

Aus der Universitäts-Kinderklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. C. P. Speer, FRCPE

**Veränderungen des fetalen Thymus
bei Chorioamnionitis
im Schafmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Kerstin Marisa Glogger
aus Augsburg

Augsburg, März 2012

Referent: Prof. Dr. Dr. med. Boris W. Kramer

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. rer.nat. Manfred Lutz

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 07.01.2013

Die Promovendin ist Fachärztin.

Für meine Eltern und meinen Bruder Holger

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Frühgeburtslichkeit und deren Ursachen.....	1
1.2 Pathogenese und Inzidenz der Chorioamnionitis	3
1.3 Chorioamnionitis als „Multiorganerkrankung“	5
1.3.1 Organveränderungen durch Chorioamnionitis.....	5
1.3.2 Reduktion des Atemnotsyndroms durch Chorioamnionitis	6
1.3.3 Zusammenhang von Chorioamnionitis und bronchopulmonaler Dysplasie	8
1.3.4 Immunsystem als Verbindungsglied der Inflamationsreaktionen in den Organen.....	9
1.4 Thymus.....	10
1.4.1 Thymusaufbau.....	10
1.4.2 Einteilung der T-Lymphozyten	11
1.5 Thymusinvolution.....	12
1.5.1 Physiologische Thymusinvolution.....	12
1.5.2 Akzidentelle Thymusinvolution	13
1.6 Tiermodell für Chorioamnionitis	13
1.7 Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	15
2 Methoden	17
2.1 Tierexperimentelles Studiendesign.....	17
2.2 Immunohistochemie	19
2.3 Auswertung der Schnitte	23
2.4 Statistische Analyse	23
3 Ergebnisse.....	24
3.1 Thymusgewicht.....	24
3.2 Lymphozyten im Nabelschnurblut.....	24
3.3 Kortisolkonzentration im fetalen Plasma.....	25
3.4 Expression von Kortikosteroidrezeptoren im Thymus.....	26
3.5 Apoptose im fetalen Thymus	27
3.6 Proliferation im fetalen Thymus	29
3.7 NF- κ B Färbung im fetalen Thymus.....	31

3.8	Verminderte FoxP3 Expression im Thymus nach intraamniotischer Endotoxingabe	32
4	Diskussion	34
5	Zusammenfassung.....	41
	Literaturverzeichnis	IV
	Danksagung.....	XVIII
	Lebenslauf	XIX

Abkürzungsverzeichnis

anti-PCNA	Antikörper gegen proliferating cell nuclear antigen
BSA	bovines Serumalbumin
Casp-3	Caspase-3 (cleaved cystein aspartate-specific protease)
CD	cluster of differentiation
CPAP	continous positive airway pressure
d	Tage
DAB	Diaminobenzidinlösung
Fas-	Ligand
Fox P3	forkhead box P3
g	Gramm
G1-Phase	gap-1 Phase der Mitose
G2-Phase	gap-2 Phase der Mitose
GR	Glukokortikoidrezeptor
GR α	Glukokortikoidrezeptor alpha
GR- β	Glukokortikoidrezeptor beta
h	Stunde
HRP	horse-raddish-peroxidase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IL-1 β	Interleukin-1 beta
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
kg	Kilogramm
Ki67	Protein und Marker für sich teilende Zellen
L	Liter
M	Molar
ml	Milliliter
mRNS	messenger-Ribonukleinsäure
mg	Milligramm
μ m	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid

NF- κ B	nuclear-factor-kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
*	Asterius
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
pH	pondus Hydrogenii
PBS	isotone phosphatgepufferte Salzlösung
Surfactant	surface active agent
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
Treg	regulatorische-T-Zellen

1 Einleitung

1.1 Frühgeburtlichkeit und deren Ursachen

Eine Schwangerschaft dauert normalerweise 40 Schwangerschaftswochen. Ein reifes Neugeborenes ist ein Kind, das ein Gestationsalter von 260 bis 293 Tagen hat, also zwischen der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche und dem Ende der 41. Schwangerschaftswoche geboren wird. Als Frühgeborene werden Kinder bezeichnet, die vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche zur Welt kommen. Sie sind in ihrer körperlichen und geistigen Entwicklung unreif und wiegen meist weniger als 2500g. Als Neugeborene mit extrem niedrigem Geburtsgewicht werden Kinder bezeichnet, die unter 1000g wiegen. Neugeborene mit einem Gewicht zwischen 1000g und 1500g haben ein sehr niedriges Geburtsgewicht und ab einem Gewicht von 1500g wird von einem niedrigen Geburtsgewicht gesprochen. In Deutschland kommen trotz verbesserter Betreuung von Schwangeren noch acht Prozent der Kinder zu früh zur Welt. Die Ursachen für eine Frühgeburt sind zahlreich. Als Risikofaktoren für eine Frühgeburt gelten Mehrlingsschwangerschaften, ein geringes oder fortgeschrittenes Alter der Mutter (unter 18 und über 40 Jahre), Alkohol-, Nikotin- und Drogenabhängigkeit, Infektionen, Bluthochdruck und Diabetes, aber auch die Pränataldiagnostik und die allgemeine gesundheitliche Verfassung sowie Lebensumstände wie Stress, Bildungsgrad und niedriger sozioökonomischer Status (Berger et al., 1999), (Goldenberg et al., 2008).

Auch Erkrankungen des Feten können eine Frühgeburt auslösen oder dafür verantwortlich sein, dass eine Frühgeburt medizinisch notwendig wird, um weiteren Schaden von der Mutter und/ oder dem Kind abzuwenden. Intrauterine Infektionen, ein vorzeitiger Blasensprung, eine Prä-Eklampsie mit Ödemen, Bluthochdruck und Eiweißausscheidung oder das HELLP-Syndrom, welches durch eine hämolytische Anämie, erhöhte Leberwerte und eine Thrombozytopenie gekennzeichnet ist, sind neben genetischen Faktoren eine Prädisposition für eine Frühgeburt (Goldenberg et al., 2008) (Menon, 2008). Hauptverursacher einer intrauterinen Infektion sind gering virulente Bakterien wie Ureaplasmen (Goldenberg et al., 2000) (Faye-Petersen, 2008). Sie

aszendieren über den Genitaltrakt und können eine Chorioamnionitis verursachen. Eine Chorioamnionitis ist daher eine meist bakterielle Infektion der Eihäute und des Fruchtwassers (Goldenberg et al., 2000) (Redline 2006).

1.2 Pathogenese und Inzidenz der Chorioamnionitis

Eine Chorioamnionitis ist eine bakterielle Infektion der Eihäute und des Fruchtwassers (Goldenberg et al., 2000) (Redline, 2006).

In klinischen und epidemiologischen Studien wird beschrieben, dass die Inzidenz einer Chorioamnionitis bei vor der 24. Schwangerschaftswoche geborenen Kindern etwa 60% beträgt und mit zunehmendem Gestationsalter sinkt. In der 34. Schwangerschaftswoche beträgt sie nur noch knapp 20% (Goldenberg et al., 2000).

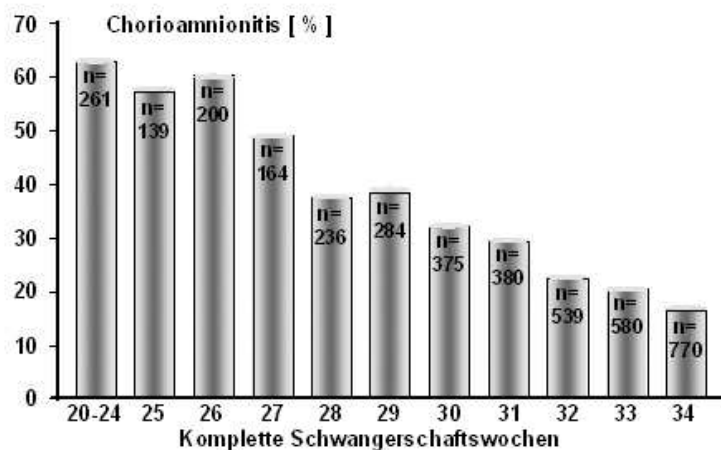


Abbildung 1–1: Inzidenz der Chorioamnionitis bei Frühgeborenen (University of Sydney, Australien). Plazentagewebe wurde histologisch untersucht. Angabe der Inzidenz mit Anzahl der untersuchten Proben nach Gestationsalter (Lahra et al., 2004).

Die Pathogenese einer Fruchtwasserinfektion oder einer Infektion der Eihäute ist bisher nur unzureichend geklärt (Kramer, 2005). Durch Amniozentesen, die vor der 22. Schwangerschaftswoche zu genetischen Untersuchungen durchgeführt wurden, konnten in 15% der Fälle positive Bakterienkulturen nachgewiesen werden. Die bakterielle Besiedelung führte nicht zwingend zu einer vorzeitigen Beendigung der Schwangerschaft (Steel et al., 2005) (Gerber et al., 2003), (Perni et al., 2004). Die Prognose der Frühgeborenen korrelierte jedoch mit den in der Amnionflüssigkeit gemessenen Zytokinkonzentrationen (IL-1 β , TNF- α) (Gerber et al., 2003), (Perni et al., 2004) (Yoon et al., 2000). Steel und Kollegen zeigten in ihren Untersuchungen, dass der molekulare

Nachweis von Bakterien in der Plazenta auch möglich ist, ohne dass eine Entzündungsreaktion auftritt (Steel et al., 2005). Den Beginn einer bakteriellen Infektion daher sicher zu bestimmen ist ein Problem aller klinischen Untersuchungen in diesem Gebiet. Auch in den Eihäuten von durch Kaiserschnitt termingerecht entbundenen Kinder konnten Bakterien nachgewiesen werden (Kramer et al., 2005). Ob die Bakterien in diesen Fällen aktiv das Immunsystem des Feten hemmten oder die Entzündungsreaktion aufgrund der Unreife des fetalen Immunsystems unterblieb ist noch unklar (Kramer et al, 2005).

Eine Chorioamnionitis kann akut oder chronisch verlaufen. Meist verläuft sie chronisch ohne klinische Symptome und bleibt unbemerkt. Schreitet die Infektion fort entsteht eine fetale systemische Inflammationsreaktion, die histologisch als Omphalovaskulitis oder biochemisch durch einen Anstieg von Entzündungsparametern im fetalen Serum nachgewiesen werden kann (Kramer et al. 2007). Bei der Mutter kann die Chorioamnionitis eine systemische Entzündungsreaktion mit Fieber, Leukozytose und Anstieg der Entzündungsproteine induzieren. Die systemische Entzündung der Mutter wird als Amnioninfektionssyndrom bezeichnet. Der Fetus wird bei Auftreten eines Amnioninfektionssyndroms frühzeitig geboren (Goldenberg et al., 2000). Aber auch die Omphalovaskulitis ist bedeutsam, da sie im Vergleich zu einer alleinigen Chorioamnionitis die fetale beziehungsweise neonatale Morbidität dramatisch erhöht (D'Alquen et al., 2005). Die entstandene Entzündungsreaktion bei der Mutter und dem Feten sowie dadurch ausgelöste langfristige Veränderungen im Abwehrsystem sind sowohl aus wissenschaftlicher Sicht für Neonatologen und Gynäkologen als auch aus praktischer Sicht für die klinische Therapie Frühgeborener von Interesse. Inwieweit ein Zusammenhang zwischen Frühgeburtlichkeit, Chorioamnionitis und der Entwicklung von chronischen Erkrankungen besteht wird derzeit in einer prospektiven Studie anhand von zum Beispiel Asthma untersucht (Kumar et al., 2008).

1.3 Chorioamnionitis als „Multiorganerkrankung“

Die Veränderungen, die durch eine Chorioamnionitis induziert werden, sind komplex. Da viele Organe durch die vorgeburtliche Entzündung angegriffen werden können, kann die Chorioamnionitis auch als „Multiorganerkrankung des Feten“ bezeichnet werden (Kramer, 2008) (Bashiri et al., 2006) (Damann et al., 2000) (Damann et al., 2006) (Wolfs et al., 2009).

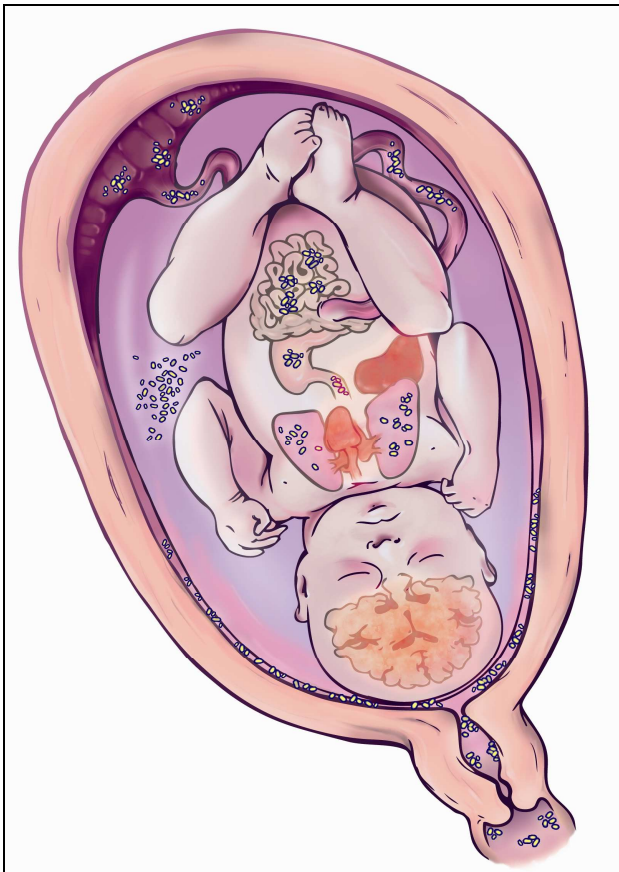


Abbildung 1–2: Darstellung des Feten im Uterus und der möglicherweise beteiligten Strukturen einer Infektion von vaginal über das Chorioamnion bis zur Entzündung verschiedener Organe (modifiziert nach Goldenberg et al., 2000).

1.3.1 Organveränderungen durch Chorioamnionitis

Klinische und experimentelle Daten zeigen, dass die vorgeburtliche Auseinandersetzung mit einer Entzündung Vor- und Nachteile für den Feten haben kann. Auf der einen Seite werden Veränderungen eingeleitet, die nach der Geburt die Anpassung des Frühgeborenen verbessern und die

Überlebenschancen erhöhen. Die Lunge reagiert unter anderem mit einer erhöhten Produktion von Surfactant auf eine Chorioamnionitis, was das Entstehen eines Atemnotsyndroms nach der Geburt verhindern kann, wie im folgenden weiter diskutiert wird. Auf der anderen Seite wird die Organentwicklung, vor allem die Entwicklung der Lunge beeinträchtigt (Shim et al., 2004). Auch perinatale Hirnschäden, die im Kinder- und Erwachsenenalter zu chronischen neurologischen Störungen führen, können auf eine antenatale Infektion des Chorioamniotons zurückgeführt werden (Berger et al., 1999) (Garnier, 2004) (Garnier et al., 2004). Mentale Retardierung aber auch Sprachentwicklungsstörungen und Hörschädigungen werden als Folge einer Chorioamnionitis beschrieben (Berger et al., 1999). Die genaue Rolle der Chorioamnionitis bei einer Schädigung in der Entwicklung des Gehirns wird kontrovers dargestellt. Ein Zusammenhang mit der Entwicklung einer infantilen Zerebralparese wird jedoch beschrieben (Bersani et al., 2012). Dabei stellt die Chorioamnionitis einen Faktor dar, der die Anfälligkeit des noch unreifen Gehirns gegenüber intrauterinem Sauerstoffmangel erhöht (Sarkar et al., 2005).

