der Umsetzung der Versuche, für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und für ihre Unterstützung bei der Vorbereitung der Flusskammern danken.

Bei allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe möchte ich mich noch einmal ausdrücklich für die großartige, freundschaftliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Herrn Dr. J. Peters danke ich für die fachkundige und engagierte Beratung in allen statistischen Fragen.

Nicht zuletzt möchte ich meinem Freund A. Breunig für seine unermüdliche Hilfe bei der graphischen Gestaltung meiner Doktorarbeit danken. Ihm und meiner Familie danke ich außerdem für ihre liebevolle und grenzenlose Unterstützung auch in schwierigen Phasen dieser Arbeit.