1.3.2 *Reduktion des Atemnotsyndroms durch Chorioamnionitis*

Auf die Lungenreifung hat die Entzündung einen positiven Effekt. Sie wirkt als Stimulus in utero auf die fetale Lunge, deren Surfactantsystem insbesondere in Kombination mit mütterlicher Glukokortikoidgabe schneller reift (Speer CP, 2011). Eine Chorioamnionitis kann durch Induktion der Synthese der grenzflächenaktiven Substanz Surfactant (Jobe et al., 2000) und durch Verschmälerung der fetalen Alveolarsepten und damit Verringerung der Diffusionsbarriere einen erleichterten Gasaustausch bewirken und zur Reduktion des lebensbedrohlichen Atemnotsyndroms beitragen (Kramer et al., 2007). Das Atemnotsyndrom beruht auf der Unreife der Lunge und dem Surfactantmangel. Die Mortalität Frühgeborener aufgrund eines Atemnotsyndroms wird auf etwa 60% geschätzt und war bis zur Einführung der Surfactanttherapie und der mütterlichen Gabe von Glukokortikoiden die häufigste Todesursache (Halliday, 2005) (Zimmermann et al., 2005). Bei drohender Frühgeburt wird die fetale Lungenreifung derzeit durch Therapie der

Mutter mit Glukokortikoiden induziert. Hierdurch findet innerhalb von 48 Stunden eine Lungenreifung statt. Als Lungenreifung werden ein erhöhter Metabolismus und die vermehrte Freisetzung von Surfactant in die Alveolen verstanden (Bunt et al, 1999) (Cogo et al., 2003) (Willet et al., 2000). Nach der Geburt erhält das Frühgeborene möglicherweise eine Surfactanttherapie (Speer et al., 1994). Da vor allem sehr unreife Neugeborene ein geringeres Ansprechen auf die Surfactanttherapie zeigen, wird diese gegebenenfalls in höherer Dosis oder wiederholt angewendet (Speer 2011). Dabei scheint die Surfactanttherapie bei vielen Kindern die Oxygenierung und die Lungenfunktion bei Atemnotsyndrom zu verbessern ohne dass ersichtliche Nebenwirkungen auftreten (Wirbelauer et al., 2009). Durch die Surfactantgabe konnte die Mortalität Frühgeborener um etwa 40% und das Auftreten eines Pneumothorax um 50-70% gesenkt werden (Speer et al., 1994).

Frühgeborene wurden in den letzten zehn Jahren zunehmend durch continuous positive airway pressure (CPAP) unterstützt. Dadurch konnte die Intubationsrate und Surfactantgabe reduziert werden (Stevens et al., 2004). Der hohe endexpiratorische Druck des CPAP wirkt sich positiv auf die Aktivität des Surfactant aus (Michna et al., 1999). Eine klinische Studie zeigt, dass das Risiko an einem Atemnotsyndrom zu erkranken bei Vorliegen einer Chorioamnionitis für Frühgeborene erniedrigt ist (Watterberg et al., 1996). Einen kurzfristigen positiven Effekt hat eine histologisch nachweisbare aber nicht klinisch imponierende Chorioamnionitis auf Inzidenz und Schwere eines Atemnotsyndroms (Thomas et al., 2011). Dass eine Chorioamnionitis bedeutende Auswirkungen auf die Mortalität und Morbidität von Frühgeborenen hat, wurde auch durch die EPICure Studie verdeutlicht, die in Großbritannien und Irland durchgeführt wurde. Es wurden Kinder, die zwischen der 20. und der 25. +6 Schwangerschaftswoche geboren wurden im Alter von 24 Monaten nachuntersucht (Costeloe et al., 2000) (Wood et al., 2000), (Wood et al., 2003) (Wood et al., 2005). Als unabhängiger Risikofaktor für das Versterben von 61% der untersuchten Frühgeborenen galt das Fehlen einer Chorioamnionitis.

Andere Faktoren, wie männliches Geschlecht, fehlende Steroidtherapie der Mutter antenatal zur Induktion der Lungenreifung und ein hoher Punktwert bei

der Erfassung des klinischen Zustandes des Kindes (englisch: clinical risk index for babies) stellten ebenfalls unabhängige Risikofaktoren für das Versterben dar.

Dass Frühgeborene, die einer Chorioamnionitis ausgesetzt waren, seltener ein Atemnotsyndrom entwickeln als Frühgeborene, bei deren Müttern histologisch keine Chorioamnionitis festgestellt wurde, postulieren auch Watterberg und Kollegen (Watterberg et al., 1996). Andererseits führt das Vorliegen einer Chorioamnionitis zu einem schlechteren Ansprechen auf eine Surfactanttherapie, falls eine alleinige Versorgung des Babys mit CPAP nicht ausreicht (Been et al., 2010).

1.3.3 *Zusammenhang von Chorioamnionitis und bronchopulmonaler Dysplasie*

Als bronchopulmonale Dysplasie wird eine Erkrankung Frühgeborener bezeichnet, die mit radiologischen Veränderungen der Lunge und einem erhöhten Sauerstoffbedarf einhergeht (Jobe et al., 2001). Es wird davon ausgegangen, dass die bronchopulmonale Dysplasie durch eine chronische Entzündungsreaktion in den Atemwegen Frühgeborener zustande kommt (Speer 2006). Eine multifaktorielle Genese durch Volu- oder Barotrauma der Lunge, durch Reanimation, mechanische Beatmung oder Sauerstofftoxizität wird neben der Chorioamnionitis als Ursache diskutiert (Schmidt et al., 2001) (Groneck et al., 1994) (Speer, 2001). Watterberg und Kollegen postulierten neben einer verminderten Inzidenz eines Atemnotsyndroms bei vorliegender Chorioamnionitis ein vermehrtes Auftreten einer bronchopulmonalen Dysplasie (Watterberg et al., 1996). Die von Watterberg und Kollegen untersuchten Babys wurden beatmet und erhielten weder eine Surfactanttherapie noch wurden die Mütter mit Steroiden zur Lungenreifung behandelt (Been et al., 2010). In darauffolgenden Kohortenstudien konnte kein direkter Zusammenhang zwischen einer Chorioamnionitis und einer bronchopulmonalen Dysplasie hergestellt werden (Been et al., 2010).

1.3.4 *Immunsystem als Verbindungsglied der Inflammationsreaktionen in den Organen*

Die genauen Effekte, die eine intrauterine Entzündungsreaktion auf die Entwicklung des Immunsystems des Feten und damit langfristig auf die Abwehrleistung des Kindes haben kann, sind bisher nur unvollständig untersucht. Wirbelauer und Kollegen beschreiben bei vorhandener Omphalovaskulitis eine erhöhte Interleukin-10 Genexpression in Nabelschnurblutmonozyten bei Kindern, die vor der 32 Schwangerschaftswoche geboren wurden. Diese kann zu einer Modulation der postnatalen Immunreaktion führen (Wirbelauer et al., 2011). So könnte das fetale Immunsystem als Verbindungsglied zwischen den bei einer Chorioamnionitis betroffenen Organen fungieren (Kramer 2008).

1.4 Thymus

1.4.1 Thymusaufbau

Der Thymus spielt in der Entwicklung des Immunsystems eines Kindes nach der Geburt eine große Rolle und ist deshalb schon bei der Geburt als wichtiges Abwehrorgan voll ausgebildet.

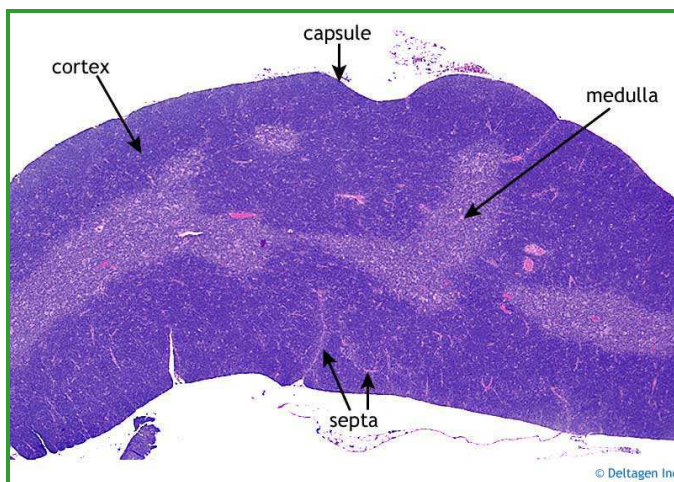


Abbildung 1–3: Der Thymus wird in Rinde (cortex) und Mark (medulla) unterteilt. Die Rinde wird von einer Kapsel (capsule) umgeben, die aus kollagenem Bindegewebe besteht. Von der Kapsel gehen Bindegewebssepten (septa) aus, die die Rinde unterteilen. Diese Septen sind Ein- und Austrittsort von Gefäßen und Nerven. (Welsch, Lehrbuch für Histologie, Urban und Fischer Verlag)

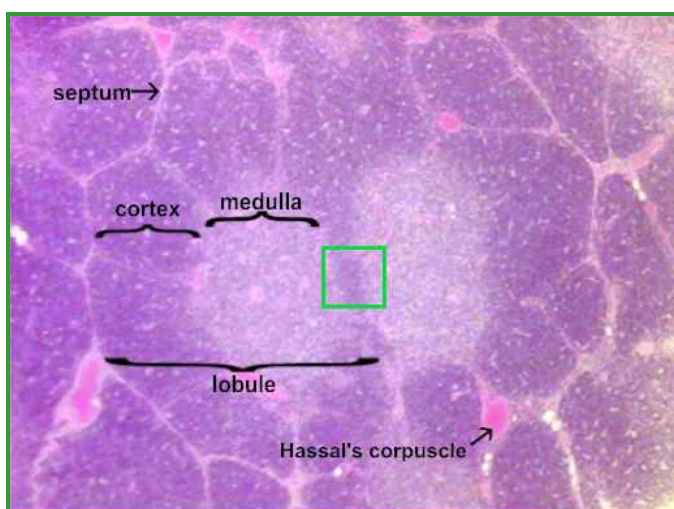


Abbildung 1–4: Vergrößerte Darstellung des Thymus. Ein Läppchen (lobule) besteht aus einer äußeren Rindenzone (cortex) und einer Markzone (medulla). (nach Welsch, Lehrbuch für Histologie, Urban und Fischer Verlag).

Das Thymusparenchym besteht aus einem Netzwerk von Epithelzellen und Lymphozyten und wird in eine Rinden- und eine Markregion unterteilt. Das Grundgerüst der Thymusrinde besteht aus Epithelzellen. Unter der Kapsel und an den Innenseiten der Septen sowie über den eintretenden Blutgefäßen bilden die Epithelzellen eine lückenlose einschichtige Blut-Thymus-Schranke. Die von den Epithelzellen abgegebenen Hormone bewirken die Proliferation und Prägung der T-Zellen. Die Blut-Thymus-Schranke fungiert dabei als Barriere für Antigene. In der Rinde gehen durch negative Selektion potentiell autoreaktive Lymphozyten zugrunde. Sie werden von Makrophagen aufgenommen, die einen Wall an der Rinden-Mark-Grenze bilden. Im Markraum sind die Lymphozyten weniger dicht gelagert. Dadurch entsteht das Bild der helleren Färbung. Im Mark werden auch Hassall'sche Körperchen gefunden, deren Funktion bisher ungeklärt ist (Hahn et al., 2000).

1.4.2 Einteilung der T-Lymphozyten

Alle T-Lymphozyten exprimieren Oberflächenmarker anhand derer sie in Subpopulationen unterteilt werden. Funktionell werden die T-Lymphozyten in T-Helferzellen (CD4+), die die Immunantwort verstärken, regulatorische T-Zellen (CD4+, CD25+, CD62+), die die Immunantwort dämpfen und zytotoxische T-Zellen (CD8+) eingeteilt. Letztere wandern an den Ort der Entzündung und zerstören dort durch enzymatische Perforation, den Tumor-Nekrose-Faktor oder einen exprimierten Fas-Liganden extra- und intrazelluläre Bakterien oder entartete Körperzellen. Kommt der fetale Atem- oder Darmtrakt in Kontakt mit einem Endotoxin führt dies zu einem Anstieg der Zahl der CD4+CD25+Zellen und zu einer anteilmäßigen Änderung der CD4+ und CD8+Zellen im Thymus (Wolfs et al., 2009) (Kramer et al., 2010). Natürliche regulatorische T-Lymphozyten (Treg Lymphozyten) stellen eine Subgruppe der CD4+T-Helferzellen dar. Etwa 5-10% des peripheren CD4+T-Zellrepertoires werden von natürlichen vorkommenden regulatorischen T-Zellen gebildet (Gückel, 2010). Sie reifen im Thymus, regulieren die Immunantwort indem sie die T-Zell-Effektorantworten supprimieren und sind außerordentlich wichtig um die periphere Toleranz aufrechtzuerhalten (Sakaguchi et al., 2008).

Treg Lymphozyten spielen bei der Entwicklung verschiedenster Krankheiten, wie Infektionen, Autoimmunerkrankungen, Allergien und Asthma eine Rolle (Piccirillo, 2008) (Allan et al., 2008). Es wird angenommen, dass Treg Lymphozyten sowohl nützliche als auch schädliche Effekte haben können. Deshalb ist es von großem Interesse die genauen Wirkungsmechanismen der Treg Lymphozyten zu verstehen. Ein großer Fortschritt in der Analyse von Treg Lymphozyten gelang mit der Identifizierung des Transkriptionsfaktors forkhead box P3. Er gehört zu den forkhead Proteinen, die mit der Fox-Familie eine eigenständige Familie von Transkriptionsfaktoren bildet, die viele zelluläre Differenzierungsprozesse steuert (Lehmann et al., 2003): Er wird für die Entwicklung, Erhaltung und Funktion der Treg Lymphozyten benötigt. Es wird postuliert, dass FoxP3 der Hauptregulator von Treg Lymphozyten ist (Li B et al., 2008). Es gibt neben den FoxP3-abhängigen CD4+CD25+-Treg-Zellen jedoch auch FoxP3 unabhängige regulatorische CD4+ Zellen (Ocklenburg, 2005). Zusammenfassend stellt die Entwicklung und Selektion der T-Lymphozyten im Thymus einen komplexen Prozess dar, der während der fetalen und postnatalen Periode von endogenen und exogenen Stimuli beeinflusst wird (Ciofani et al., 2007).

1.5 Thymusinvolution

1.5.1 Physiologische Thymusinvolution

Bereits in der Pubertät findet die Thymusinvolution statt. Dabei bilden sich Thymusrinde und Mark zurück, periseptales und interstitielles Fett- und Bindegewebe vermehren sich. Die Anzahl an Lymphozyten nimmt ab. Das Rinden-Mark-Verhältnis des Thymus verschiebt sich zugunsten des Markanteils. Bestanden beim Neugeborenen noch 60% des Thymus aus Rinde, beträgt der Rindenanteil eines 70-jährigen nur noch 30%. Auch eine Verschiebung des Verhältnisses zwischen Parenchym und Mesenchym zugunsten des Mesenchyms findet über die Jahre statt. Beim Neugeborenen beträgt das Verhältnis noch 5:1, beim 20-jährigen hat es sich schon auf 3:2 verschoben. Beim 40-jährigen beträgt es 1:40 (Otto, 1998). Wie jedoch diese

physiologische Thymusinvolution in ihren molekularen Mechanismen genau abläuft wird weitestgehend noch nicht verstanden.

1.5.2 Akzidentelle Thymusinvolution

Neben der physiologischen Thymusinvolution kann es auch zu einer akzidentellen Thymusinvolution kommen. Diese wird auch als Streßinvolution oder Hyperinvolution bezeichnet und kann akut oder chronisch verlaufen. Steroide induzieren dabei den Zelltod kortikaler Thymozyten. Im Markbereich findet die akzidentelle Thymusinvolution nur geringfügig statt, da die dort vorliegenden reifen B- und T-Lymphozyten gegen Steroide resistent sind (Otto, 1998). Da Steroide in hohem Maße den Zelltod kortikaler Lymphozyten induzieren, ist auch die mütterliche Steroidgabe bei drohender Frühgeburt mit Auswirkungen auf das Immunsystem des Feten verbunden. Aronson hat die Hypothese aufgestellt, dass Glukokortikoide in unreifen Thymozyten eine Apoptose induzieren und so zur Thymusinvolution beitragen können (Aronson, 1989). Die Möglichkeit der Erholung von diesen Prozessen ist wichtig für die Funktion des Immunsystems im weiteren Leben (Elmore, 2006).

1.6 Tiermodell für Chorioamnionitis

Von Jobe und Kollegen wurde mit Schafen ein Tiermodell entwickelt um die fetale Lungenreifung beziehungsweise die Einflüsse einer Chorioamnionitis auf die Lungenentwicklung in vivo zu studieren (Jobe et al., 2000) (Willett et al., 2000) (Kallapur et al., 2001) (Kramer et al., 2001). Das Schaf zeigt in den einzelnen Phasen der Lungenentwicklung, bezogen auf das Gestationsalter, die gleiche Abfolge wie der Mensch. Dies macht es zu einem idealen Tiermodell für die Erforschung der Lungenentwicklung (Pringle, 1986). Die einzelnen Phasen der Proliferation und Differenzierung der Lunge wurden histologisch untersucht (Burri, 2006). Während beim Menschen die Ausbildung der Alveolen in der Lunge bereits gegen Ende der Schwangerschaft beginnt, bilden sich zum Beispiel bei Nagetieren die ersten Alveolen erst nach der Geburt aus (Pringle, 1986). Daher eignen sich Nagetiere, im Gegensatz zum Schaf, nicht als Tiermodell zur Untersuchung der Lungenentwicklung nach intrauteriner

Inflamationsreaktion oder nach Frühgeburt. In dem für die vorliegende Arbeit verwendeten Modell wurde eine Chorioamnionitis mittels intraamniotischer Injektion des Endotoxins von *Escherichia coli* ausgelöst (Jobe et al., 2000) (Willet et al., 2000) (Kallapur et al., 2001). Im Chorioamnion konnte bereits fünf Stunden nach Injektion des Endotoxins eine Erhöhung der messenger Ribonukleinsäure (mRNS) und der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 β , IL-6 und IL-8 festgestellt werden (Kallapur et al., 2001). Bereits sieben Tage nach der Injektion des Endotoxins war die Lungenfunktion der durch Kaiserschnitt geborenen Lämmer verbessert. Dies konnte durch lungenphysiologische Parameter, die Größe des Surfactantpools und die Beatmungseffizienz gezeigt werden (Jobe et al., 2000). Nach der Injektion des Endotoxins kam es zu einer Abfolge pulmonaler Veränderungen, wie in Abbildung 1-5 dargestellt.

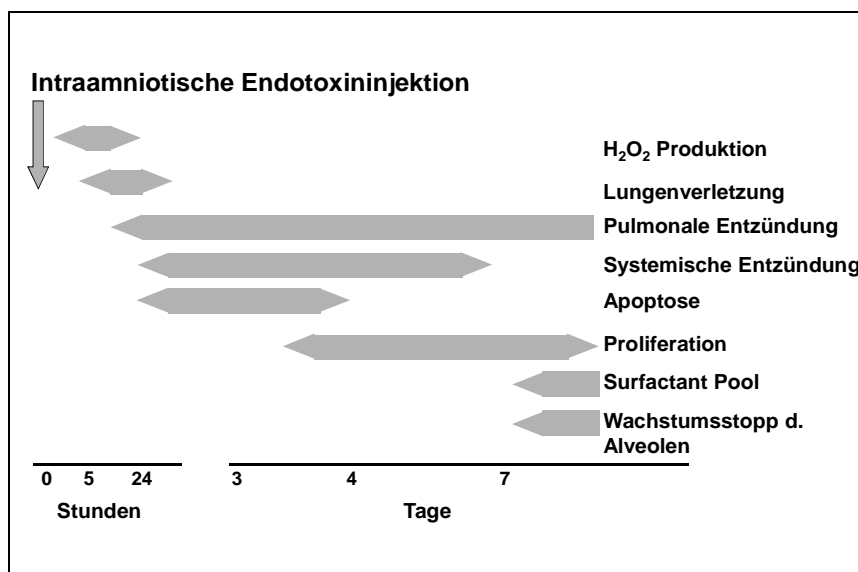


Abbildung 1–5: Zeitliche Abfolge der pulmonalen Veränderungen nach intraamniotischer Injektion einer einzelnen Dosis des *Escherichia coli* Endotoxins (zusammengefasst nach Kramer et al., 2001, Kramer et al., 2002 und Kramer 2008).

Bei den frühgeborenen Lämmern war sieben Tage nach Injektion des Endotoxins in die Amnionflüssigkeit ein Stopp des Wachstums der Alveolen zu verzeichnen (Willet et al., 2000). Der in Abbildung 1-5 dargestellte Ablauf, der durch die Chorioamnionitis induzierten pulmonalen Inflammation, ähnelt dem

einer Lungenverletzung in erwachsenen Tiermodellen. Aktivierte Monozyten und neutrophile Granulozyten produzierten nach der intraamniotischen Injektion von Endotoxin in den Luftwegen Sauerstoffradikale, die zur Bildung von nachweisbarem Wasserstoffperoxid führten. Das produzierte Wasserstoffperoxid kann insbesondere bei Frühgeborenen, bei denen die antioxidativen Schutzmechanismen beeinträchtigt sind eine Lungenverletzung einleiten. Mittels Nachweis von PCNA konnte eine erhöhte Zellproliferation in der fetalen Lunge nach drei Tagen, und somit vor dem Einsetzen der Lungenreifung nachgewiesen werden. Ein erhöhter Surfactantpool konnte sieben Tage nach der Endotoxinapplikation festgestellt werden. Innerhalb einer Woche nach einer Chorioamnionitis, ausgelöst durch eine einzige Injektion von *Escherichia coli* Endotoxin, lag eine pulmonale Entzündungsreaktion mit einer veränderten Lungenstruktur entsprechend einer bronchopulmonalen Dysplasie vor. Eine systemische Entzündungsreaktion wurde induziert. Die Effekte der Entzündung auf den Thymus sind unklar. Dieses Tiermodell erfüllt den Anspruch klinische Beobachtungen, wie zum Beispiel die Lungenreifung nach Chorioamnionitis, immunohistochemisch beziehungsweise histologisch nachzuvollziehen. Auch die Reduktion der Anzahl der Alveolen nach längerer Exposition gegenüber inflammatorischer Stimuli wird in diesem Modell abgebildet (Willet et al., 2000). Daher eignet sich das Tiermodell um den Effekt einer, durch das Endotoxin von *Escherichia coli* induzierten, Chorioamnionitis auf den fetalen Thymus zu untersuchen.

1.7 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine durch das Endotoxin von *Escherichia coli* induzierte Chorioamnionitis bei frühgeborenen Lämmern Veränderungen des fetalen Thymus verursacht. Dabei wurden neben dem Thymusgewicht und feingeweblicher Analyse des Thymus die Anzahl der zirkulierenden Lymphozyten und die Kortisolkonzentration im Nabelschnurblut der Tiere bestimmt. Bei der feingeweblichen Untersuchung des Thymus wurden apoptotische Zellen, proliferierende Zellen und der Transkriptionsfaktor FoxP3 untersucht. Apoptotische Zellen wurden durch aktivierte Caspase-3 detektiert;

Zellen, die sich in der Proliferation befanden mit Ki-67 beziehungsweise PCNA markiert. Die Apoptoserate, die Zellproliferation und die Expression von NF- κ B, FoxP3 sowie der Glukokortikoidrezeptoren im fetalen Thymus wurde gemessen.

Es wurde die Hypothese untersucht, dass durch eine Chorioamnionitis Apoptose in Thymozyten induziert wird. Durch die Messung der Lymphozytenanzahl im Blut wurde untersucht, ob eine Ausschwemmung der Lymphozyten in die Blutbahn stattfindet. Eine Zellproliferation nach vorausgegangener Verletzung kann zur Wiederherstellung des Thymusgewichts beitragen, was durch Färbung für Proliferationsmarker untersucht wurde. Die Anzahl regulatorischer T-Zellen wurde durch FoxP3 eruiert. Durch die Abnahme von regulatorischen T-Lymphozyten, die durch den Transkriptionsfaktor FoxP3 gekennzeichnet sind, änderte sich die Zusammensetzung der im Thymus vorhandenen Zellen.

2 Methoden

2.1 Tierexperimentelles Studiendesign

Die Tierversuche wurden in Perth, Australien durchgeführt. Sie wurden vom Department of Agriculture in Western Australia, genehmigt. Die Versuchsprotokolle wurden dem Tierschutzbeauftragten der Universität Würzburg vorgelegt.

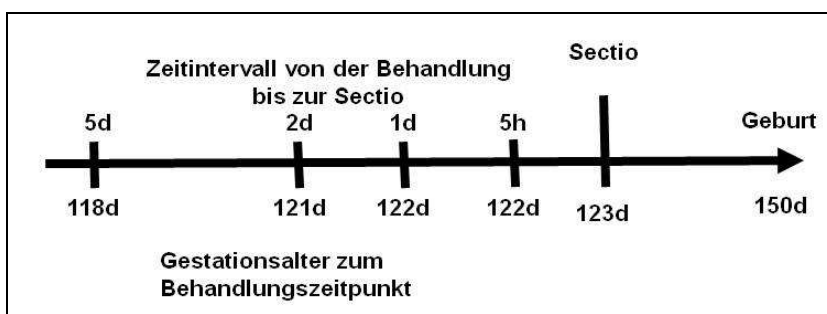


Abbildung 2–1: Studiendesign des Tierexperimentes. Die normale Tragezeit beträgt 150 Tage. Die Sectio caesarea wurde bei allen Tieren im Alter von 123 Tagen durchgeführt.

Die Tiere waren mit einem Feten trächtig. Das Gestationsalter war zum Zeitpunkt der Sectio caesarea gleich. Die trächtigen Schafe wurden in vier Gruppen mit vier bis sieben Versuchstieren unterteilt. Fünf Tage, zwei Tage, einen Tag beziehungsweise fünf Stunden vor der Entbindung wurde den Muttertieren 10mg Endotoxin (*Escherichia coli* 055:B5, Sigma, St Louis, MO) intraamniotisch verabreicht. Die Gruppe, die fünf Stunden vor der Entbindung die Injektion erhielt bestand aus sieben Tieren; sechs Tiere erhielten die Injektion einen Tag vor der Sectio caesarea. Weitere vier Tiere erhielten die Injektion zwei Tage und sechs Tiere fünf Tage vor der Entbindung.

Die Kontrollgruppen bestanden aus insgesamt acht Tieren, von denen jeweils zwei Tieren entweder fünf Stunden, einen Tag, zwei Tage oder fünf Tage vor der Entbindung 10 mg einer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) in die Amnionflüssigkeit gespritzt wurden. Da es zwischen den Kontrolltieren, die die Kochsalzinjektionen zu verschiedenen Zeitpunkten erhielten keine Unterschiede

gab, wurden alle Tiere zu einer Kontrollgruppe zusammengefasst. Diese Daten werden hier nicht aufgeführt. Vor dem Auslösen einer Chorioamnionitis durch die Endotoxininjektion wurde den Mutterschafen Betamethason intramuskulär injiziert. Damit wurde die Situation Frühgeborener nachgebildet, die in der Regel einer pränatalen Steroidtherapie der Mutter ausgesetzt waren (Goldenberg et al., 2000) (Lahra et al., 2004) (Goldenberg et al., 2001). In unserer Studie wurde das Endotoxin von gramnegativen *E. coli* (*Escherichia coli*, Serotyp 055:B5) zur Auslösung einer Entzündungsreaktion verwendet. Das Endotoxin, das auch als Lipopolysaccharid bezeichnet wird, ist Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien. Über einen Lipidanteil wird es in der äußeren Zellmembran verankert. Der Kernpolysaccharidanteil besteht aus verschiedenen Zuckern und die O-spezifische Polysaccharidkette aus Einheiten von drei bis acht Zuckern. Für die toxische Wirkung des Bakteriums ist das Lipid A verantwortlich. Es stimuliert über Makrophagen die Bildung und Ausschüttung von Zytokinen, die zu Fieber, Gerinnungsaktivierung, Stimulation der Granulopoese und Blutdruckabfall führen. Die Entzündungsreaktion verursacht das Endotoxin in vielen Zellen, indem es über Toll-like-Rezeptoren den Proteinkomplex NF- κ B aktiviert und so die Kaskade der Entzündungsreaktion in Gang bringt (Kramer 2008).

Alle Injektionen in die Amnionflüssigkeit wurden an den Schafen ultraschallgesteuert (Aloka SSD 500; Aloka Co, Ltd) durchgeführt. Zusätzlich wurden die Elektrolytwerte in aspirierter Amnionflüssigkeit gemessen, um sicherzustellen, dass die Amnionhöhle und nicht die Allantoishöhle punktiert wurde (Jobe et al., 2000) (Willet et al., 2000) (Kallapur et al., 2001). Die induzierte Chorioamnionitis wurde über gestiegene IL-1 β , IL-6 und IL-8 mRNA in Zellen der Amnionflüssigkeit, die erhöhte Zahl an Entzündungszellen und eine histologische Entzündungsreaktion des Chorioamnioms nachgewiesen (Kramer et al., 2001).

Es wurden Veränderungen des Thymusgewichts zwischen fünf Stunden und fünf Tagen nach Applikation eines Endotoxin untersucht. Den Tieren wurde das Endotoxin fünf Tage, zwei Tage, einen Tag oder fünf Stunden vor der Sectio

caesarea, wie bereits bei Kallapur und Kollegen beschrieben (Kallapur et al., 2003), injiziert.

Zur Durchführung der Sectio caesarea erhielten die Mutterschafe 20 mg Ketamin pro kg Körpergewicht und Xylazine (0,1 mg/kg Körpergewicht) intramuskulär. Dann wurde eine spinale Anästhesie mit 3 ml Lidocain 2% durchgeführt. Die Lämmer wurden entbunden und gewogen. Nabelschnurblut wurde gewonnen, um ein komplettes weißes Blutbild erstellen und die Kortisolwerte messen zu können (Kallapur et al., 2003). Den Lämmern wurde eine letale Dosis von 100 mg Phenobarbital pro Kilogramm Körpergewicht über die Nabelvene verabreicht. Um den Thymus zu entnehmen, wurde der Brustkorb eröffnet. Der native Thymus wurde isoliert, gewogen und in Paraffin eingebettet.

2.2 Immunohistochemie

Die in Paraffin eingebetteten Thymusbiopsien wurden am Microtom 2 µm dünn geschnitten, in destilliertem Wasser aufgefangen und in einem 55° Celsius warmen Wasserbad gestreckt. Danach wurden zwei bis vier Schnitte auf einen sialinisierten Objektträger (APES, 3-amino-propyltriethoxy-silane; Roth, Karlsruhe, Deutschland) aufgezogen und 30 Minuten bei 56° Celsius getrocknet. Bis zur Färbung wurden die Präparate im Kühlschrank bei 4° Celsius aufbewahrt.

Vor der Färbung wurden die Schnitte eine Stunde in einem Wärmeschrank bei 60° Celsius erwärmt, um das Paraffin zu verflüssigen. Nach mindestens zehnminütigem Abkühlen bei Raumtemperatur wurden die Schnitte für 20 Minuten unter dem Abzug in Xylol gebadet, um sie zu deparaffinisieren. Um die Schnitte an das wässrige Färbemilieu anzupassen, wurde danach eine Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte zuerst für zweimal zwei Minuten in 100%iges Ethanol getaucht. Dann erfolgten jeweils einminütige Inkubationen in 96%igem, 80%igem und 50%igem Ethanol. Abschließend wurden die Schnitte in destilliertem Wasser geschwenkt.

Für die Antigendemaskierung wurden jeweils zehn Schnitte in gleichmäßigem Abstand in Plastikbehälter einsortiert. Die Plastikbehälter und zwei Standküvetten wurden mit 0,01 M Zitronensäuremonohydratlösung (pH 6,0) aufgefüllt und in der Mikrowelle bei 750 Watt, je nach Vorbehandlungsanleitung des primären Antikörpers, zwei Minuten oder siebeneinhalb Minuten gekocht (Tabelle 2.3.1). Vor der erneuten „Hitzebehandlung“ wurde die verdunstete Menge Zitronensäuremonohydratlösung nachgefüllt. Die zweite Behandlung in der Mikrowelle fand bei 360 Watt statt und betrug je nach primärem Antikörper neun Minuten beziehungsweise zehn Minuten (Tabelle 2-1). Diese Vorbehandlung diente der Freilegung spezifischer Bindungsstellen für die primären Antikörper.

Antikörper	Inkubationszeit	Vorbehandlung
NFκB	1 Std	7,5 Min bei 750 W und 10 Min bei 360 W
GR	2 Std	7,5 Min bei 750 W und 10 Min bei 360 W
Casp- 3	1 Std	2 Min bei 750 W und 9 Min bei 360 W
Ki 67	1 Std	2 Min bei 750 W und 9 Min bei 360 W
PCNA	1 Std	2 Min bei 750 W und 9 Min bei 360 W

Antikörper	Verdünnung	Produkt, Bezugsquelle
NFκB	1:1000	sc-226, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz
GR	1: 250	sc-8992, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA
Casp 3	1: 100	#9664, Cell Signaling Technology Inc, Danvers, MA
Ki 67	1: 50	Dako M7240, Dako Corp, Glostrup, Denmark
PCNA	1: 400	Dako M0879, Dako Corp

Tabelle 2-1: Auflistung verwendeter primärer Antikörper, deren Inkubationszeiten, Verdünnungen und durchgeführte Vorbehandlungszeiten in der Mikrowelle

Die primären Antikörper dienten dazu über immunohistochemische Prozesse Zellen in ihren verschiedenen Phasen der Zellteilung anzufärben. Als primäre Antikörper wurden ein polyklonaler Antikörper gegen Glukokortikoidrezeptor α und β , der in Hasen hergestellt wurde, ein monoklonaler Antikörper gegen aktivierte Caspase-3, der ebenfalls in Hasen hergestellt wurde und ein monoklonaler Antikörper gegen Ki67, hergestellt in Mäusen sowie ein monoklonaler Antikörper gegen PCNA, ebenfalls in Mäusen hergestellt,

verwendet. Ein polyklonaler Antikörper gegen eine Komponente von NF- κ B wurde verwendet, um die entzündliche Aktivierung zu messen (Verdünnungen und Bezugsquellen siehe Tabelle 2-1). Der monoklonale Antikörper Proliferating cell nuclear antigen (anti-PCNA) kann eine Zelle markieren, die sich im Wachstum befindet. Der Antikörper gegen PCNA ist in der Synthesephase, der G2-Phase und der Mitose des Zellzyklus erhöht. Der Antikörper Ki-67 ist ebenfalls ein Proliferationsmarker. Er färbt Zellen an, die sich in der G1-Phase, in der Synthesephase, der G2-Phase oder der Mitose befinden (Yu et Filipe, 1993). Der Proteinkomplex NF- κ B ist während des gesamten Zellzyklus in niedriger Konzentration vorhanden und fungiert als Transkriptionsfaktor. In der Immunantwort kommt ihm eine Schlüsselrolle zu. Die Apoptose wurde über aktivierte Caspase-3 nachgewiesen.

Die Caspase-3 gehört zur Familie der Cystein-Proteasen. Sie stellt ein Schlüsselenzym in der Kaskade der Apoptose dar. In der inaktiven Form liegt sie als Procaspase vor. Nach ihrer Spaltung besteht sie in apoptotischen Zellen aus zwei Fragmenten. Zur Markierung der aktivierten Caspase-3 wurde ein Antikörper benutzt, der sich spezifisch mit einem durch die Spaltung neu entstanden Epitop verbindet. Der Nachweis der aktivierten Caspase-3 eignet sich zur immunhistologischen Darstellung der Apoptose, da ihr Vorhandensein als spezifisch für apoptotische Zellen gilt. Bei der immunohistochemischen Darstellung werden Zellen mit aktivierter Caspase-3 durch den Antikörper positiv dargestellt.

Nach der Demaskierung der Antigene kühlten die Schnitte 20 Minuten ab und wurden dann in destilliertem Wasser gewaschen. Zum Entfernen der endogenen Peroxidaseaktivität wurden alle Schnitte in einer Lösung aus dreiprozentigem Wasserstoffperoxid in Methanol für acht Minuten bei Raumtemperatur in einer Standkuvette inkubiert. Dann wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser gespült und für mindestens fünf Minuten zur pH-Wert-Angleichung in isotoner Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen.

Die unspezifischen Bindungsstellen für Proteine wurden mittels fünfprozentigem bovinem Serumalbumin (BSA) blockiert. Das BSA wurde nach 15-minütiger

Inkubationszeit von den Schnitten abgekippt. Dann wurde der primäre Antikörper aufgebracht (Verdünnung der Antikörper Tabelle 2-1). Die Inkubationszeit betrug bei Raumtemperatur je nach Antikörper eine oder zwei Stunden (Tabelle 2-1). Nach dieser Inkubationszeit wurden die Schnitte mit PBS gespült. Dann wurden sie für 15 Minuten mit dem sekundären Antikörper, einem aus Ziegen gewonnenen biotinyliertem Brückenantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Schnitte erneut mit PBS gespült. Die darauf folgende Inkubation mit Streptavidin-horse-raddish-peroxidase (HRP; Dako Glostrup, Denmark) dauerte bei Raumtemperatur ebenfalls 15 Minuten. In dieser Zeit band das Streptavidin aufgrund seiner natürlichen Affinität zu Biotin an den biotinylierten sekundären Antikörper. Das an das Streptavidin gekoppelte Enzym HRP setzte das Substrat zu sichtbarem Farbstoff um. Anschließend wurden die Schnitte mit PBS gewaschen. Als Entwickler für die Färbung diente der Elektronendonator Diaminobenzidinlösung (DAB). Ein Tropfen DAB wurde dazu mit PBS auf 1 ml aufgefüllt und auf die Objektträger pipettiert. Nach einer Einwirkzeit von zehn Minuten wurde das DAB mit Leitungswasser und dann mit destilliertem Wasser stabilisiert. Als Endprodukt der enzymatisch katalytischen Reaktion unter Abspaltung von Wasser entstand eine Braunfärbung der durch den primären Antikörper markierten Strukturen. Danach wurden die Schnitte für zwei Minuten in Hämalun gebadet um die Zellkerne anzufärben. Abschließend wurden die Objektträger fünf Minuten unter Leitungswasser abgespült, um den Farbstoff zu fixieren.

Um die Schnitte zu dehydrieren, wurden sie in einer ansteigende Alkoholreihe bis zum absoluten Alkohol geschwenkt. Die ansteigende Alkoholreihe bestand dabei aus 70%igem, 96%igem und 100%igem Ethanol. Zuletzt wurden sie für zwei Minuten in Xylol getaucht, das als Intermedium diente. Dann wurden die Schnitte mit Hilfe von Vitro Clud mit Deckgläsern versehen.

Bis zur mikroskopischen Auswertung wurden die Schnitte bei 4° Celsius im Kühlschrank gelagert.

2.3 Auswertung der Schnitte

Für die Auswertung wurden fünf repräsentative Felder des Thymusmarks und der Thymusrinde jeden Schnittes am Fotomikroskop in einer 400-fachen Vergrößerung abfotografiert. Die Schnitte wurden semiquantitativ anhand einer dreistufigen Abstufungsskala (keine Färbung (0), schwache Färbung (+1) mäßige Färbung (+2) oder starke Färbung (+3)) ausgewertet, wobei die Auswertung blind für die Zuordnung der Schnitte stattfand (Kramer et al., 2002). Ein Durchschnittswert von jeweils fünf willkürlich ausgewählten Feldern wurde errechnet. Für die absolute Quantifizierung der mit NF- κ B und Caspase-3 inkubierten Schnitte wurden Fotografien der Rinde und des Marks am Farbdrucker ausgedruckt und die angefärbten Zellen von Hand ausgezählt.

2.4 Statistische Analyse

Die Ergebnisse der Gruppen sind als Mittelwert \pm Standard Fehler des Mittelwerts dargestellt. Die Signifikanz der Daten wurde mit dem Mann-Whitney nichtparametrischen Test geprüft. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde als signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Thymusgewicht

Der Thymus wurde nach der Sectio caesarea entnommen und getrennt gewogen. Das Thymusgewicht im Verhältnis zum Gesamtgewicht der Lämmer war bei allen Tieren, deren Mutterschafe Endotoxin erhielten, im Vergleich zur Kontrollgruppe verringert (Abbildung 3-1).

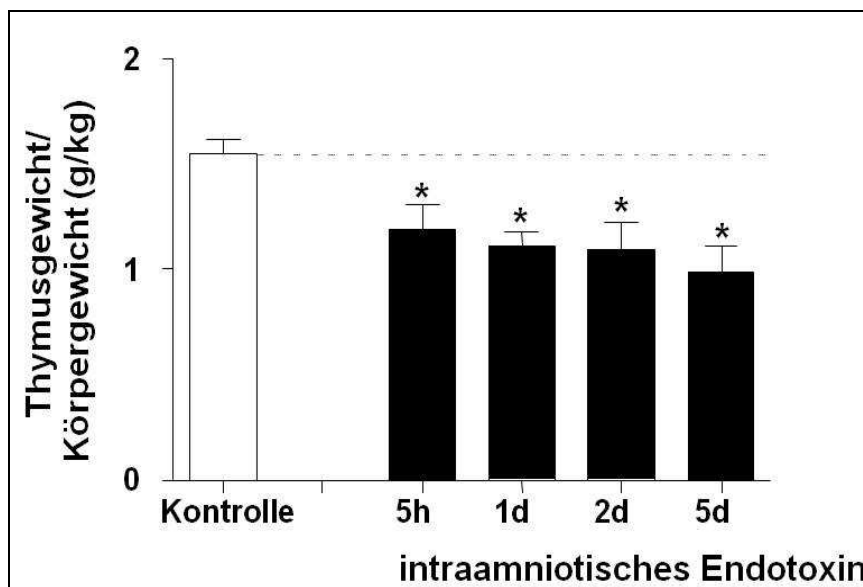


Abbildung 3–1: Das Verhältnis von Thymusgewicht zum Körpergewicht der entbundenen Schafe war nach intraamniotischer Endotoxingabe zu jedem gemessenen Zeitpunkt geringer als das Verhältnis bei der Kontrollgruppe. Der Asterius zeigt $p < 0.05$ zur Kontrollgruppe.

3.2 Lymphozyten im Nabelschnurblut

Bei Geburt wurde auch die Anzahl der Lymphozyten im Nabelschnurblut bestimmt. Anhand der Anzahl der zirkulierenden Lymphozyten im Blut und anhand des Thymusgewichts kann eine stressinduzierte Thymusinvolution nachgewiesen werden (Glavina-Durdov et al., 2003). Wurde den Mutterschafen einen Tag vor Entbindung der Lämmer intraamniotisch Endotoxin verabreicht, war die Anzahl der im Nabelschnurblut zirkulierenden Lymphozyten um 40% geringer als bei der Kontrollgruppe. Wurde das Endotoxin bereits fünf Tage vor der Sectio caesarea appliziert, konnte ein signifikanter Anstieg der

Blutlymphozyten gegenüber der Kontrollgruppe verzeichnet werden (Abbildung 3-2).

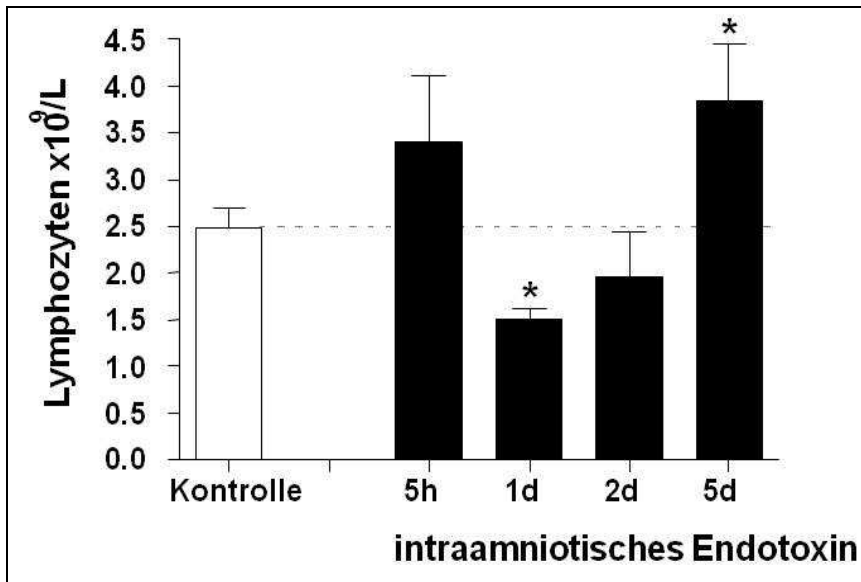


Abbildung 3-2: Anzahl der Lymphozyten im Nabelschnurblut zum Zeitpunkt der Sectio caesarea. Der Asterisk zeigt p-Wert von <0.05 gegenüber der Kontrollgruppe.

3.3 Kortisolkonzentration im fetalen Plasma

Zwei Tage nach Endotoxingabe war die gemessene Plasmakortisolkonzentration mit $1.3 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$ höher als die der Kontrollgruppe, die $0.5 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ betrug. Der Variationskoeffizient zwischen den untersuchten Tieren betrug 0,159. Der Variationskoeffizient innerhalb der untersuchten Tiere betrug 0,112. Fünf Tage nach Endotoxingabe war der Plasmakortisolspiegel bei Sectio caesarea dem Wert der Kontrollgruppe angenähert (Abbildung 3-3).

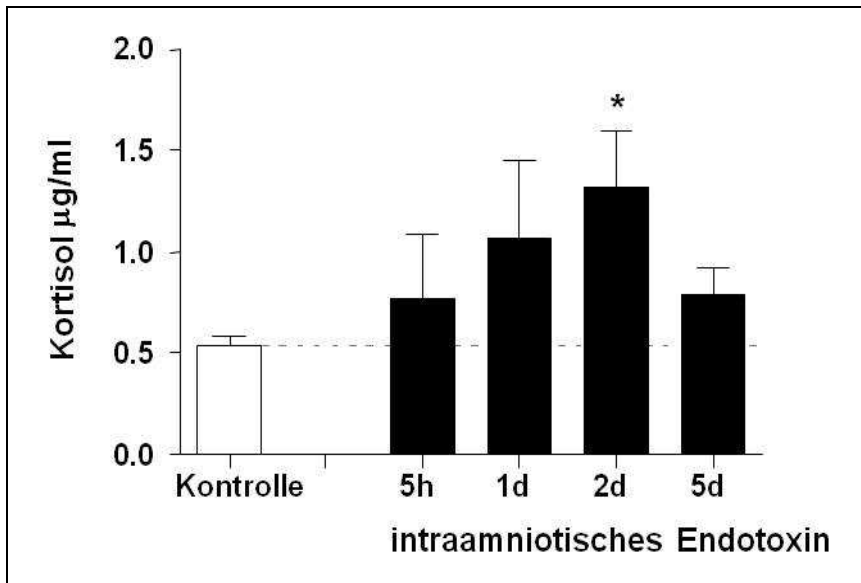


Abbildung 3–3: Es wird die Menge des Kortisols im Blutplasma gezeigt. Der Asterius zeigt $p < 0.05$ zur Kontrollgruppe.

3.4 Expression von Kortikosteroidrezeptoren im Thymus

Um herauszufinden, ob der Anstieg der Kortisolkonzentration mit einer vermehrten Expression an Glukokortikoidrezeptoren im Thymus zusammenhing, wurde der Kortikosteroidrezeptor immunohistochemisch nachgewiesen. Es konnte kein Unterschied in der Expression an Glukokortikoidrezeptoren, weder in der Thymusrinde (Abbildung 3-4) noch im Thymusmark (die Ergebnisse werden nicht aufgeführt), zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe, die mit Endotoxin in Berührung kam, festgestellt werden. Auch im Verteilungsmuster der Zellen, die immunohistochemisch angefärbt wurden, gab es zwischen Thymusrinde und Thymusmark keine Veränderungen zur Kontrollgruppe.

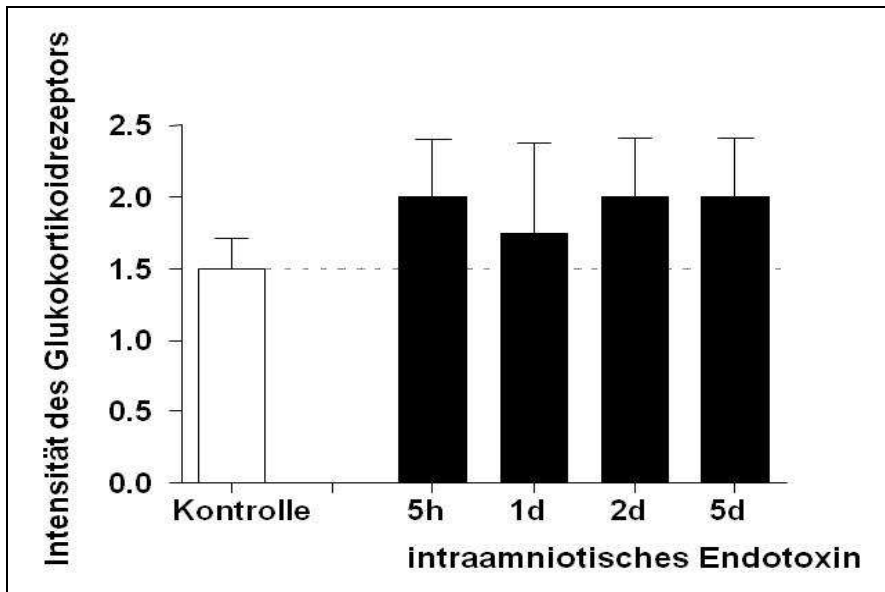


Abbildung 3–4: Die Quantität des Glukokortikoidrezeptors bei Immunfärbung in der fetalen Thymusrinde wird dargestellt.

3.5 Apoptose im fetalen Thymus

Um zu testen, ob die Gewichtsabnahme des fetalen Thymus durch Apoptose zustande kommt, wurden apoptotische Thymozyten immunohistochemisch durch aktivierte Caspase-3 detektiert. Bei der immunohistochemischen Untersuchung auf aktivierte Caspase-3 im Thymus konnte zwischen der Kontrollgruppe und den Gruppen, die dem Endotoxin ausgesetzt waren zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (Abbildung 3-5).

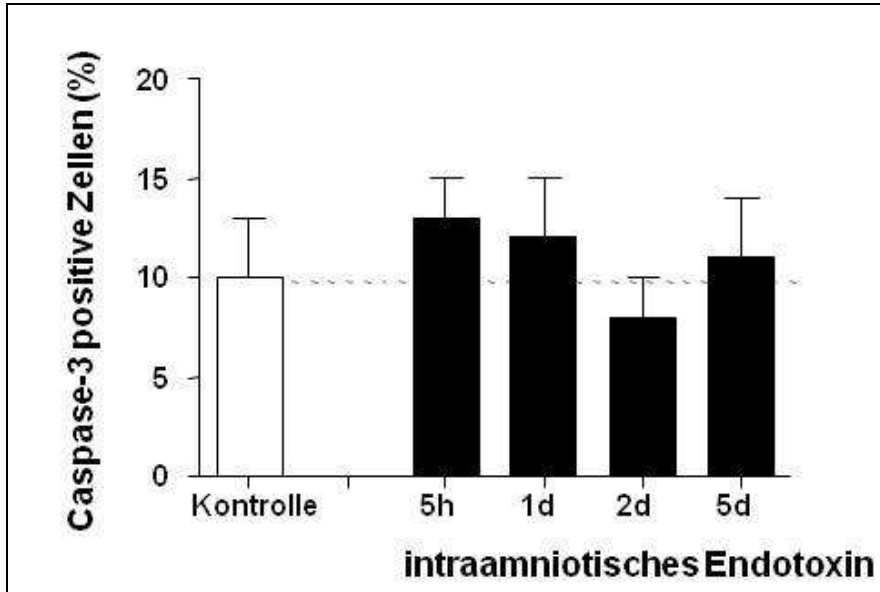


Abbildung 3–5: Anzahl der Caspase-3 positiven Thymozyten nach immunohistochemischer Färbung.

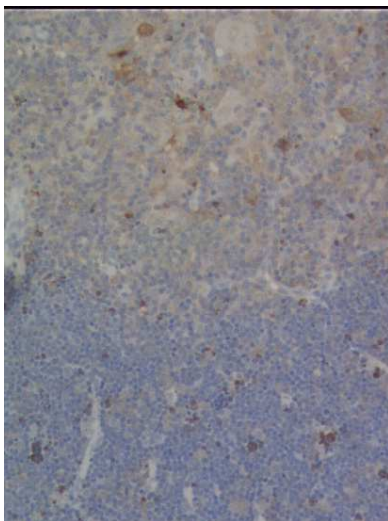


Abbildung 3–6

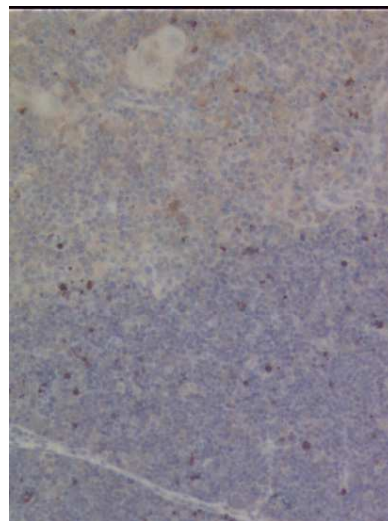


Abbildung 3–7

Abbildung 3-6 Repräsentativer Ausschnitt der Caspase-3 Expression in Thymusmark (oberer Bildanteil) und Thymusrinde (unterer Bildanteil) der Kontrollgruppe. Originalvergrößerung, x200.

Abbildung 3-7 Caspase-3 Expression in der Gruppe, die einen Tag zuvor Endotoxin verabreicht bekam. Originalvergrößerung, x200.

3.6 Proliferation im fetalen Thymus

Beim Anteil der proliferierenden Zellen im Thymus, dargestellt durch Ki67 oder PCNA gab es ebenfalls keinen Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen. Auch hier wurden die Thymusrinde und das Thymusmark getrennt untersucht. Es zeigten sich auch zwischen Thymusrinde und Mark keine Unterschiede. Die statistischen Daten hierzu zeigen für PCNA Abbildung 3-8 und für Ki-67 Abbildung 3-9.

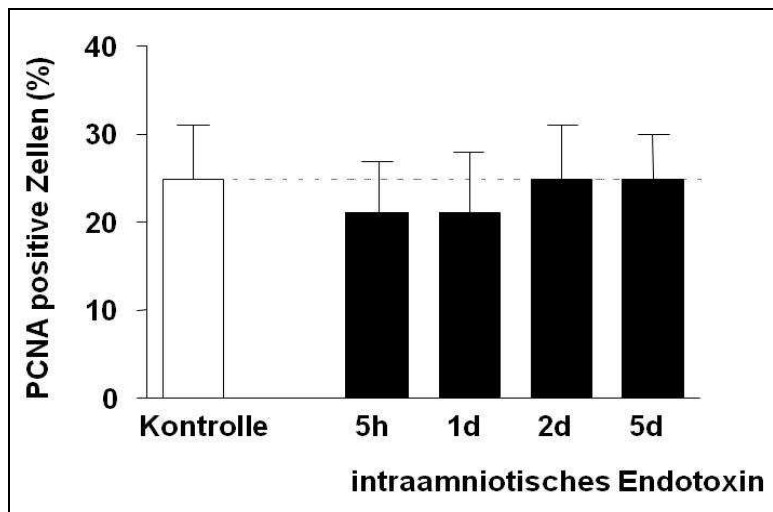


Abbildung 3–8: Anteil der PCNA positiven Thymozyten nach immunohistochemischer Färbung der Thymusschnitte.

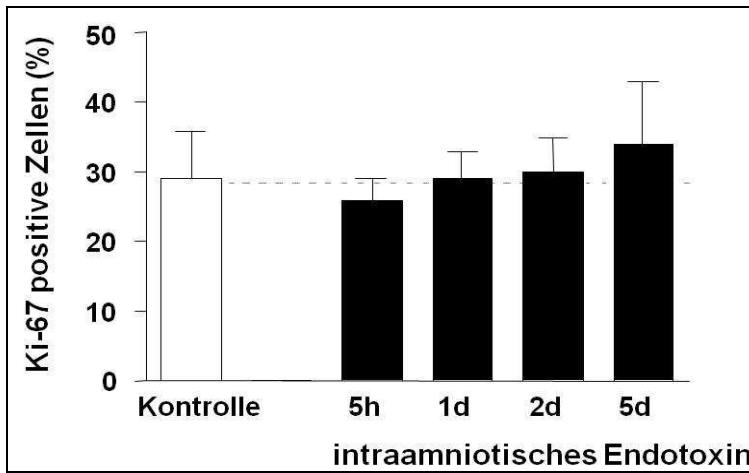


Abbildung 3–9 Anteil der Ki-67 positiven Thymozyten nach immunohistochemischer Färbung der Thymusschnitte.

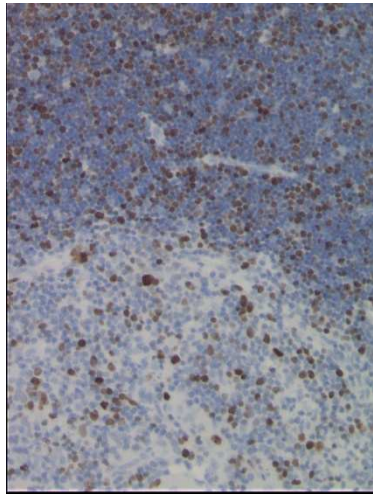


Abbildung 3–10

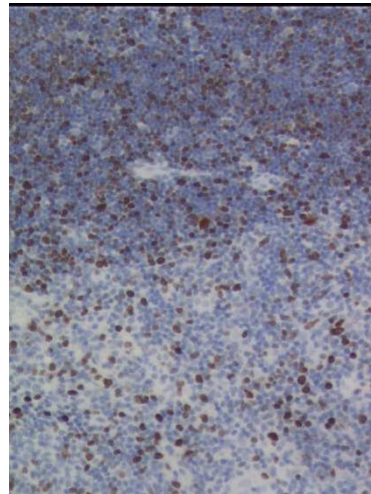


Abbildung 3–11

Abbildung 3-10 Repräsentativer Thymusschnitt zur Darstellung der Ki-67 Expression in der Kontrollgruppe. Originalvergrößerung, x200

Abbildung 3-11 Repräsentativer Thymusausschnitt der Gruppe, die Endotoxin zwei Tage vor Sectio caesarea intraamniotisch verabreicht bekam. Originalvergrößerung, x200.

3.7 *NF-κB Färbung im fetalen Thymus*

In der Gruppe der Tiere, die einen Tag vor der Entbindung der Lämmer Endotoxin appliziert bekam, waren in der Thymusrinde doppelt so viele NF-κB positive Zellkerne zu finden wie in der Kontrollgruppe. Die statistische Erfassung zeigt Abbildung 3-12. Einen repräsentativen Ausschnitt der Kontrollgruppe zeigt die Abbildung 3-13. Ein repräsentativer Ausschnitt NF-κB positiver Zellen der Thymusrinde einen Tag nach Endotoxingabe ist in Abbildung 3-14 dargestellt. Im Thymusmark konnte kein Unterschied an NF-κB positiven Zellen nach Endotoxingabe im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Diese Daten werden daher nicht abgebildet.

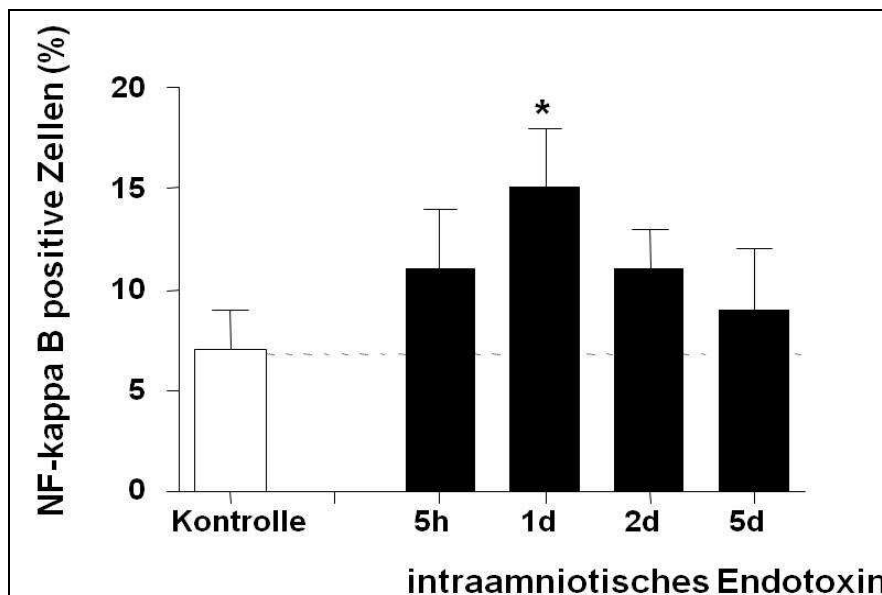


Abbildung 3–12 Anteil der NF-κB positiven Zellen der Thymusrinde zum jeweils untersuchten Zeitpunkt. Der Asterius zeigt $p < 0.05$ gegenüber der Kontrollgruppe.

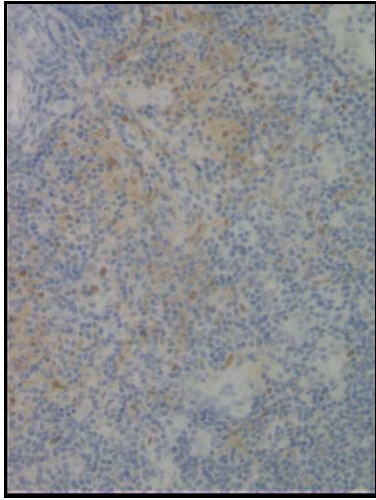


Abbildung 3–13

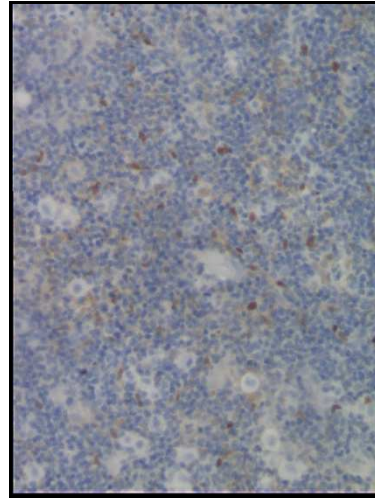


Abbildung 3–14

Abbildung 3-13 NF-κB positive Thymozyten (braun dargestellt) in der Thymusrinde der Kontrollgruppe. Originalvergrößerung, x200.

Abbildung 3-14 Repräsentativer Thymusschnitt aus der Thymusrinde der Gruppe, die Endotoxin einen Tag vor der Sectio caesarea intraamniotisch verabreicht bekam. Originalvergrößerung, x200.

3.8 Verminderte FoxP3 Expression im Thymus nach intraamniotischer Endotoxingabe

Der Anteil des Transkriptionsfaktors FoxP3 in Zellen der Thymusrinde war in der Gruppe, die einen Tag nach Endotoxinapplikation entbunden wurden geringer als in der Kontrollgruppe. Die Abbildung 3-15 zeigt die statistische Aufarbeitung der Ergebnisse. In Abbildung 3-16 wird ein repräsentativer Ausschnitt der Thymusrinde der Kontrollgruppe abgebildet. Ein Ausschnitt der Thymusrinde aus der Gruppe, die einen Tag vor Sectio caesarea Endotoxin erhielt wird in Abbildung 3-17 dargestellt.

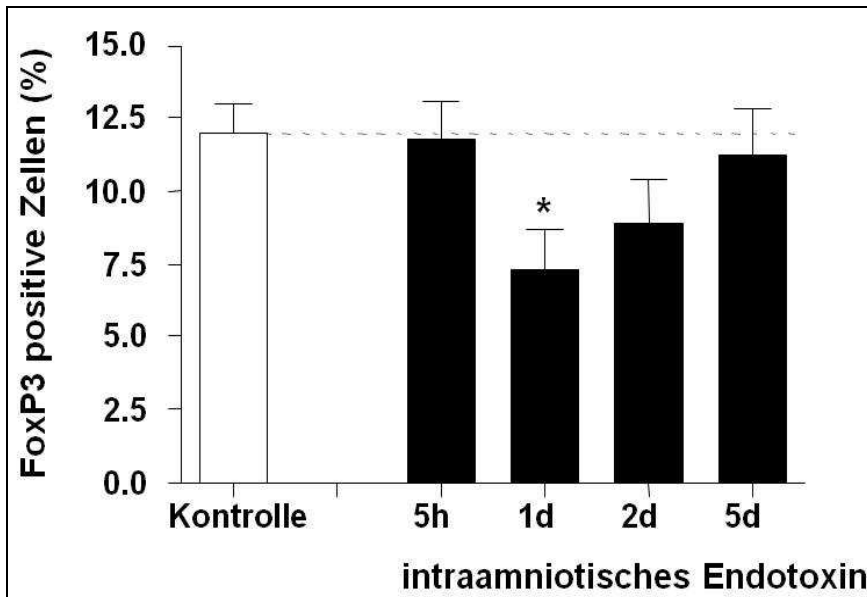


Abbildung 3–15 Statistische Darstellung des Anteils FoxP3 positiver Thymozyten in den untersuchten Thymusschnitten. Der Asterisk zeigt $p < 0.05$ gegenüber der Kontrollgruppe.

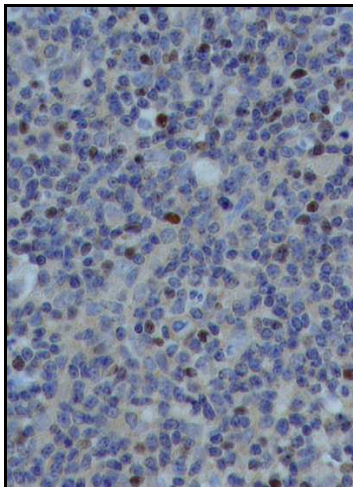


Abbildung 3–16

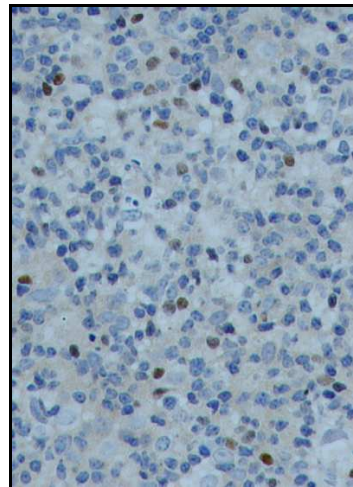


Abbildung 3–17

Abbildung 3-16 FoxP3 positive Zellen (braun) der Thymusrinde der Kontrollgruppe. Originalvergrößerung, x200

Abbildung 3-17 FoxP3 positive Zellen in der Thymusrinde der Gruppe, die Endotoxin intraamniotisch einen Tag vor der Sectio caesarea erhielt. Originalvergrößerung, x200

4 Diskussion

Die Mehrzahl Frühgeborener, die vor der 30. Schwangerschaftswoche zur Welt kommt, war pathogenen Organismen und histologisch einer Chorioamnionitis ausgesetzt (Goldenberg et al., 2000), (Lahra et al., 2004). Derzeit kann die Dauer und die Stärke der fetalen Belastung durch eine Entzündung nicht beurteilt werden (Kramer et al., 2005). In wie weit der Fetus die Möglichkeit besitzt, auf diese Einflüsse mit dem ihm zur Verfügung stehenden Immunsystem zu reagieren, ist weitestgehend unerforscht (Kramer et al., 2005). Bezüglich der Immunfunktion des Feten herrscht die Meinung vor, dass diese unreif ist und nur gering auf Antigene reagiert (Marshall-Clarke et al., 2000). In den letzten Jahren wurde durch experimentelle Studien am Schafmodell jedoch herausgefunden, dass der Fetus eine Entzündung kontrollieren und regulieren kann und damit aus einer Infektion nicht zwingend eine progrediente Entzündung mit Frühgeburt des Feten resultieren muss (Stoll et al., 2002).

Die systemische fetale Entzündungsreaktion hat einen Effekt auf den Thymus. Eine Studie mit Kindern mit sehr niedrigem Geburtsgewicht weist auf den Zusammenhang zwischen einer signifikanten Thymusgewichtsabnahme und einer subklinischen Chorioamnionitis hin (De Felice et al., 1999). De Felice und Kollegen haben in ihrer Studie die Thymusgröße anhand von radiologischen Aufnahmen des kindlichen Thorax vermessen. Die Studien von Di Naro und Kollegen und Yinon und Kollegen zeigen den Zusammenhang zwischen der sonographisch bestimmten Thymusgröße und dem Vorhandensein einer intrauterinen Infektion (Di Naro et al., 2006), (Yinon et al., 2007). Durch Jeppesen und Kollegen wurde bei der Untersuchung von 80 Frühgeborenen eine Korrelation zwischen der Abnahme des Thymusgewichts und dem Auftreten einer postnatalen Infektion, innerhalb der ersten drei Wochen nach Geburt, hergestellt (Jeppesen et al., 2003). Diese klinischen Studien verwendeten radiologische Methoden um die Thymusgröße zu bestimmen. Es gibt nur wenige Studienergebnisse mit einer genauen morphologischen Untersuchung des Thymus. Diese beruhen auf Untersuchungen an Thymi verstorbener Feten. Toti und Kollegen schlossen in ihre Studie 20 Feten ein, die zwischen der 16. und 36. Gestationswoche tot geboren wurden. Die

Todesursache der Feten war eine Chorioamnionitis. Bei der Untersuchung der verstorbenen Feten fiel ein geringes Thymusgewicht auf. Das Verhältnis von Thymusrinde zu Thymusmark war reduziert. Das Verhältnis von Thymusparenchym zu interstitiellem Thymusgewebe verschob sich. Eine deutliche Veränderung im Aufbau des Thymus mit Reduktion der Zahl der Thymozyten wurde festgestellt (Toti et al., 2000). In der Studie von Toti und Kollegen wurde die maximale Form einer fetalen Entzündungsreaktion, die im Tod des Feten endet, untersucht.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Veränderungen des Thymus waren nicht so ausgeprägt wie in den vorangegangenen Studien beschrieben. Die histologischen Veränderungen, die Toti und Kollegen an verstorbenen Kindern beschrieben (Toti et al., 2000) konnten in dem dargestellten Schafmodell nicht beobachtet werden. In den vorliegenden Untersuchungen fand weder ein andauernder architektonischer Umbau des Thymus im Sinne einer Thymozytenabnahme statt, noch waren Veränderungen im Verhältnis Thymusmark zu Thymusrinde zu verzeichnen.

Eine Chorioamnionitis induziert eine fetale Thymusinvolution. Darauf deuten die Aktivierung von NF- κ B im fetalen Thymus, das reduzierte Thymusgewicht, die verminderte Anzahl zirkulierender Lymphozyten und FoxP3 positiver Lymphozyten in der durchgeführten Studie hin. Die Thymusinvolution kann durch eine Lymphozytenausschwemmung in die Blutbahn und in entzündete Organe, wie zum Beispiel die Lunge zustande kommen. Eine Lymphozytenausschwemmung, beziehungsweise Umverteilung wird angenommen, da ein vermehrter Zelltod der Thymozyten nicht beobachtet werden konnte.

Eine Verminderung der im Blut zirkulierenden Lymphozyten kann eine Folge von akutem Stress sein und als frühes Zeichen einer Thymusinvolution imponieren (Glavina-Durdov et al., 2003). Glavina-Durdov und Kollegen untersuchten die akute Thymusinvolution bei kleinen Frühgeborenen. Der Anteil an Lymphozyten im Blutbild hing vom Grad der Thymusinvolution ab. In unserer Studie war der Anteil an Lymphozyten im Nabelschnurblut nach Endotoxingabe

zu verschiedenen Zeitpunkten signifikant unterschiedlich. Bei der Endotoxingabe einen Tag vor Sectio caesarea verzeichneten wir eine Lymphozytenabnahme gegenüber der Kontrollgruppe im Nabelschnurblut. Ein Lymphozytenanstieg gegenüber der Kontrollgruppe war bei einer Applikation des Endotoxins fünf Tage vor Sectio caesarea zu verzeichnen. Eine mögliche Erklärung für den kurzzeitigen Abfall der Lymphozytenzahl im Nabelschnurblut ist, dass Lymphozyten, die Stress ausgesetzt sind in die Peripherie zirkulieren, beziehungsweise in die Areale abgezogen werden in denen die Entzündung vorherrscht (Hennig et al., 2000), (Kramer et al., 2001). Die größten Veränderungen in der NF- κ B Aktivierung und der Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 wurden in der Gruppe gefunden, die einen Tag vor Sectio caesarea das Endotoxin intraamniotisch erhielt. Die Normalisierung der FoxP3 Expression und der NF- κ B Aktivierung zusammen mit der Zunahme der Anzahl an Lymphozyten im Nabelschnurblut in der Gruppe, die fünf Tage nach Endotoxingabe untersucht wurde, kann eine Erholung der Thymusinvolution bedeuten. Ein Zusammenhang zwischen der Anzahl zirkulierender Blutlymphozyten und einer Thymusinvolution wurde bereits beschrieben (Juretic et al., 2001) (van Baarlen et al., 1989) (van Baarlen et al., 1988) (Fukunaga et al., 1992).

In unserer Studie wurde ein Anstieg des Plasmakortisolspiegels gegenüber der Kontrollgruppe, in der Gruppe festgestellt, die zwei Tage nach intraamniotischer Endotoxingabe entbunden wurde. Eine Zunahme an apoptotischen Lymphozyten im Thymus wurde zu keinem der untersuchten Zeitpunkte beobachtet. In unserer Studie wurden apoptotische Thymozyten immunohistochemisch durch aktivierte Caspase-3 detektiert. Das Enzym Caspase-3 wird in der aktivierten Form nur in Zellen gefunden, die durch einen programmierten Zelltod zugrunde gehen, und wird daher als spezifischer Nachweis einer Apoptose verwendet.

Studien, die sich verschiedener Mausmodelle mit genetisch modifizierten Glukokortikoidrezeptoren bedienten, lieferten unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich des Hormoneffekts auf Thymozyten. Glukokortikoide konnten demnach nicht nur die Zahl der Thymozyten durch Induktion von Apoptose

limitieren, sondern auch das Überleben und die Proliferation von Thymozyten in jungen Mäusen fördern (Jondal et al., 2004). Trotz der Verwendung zweier verschiedener Proliferationsmarker (PCNA und Ki-67) konnte in unserer Studie keine Auswirkung der Endotoxingabe auf die Thymusproliferation beobachtet werden. Dies legt nahe, dass die Rückkehr zum normalen Thymusgewicht einige Tage nach Endotoxingabe wahrscheinlich durch eine Zellrekrutierung und nicht durch eine Zellproliferation zustande kam. In der vorliegenden Studie bestand jedoch nicht die Möglichkeit dies experimentell weiter zu testen.

Eine Thymusinvolution, ausgelöst durch fetalen Stress, wurde mit der Entwicklung der bronchopulmonalen Dysplasie bei Frühgeborenen in Zusammenhang gebracht (Rosen et al., 2006). Rosen und Kollegen zeigten, dass der architektonische Aufbau des Thymus und die Funktion der Lymphozyten bei einer bronchopulmonalen Dysplasie verändert sind. Sie wiesen darauf hin, dass autoreaktive T-Lymphozyten an einer Lungenschädigung beteiligt sein könnten (Rosen et al., 2006). Die verminderte Anzahl FoxP3 positiver Zellen könnte über eine ineffektive oder unterdrückte chronische Entzündung bei der Pathogenese der bronchopulmonalen Dysplasie mitwirken (Kunzmann et al., 2007) (Kotecha et al., 1996). Wurde bei der radiologischen Untersuchung der Lunge bei Frühgeborenen mit geringem Geburtsgewicht ein kleiner Thymus gefunden, sprach dies prognostisch für die Entwicklung einer bronchopulmonalen Dysplasie (De Felice et al., 2002). Dies weist darauf hin, dass immunologische Mechanismen, die zu einer Lungenverletzung und zur Entwicklung einer bronchopulmonalen Dysplasie führen, bereits vor der Geburt beginnen können (Speer, 2006)

Die vorliegende Arbeit ist limitiert durch die geringe Anzahl an Tieren pro Gruppe und die nur einmalige Applikation des Endotoxins. Die Interpretation der Ergebnisse bezüglich FoxP3 wird dadurch limitiert, dass die Expression im Thymus nur immunohistochemisch untersucht wurde. Die Entwicklung der Thymozyten, insbesondere die Differenzierung und Aktivierung der Treg Lymphozyten kann durch die Aktivierung von NF- κ B im Thymus beeinflusst werden (Yang, 2008) (Lu et al., 2005). Die Abnahme der Treg Lymphozyten kann auf die Aktivierung von NF- κ B zurückzuführen sein (Yang, 2008) (Lu et al.,

2005). Eine immunohistochemische Doppelfärbung für FoxP3 und NF- κ B gelang in dieser Studie nicht (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz zu den untersuchten Schafen waren kindliche Feten, die einer Chorioamnionitis ausgesetzt waren, auch proinflammatorischen Substanzen permanent ausgesetzt. In den menschlichen Feten liegt eine anhaltende Entzündung vor (Van Baarlen et al., 1989) (Van Baarlen et al., 1988). Es gibt in vitro Untersuchungen, in denen die Monozytenfunktion frühgeborener Lämmer, die einer Chorioamnionitis ausgesetzt waren, mit der von erwachsenen Kontrolltieren verglichen wurde (Kramer et al., 2005). Dabei fiel auf, dass die Lämmer, die einer Chorioamnionitis ausgesetzt waren, nach drei Tagen weniger und nach 14 Tagen mehr Interleukin-6 produzierten als ihre Altersgenossen ohne Chorioamnionitis. Die Funktion der Monozyten entsprach nach Chorioamnionitis in etwa der von erwachsenen Schafen. Es fand somit eine Reifung der Zellen statt. Wurde jedoch durch eine erneute Endotoxingabe eine chronische Chorioamnionitis nachgestellt, war dieser Reifungsprozess nicht mehr vorhanden. Die Immunzellen entwickelten eine Endotoxintoleranz (Kramer 2005). Diese Toleranz wurde nicht nur durch dasselbe Endotoxin ausgelöst sondern auch durch andere Substanzen, die andere Toll-like Rezeptoren besetzten und damit über die gleichen intrazellulären Signalwege die Toleranzentwicklung beeinflussen konnten (Kramer et al., 2009) (Kramer et al., 2005).

In welchem Zeitraum der Schwangerschaft eine Interaktion von Bakterien mit dem fetalen Immunsystem zustande kommen kann, ist noch unzureichend untersucht (Kramer et al., 2005). Die hier dargestellten Ergebnisse, die auf der einmaligen Gabe eines einzigen Lipopolysaccharides von *Escherichia coli* beruhen, unterscheiden sich wahrscheinlich von der Situation des Feten, der einer Fülle an verschiedenen Bakterien im Chorioamnion ausgesetzt ist (Onderdonk, 2008). Am häufigsten lösen Ureaplasmen eine Chorioamnionitis aus (Goldenberg et al., 2000) (Faye-Petersen, 2008). Ureaplasmen gehören zur Gruppe der Mycoplasmen und besitzen im Gegensatz zu gramnegativen Stäbchen keine Zellwand. Sie können daher auch kein Endotoxin produzieren (Newham et al., 2003). In unserem Studiendesign wurde mit dem Endotoxin

von *Escherichia coli* gearbeitet, so dass es sich bei der von uns am Modell induzierten Chorioamnionitis um eine durch ein Lipopolysaccharid induzierte Chorioamnionitis handelt und nicht um eine durch Mycoplasmen oder ein breites Keimspektrum verursachte Entzündung.

Ein Vorteil dieses Studiendesigns ist, dass der zeitliche Verlauf der Thymusinvolution betrachtet werden kann. Die Thymusinvolution war im untersuchten Zeitraum von fünf Tagen reversibel. Der frühkindliche Thymus beziehungsweise das frühkindliche Immunsystem besitzt also die Möglichkeit sich von intrauterinem Stress oder einer intrauterinen Entzündungssituation zu erholen. Welche möglichen Konsequenzen diese zeitlich beschränkten Veränderungen auf das Immunsystem im weiteren Leben haben können, muss untersucht werden. Es häufen sich Anhaltspunkte, die einer vorgeburtlichen Entzündung eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung chronischer Erkrankungen einräumen (Gluckman et al., 2008) (Been et al., 2008).

Durch Tierexperimente und epidemiologische Studien wurde ein Zusammenhang zwischen einem erniedrigten Geburtsgewicht beziehungsweise Unterernährung in der frühen Kindheit und dem Auftreten chronischer Erkrankungen, wie zum Beispiel dem metabolischen Syndrom, im Erwachsenenalter hergestellt (Gluckmann et al., 2008). Dass Frühgeborene, unabhängig von ihrem Geburtsgewicht, bereits vor Erreichen der Pubertät oftmals eine Insulinresistenz und Glukoseintoleranz entwickeln, wurde von Hofmann und Kollegen postuliert (Hofmann et al., 2004). Mögliche Auswirkungen einer fetalen Entzündungsreaktion auf die Entstehung chronischer Erkrankungen wurden bisher nicht eingehend untersucht. Studien weisen darauf hin, dass eine fetale Entzündungsreaktion im Kindesalter zu Asthma führen kann und autistisches Verhalten sowie neurologische Erkrankungen begünstigt (Kumar et al., 2008), (Limperopulus et al., 2008), (Redline et al., 2006).

Ein früher Kontakt von Kindern zu Großtieren und über diese zu Lipopolysacchariden kann die Entwicklung von Allergien positiv beeinflussen (von Mutius et al., 2007). Dabei hat die Auseinandersetzung mit Antigenen früh

im Leben einen weitaus höheren Effekt, verglichen mit der Konfrontation nach dem ersten Lebensjahr (Riedler et al., 2001). Kinder, deren Mütter in der Schwangerschaft Tierkontakt hatten, waren bis zum Schulalter vor Allergien geschützt (Riedler et al., 2001).

Billingham und Kollegen haben die These aufgestellt, dass die „aktiv erworbene immunologische Toleranz“ als Ergebnis des fetalen Kontakts mit Antigenen entsteht (Billingham et al., 1953). Während der Entwicklung des Immunsystems werden T-Lymphozyten im Thymus selektiert um gegen sich selbst tolerant zu werden beziehungsweise nur gegen Fremdantigene zu reagieren. Es wird angenommen, dass diese Toleranz den Treg Lymphozyten zuzuschreiben ist. Mold und Kollegen fanden heraus, dass eine beachtliche Anzahl an mütterlichen Zellen die Plazenta durchdringt und Treg Lymphozyten induziert, die wiederum die fetale vorgeburtliche Immunantwort unterdrücken und bis ins frühe Erwachsenenleben hinein persistieren (Mold et al., 2008). Diese Form der antigenspezifischen Toleranz wird bereits vorgeburtlich im Uterus angelegt und leistet vermutlich einen Beitrag zur Regulation der Immunantwort nach der Geburt (Mold et al., 2008).

Es gibt eine Vielzahl an verschiedenen Faktoren, die bereits während der Schwangerschaft die postnatale Entwicklung des Kindes beeinflussen. Zu diesen müssen auch eine vorgeburtliche Infektion und eine durch Chorioamnionitis induzierte Entzündungsreaktion gezählt werden, da sie prägend für die Entwicklung des Immunsystems sind (Kumar et al., 2008). Die vorliegende Studie am Tiermodell kann Hinweise über die Vorgänge im Feten liefern.

5 Zusammenfassung

Eine Chorioamnionitis spielt bei der Frühgeburtlichkeit eine wichtige Rolle. Die meisten frühgeborenen Kinder waren vor ihrer Geburt einer Chorioamnionitis, die eine bakterielle Entzündung der Eihäute und des Fruchtwassers darstellt, ausgesetzt (Lahra et al., 2004). Eine fetale Entzündung, wie die Chorioamnionitis, hat positive und negative Auswirkungen auf die weitere Entwicklung des frühgeborenen Kindes. Es werden durch die Entzündung Veränderungen induziert, die nach der Geburt die Adaptation an die Umgebung und somit die Überlebenschancen verbessern (Kramer 2007). Die Entzündung schädigt jedoch auch Organe, insbesondere die Lunge und das Gehirn.

Durch eine Chorioamnionitis kommt es zu einer fetalen Thymusinvolution.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Thymusinvolution an einem Schafmodell, das entwickelt wurde um die fetale Lungenreifung und deren Veränderungen durch Chorioamnionitis in vivo zu studieren, im zeitlichen Verlauf untersucht. Durch die Injektion von *Escherichia coli* Endotoxin in die Amnionflüssigkeit wurde eine Chorioamnionitis ausgelöst. Es wurden Veränderungen des Thymusgewichts und des Plasmakortisolspiegels nach Chorioamnionitis zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Dazu wurden die Thymusbiopsien immunohistochemisch gefärbt und ausgewertet. Die Lymphozyten im Nabelschnurblut wurden gezählt. Die quantitative Expression von Steroidrezeptoren und FoxP3 im Thymus wurde erfasst. Die Thymozyten wurden auf Apoptose und Aktivierung von NF- κ B untersucht.

Die Chorioamnionitis führte zu einer Abnahme der Anzahl an Lymphozyten im Thymus ohne dass ein vermehrter Zelltod nachgewiesen werden konnte. Jedoch wurde NF- κ B vermehrt aktiviert und der Transkriptionsfaktor FoxP3 vermindert exprimiert. Der Plasmakortisolspiegel war vorübergehend erhöht, das Thymusgewicht nahm ab.

Welche Auswirkungen die Thymusinvolution neben anderen postnatalen Faktoren auf das Immunsystem des Feten, beziehungsweise auf die weitere Entwicklung des Abwehrsystems des Kindes hat, ist noch weitestgehend unklar.

Weitere Untersuchungen sollten folgen um die Mechanismen besser verstehen zu lernen, die zu positiven Auswirkungen einer Entzündung oder zu langfristigen negativen Folgen führen.

Literaturverzeichnis

Allan SE, Broady R, Gregori S et al. CD4+ T-regulatory cells: toward therapies for human diseases. *Immunol Rev* **223**:391-421, 2008

Aronson M. Reversible thymic collapse following acute stress is beneficial: a hypothesis, *Thymus* **14**:61-63, 1989

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

Been JV, Kramer BW, Zimmermann LJ. In utero and early-life conditions and adult health and disease. *N Engl J Med* **359**:1523-1524, 2008

Been JV, Rours IG, Kornelisse RF, Jonkers F, de Krijger RR, Zimmermann LJ. Chorioamnionitis alters the response to surfactant in preterm infants. *J Pediatr* **156**:10-15, 2010

Berger R, Garnier Y. Die Frühgeburt: Pathogenese, Risikoselektion und präventive Maßnahmen. *Geburtsh Frauenheilk*. **59**:45-56; 1999

Berger R, Garnier Y. Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain Res Rev* **30**:107-134; 1999

Bersani I, Thomas W, Speer CP. Chorioamnionitis- the good or the evil for neonatal outcome? *J Matern Fetal Neonatal Med*, Feb 6, 2012

Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* **172**: 603-606, 1953

Bunt JE, Carnielli VP, Seidner SR, Ikegami M, Darcos Wattimena JL, Sauer PJ, Jobe AH, Zimmermann LJ. Metabolism of endogenous surfactant in premature

baboons and effect of prenatal corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med* **160** (5 Pt 1):1481-1485; 1999

Burri PH. Structural aspects of postnatal lung development- alveolar formation and growth. *Biol Neonate* **89**: 313-322; 2006

Ciofani M, Zuniga-Pflucker JC. The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annu Cell Dev Biol* **23**:463-93; 2007

Cogo PE, Zimmermann LJ, Pesavento R, Sacchetto E, Burighel A, Rosso F, Badon T, Verlato G, Carnielli VP. Surfactant kinetics in preterm infants on mechanical ventilation who did and did not develop bronchopulmonary dysplasia. *Crit Care Med* **31** (5):1532-1538; 2003

Costeloe K, Hennessey E, Gibson AT, Marlow N, Wilkinson AR. The EPICure study: outcomes to discharge from hospital for infants born at the threshold of viability. *Pediatrics* **106**:659-671, 2000

D'Alquen D, Kramer BW, Seidenspinner S, Marx A, Berg D, Groneck P, Speer CP. Activation of umbilical cord endothelial cells and fetal inflammatory response in preterm infants with chorioamnionitis and funisitis. *Pediatr Res* **57**:263-269;2005

Dammann O, Leviton A. Inflammation, brain damage and visual dysfunction in preterm infants. *Semin Fetal Neonatal Med* **11**:363-368, 2006

Dammann O, Leviton A. Role of the fetus in perinatal infection and neonatal brain damage. *Curr Opin Pediatr* **12**: 99-104, 2000

De Felice C, Latini G, Del Vecchio A, Toti P, Bagnoli F, Petraglia F. Small thymus at birth: a predictive radiographic sign of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics* **110**:386-388, 2002

De Felice C, Toti P, Santopietro R, Stumpo M, Pecciarini L, and Bagnoli F. Small thymus in very low birth weight infants born to mothers with subclinical chorioamnionitis. *J Pediatr* **135**:384-386, 1999

Di Naro E, Cromi A, Ghezzi F, Raio L, Uccella S, D'Addario V, and Loverro G. Fetal thymic involution: a sonographic marker of the fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol* **194**:153-159, 2006

Elmore SA. Enhanced histopathologie of the thymus. *Toxicol Pathol* **34**:656-65, 2006

Faye-Petersen OM. The placenta in preterm birth. *J Clin Pathol* **61**:1261-1275, 2008

Fukunaga T, Mizoi Y, Yamashita A, et al. Thymus of abused/neglected children. *Forensic Sci Int* **53**:69-79, 1992

Been JV, Perinatal modulators of respiratory outcome after preterm birth, Chapter 1:20, 2010

Garnier Y. Prävention perinataler Hirnschäden. *Geburtsh Frauenheilkunde* **64**:1235-1238; 2004

Garnier Y, Gantert M, Berger R. Perinatale Hirnschädigung: Bedeutung der intrauterinen Infektion. *Geburtsh Frauenheilkunde* **64**:464-472; 2004

Gerber S, Vial Y, Hohfeld P, Witkin SS. Detection of *Ureaplasma urealyticum* in second trimester amniotic fluid by polymerase chain reaction correlates with subsequent preterm labor and delivery. *J Infect Dis* **187**:518-521, 2003

Glavina-Durdov M, Springer O, Capkun V, Saratlija-Novakovic Z, Rozic D, and Barle M. The grade of acute thymus involution in neonates correlates with the duration of acute illness and with the percentage of lymphocytes in peripheral blood smear. Pathological study. *Biol Neonate* **83**:229-234, 2003

Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. Effect of in utero and early-life conditions on adult health disease. *N Eng J Med* **359**:61-73, 2008

Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* **271**: 75-84, 2008

Goldenberg RL, Hauth JC, and Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* **342**:1500-1507, 2000

Goldenberg RL, Jobe AH. Prospects for research in reproductive health and birth outcomes. *JAMA* **285**:633-639, 2001

Groneck P, Götze-Speer B, Oppermann M, Eiffert H, Speer CP. Association of pulmonary inflammation and increased microvascular permeability during the development of bronchopulmonary dysplasia: A sequential analysis of inflammatory mediators in respiratory fluids of high-risk preterm neonates. *Pediatrics* **93**:712-718, 1994

Gückel E, Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF-kappaB für die Entwicklung und Funktion natürlich vorkommender regulatorischer T-Zellen, Dissertationsarbeit, 2011

Hahn, Falke, Kaufmann, Ullmann, Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer Verlag, 4. Auflage, 2000

Halliday HL, Evidenced based neonatal care. *Best Prac Res Clin Obstet Gynaecol* **19** (1):155-166; 2005

Hennig J, Netter P, and Voigt K. Mechanisms of changes in lymphocyte numbers after psychological stress. *Z Rheumatol* **59** Suppl 2.II/43-48, 2000

Hofmann PL, Regan F, Jackson WE, et al. Premature birth and later insulin resistance. *N Eng J Med* **351**:2179-2186, 2004

Jeppesen DL, Hasselbalch H, Nielsen SD, Sorensen TU, Ersboll AK, Valerius NH, and Heilmann C. Thymic size in preterm neonates: a sonographic study. *Acta Paediatr* **92**:817-822, 2003

Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* **163**:1723-1729, 2001

Jobe AH, Newnham JP, Willet KE, Padbury JF, Moss TJ, Gore Ervin M, Padbury JF, Sly P, Ikegami M. Endotoxin-induced lung maturation in preterm lambs is not mediated by cortisol. *Am J Respir Crit Care Med* **162**:1656-1661; 2000

Jobe AH, Newnham JP, Willet KE, Sly P, Ervin MG, Bachurski C, Possmayer F, Hallman M, Ikegami M. Antenatal endotoxin and glucocorticoid effects on the lungs of preterm lambs. *Am J Obstet Gynecol* **182**:401-408, 2000

Jondal M, Pazirandeh A, and Okret S. Different roles for glucocorticoids in thymocyte homeostasis? *Trends Immunol* **25**:595-600, 2004

Juretic E, Juretic A, Uzarevic B, Petroveckii M. Alterations in lymphocyte phenotype of infected preterm newborns. *Biol Neonate* **80**:223-227, 2001

Kallapur SG, Kramer BW, Moss TJ, Newnham JP, Jobe AH, Ikegami M, and Bachurski CJ. Maternal glucocorticoids increase endotoxin-induced lung

inflammation in preterm lambs. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **284**:L633-642, 2003

Kallapur SG, Willet KE, Jobe AH, Ikegami M, Bachurski CJ. Intra-amniotic endotoxin: chorioamnionitis precedes lung maturation in preterm lambs. Am J Physiol **280**:L527-538, 2001

Kotecha S, Wangoo A, Silverman M, Shaw RJ. Increase in the concentration of transforming growth factor beta-1 in bronchoalveolar lavage fluid before development of chronic lung disease of prematurity. J Pediatr **128**:464-469, 1996

Kramer BW. Antenatal inflammation and lung injury: prenatal origin of neonatal disease. J Perinat **28**, 21-27; 2008

Kramer BW, Bedeutung der Chorioamnionitis für die Mortalität und Morbidität von Frühgeborenen, Habilitationsschrift, Würzburg 2005

Kramer BW. The multiple effects of exposure to antenatal inflammation on the fetal lung. Maastricht, PhD Schrift, Chapter 1, 2007

Kramer BW. The multiple effects of exposure to antenatal inflammation on the fetal lung. Maastricht, PhD Schrift, Chapter 12, 2007

Kramer BW, The respiratory distress syndrome (RDS) in preterm infants, Intensivmed **44**: 403-408, 2007

Kramer BW, Garnier Y, Chorioamnionitis - eine inflammatorische Multiorganerkrankung des Fetus? ,Geburtsh Fraueheilk **67**: 602-610; 2007

Kramer BW, Ikegami M, Moss TJ, Nitsos I, Newham JP, Jobe AH. Endotoxin-induced Chorioamnionitis modulates innate immunity of monocytes in preterm sheep. *Am J Respir Crit Care Med* **171**: 73-77, 2005

Kramer BW, Jobe AH. The clever fetus: responding to inflammation to minimize lung injury. *Biol Neonate*. **88**:202-207; 2005

Kramer BW, Kaemmerer U, Kapp M, Herbst D, Marx A, Berg D, Groneck PA, Speer CP. Decreased expression of angiogenic factors in placentas with chorioamnionitis after preterm birth. *Pediatr Res* **58**:607-612; 2005

Kramer BW, Kallapur SG, Moss TJ, et al. Modulation of fetal inflammatory response on exposure to lipopolysaccharide by chorioamnionitis, lung or gut in sheep. *Am J Obstet Gynecol* **202**:77.e 1-9, 2010

Kramer BW, Kallapur SG, Moss TJ, Nitsos I, Newham JP, Jobe AH. Intraamniotic LPS modulation of TLR signaling in lung and blood monocytes of fetal sheep. *Innate Immun* **15**:101-107, 2009

Kramer BW, Kramer S, Ikegami M, Jobe AH. Injury, inflammation, and remodeling in fetal sheep lung after intra-amniotic endotoxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **283**: L452-459, 2002

Kramer BW, Ikegami M, Moss TJ; Nitsos I, Newham JP, Jobe AH. Endotoxin-induced chorioamnionitis modulates innate immunity of monocytes in preterm sheep. *Am J Respir Crit Care Med* **171**:73-77, 2005

Kramer BW, Jobe AH, Ikegami M. Monozyte function in preterm, near term and adult sheep. *Pediatr Res* **54**:52-57, 2003

Kramer BW, Jobe AH. The clever fetus: responding to inflammation to minimize lung injury. *Biol Neonate* **88**: 202-207, 2005

Kramer BW, Moss TJ, Willet KE, Newnham JP, Sly PD, Kallapur SG, Ikegami M, Jobe AH. Dose and time response after intra-amniotic endotoxin in preterm lambs. *Am J Respir Crit Care med* **164**:982-988, 2001

Kumar R, Yu Y, Story RE, Pongracic JA, Gupta R, Pearson C, Ortiz K, Bauchner HC, and Wang X. Prematurity, chorioamnionitis, and the development of recurrent wheezing: a prospective birth cohort study. *J Allergy Clin Immunology* **121**:878-884 e876, 2008

Kunzmann S, Speer CP, Jobe AH, and Kramer BW. Antenatal inflammation induced TGF-beta 1 but suppressed CTGF in preterm lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **292**:L223-231, 2007

Lahra MM, Jeffery HE. A fetal response to chorioamnionitis is associated with early survival after preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* **190**:147-151, 2004

Lehmann OJ, Sowden JC, Carlsson P, Jordan T and Bhattacharya SS. Fox's in development and disease. *Trends Genet* **19**: 339-344, 2003

Leviton A, Dammann O. Coagulation, inflammation, and the risk of neonatal white matter damage. *Pediatr Res* **55**:541-545, 2004

Limperopulus C, Bassan H, Sullivan NR, et al. Positive screening for autism in ex-preterm infants: prevalence and risk factors. *Pediatrics* **121**:758-765, 2008

Li B and Greene MI. Special regulatory T-cell review: FOXP3 biochemistry in regulatory T cells – how diverse signals regulate suppression. *Immunology* **123**: 17-19, 2008

Lu LF, Gondek DC, Scott ZA, Noelle RJ. NF kappa B-inducing kinase deficiency results in the development of a subset of regulatory T cells, which shows a

hyperproliferative activity upon glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene stimulation. *J Immunol* **175**: 1651-1657, 2005

Lu NZ, Cidlowski JA. Translation regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol Cell* **18**:331-342, 2005

Marshall-Clarke S, Reen D, Tasker L, Hassan J. Neonatal immunity: how well has it grown up? *Immunol Today* **21**:35-41; 2000

Menon R. Spontaneous preterm birth, a clinical dilemma: etiologic, pathophysiologic and genetic heterogeneities and racial disparity. *Acta Obstet Gynecol Scand* **87**: 590-600, 2008

Michna J, Jobe AH, Ikegami M, Positive end-expiratory pressure preserves surfactant function in preterm lambs. *Am J Respir Crit Care Med* **160** (2):634-639; 1999

Mold JE, Michaelsson J, Burt TD, et al. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science* **322**: 1562-1565, 2008

Newham JP, Kallapur SG, Kramer BW, Moss TJ, Nitsos I, Ikegami M, and Jobe AH. Betamethasone effects on Chorioamnionitis induced by intra-amniotic endotoxin in sheep. *Am J Obstet Gynecol* **189**:1458-1466, 2003

Ocklenburg F. Bedeutung des Transkriptionsfaktors Foxp3 für die T-Zellfunktion, Dissertationsarbeit, 15-20, 2005

Onderdonk AB, Delaney ML, DuBois AM, Allred EN, Leviton A. Detection of bacteria in placental tissues obtained from extremely low gestational age neonates. *Am J Obstet Gynecol* **198**: 110.e1-7, 2008

Otto HF, Pathologie des Thymus, Springer Verlag, 2. Auflage, 1998

Perni SC, Vardhana S, Korneeva I, Tuttle SL, Paraskevas LR, Chasen ST, Kalish RB, Witkin SS. Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in midtrimester amniotic fluid: association with amniotic fluid cytokine levels and pregnancy outcome. Am J Obstet Gynecol **191**:1382-1386, 2004

Piccirillo CA. Regulatory T-cells in health and disease. Cytokine **43**:395-401, 2008

Pringle KC. Human fetal lung development and related animal models. Clin Obstet Gynecol **29**:502-513, 1986

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

Redline RW, Minich N, Taylor HG, Hack M. Placental lesions as predictors of cerebral palsy and abnormal neurocognitive function at school age in extremely low birth weight infants (<1kg). Pediatr Dev Pathol **10**:282-292, 2006

Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, Carr D, Schierl R, Nowak D, and von Mutius E. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. Lancet **358**: 1129-1133, 2001

Rosen D, Lee JH, Cuttitta F, Rafiqi F, Degan S, and Sunday ME. Accelerated thymic maturation and autoreactive T cells in bronchopulmonary dysplasia. Am J Respir Crit Care Med **174**:75-83, 2006

Sarkar S, Kaplan C, Wiswell TE, Spitzer AR. Histological chorioamnionitis and the risk of early intraventricular hemorrhage in infants born < or = 28 weeks gestation. *J Perinatol* **25**:749-752; 2005

Schmidt B, Cao I, Mackensen-Haen S, Kendziorra H, Klingel I, Speer CP. Chorioamnionitis and inflammation of the fetal lung. *Am J Obstet Gynecol* **185**:173-177, 2001

Shim SS, Romero R, Hong JS, Park CW, Jun JK, Kim BI, Yoon BH. Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* **191**:1339-1345, 2004

Steel JH, Malatos S, Kennea N, Edwards AD, Miles L, Duggan P, Reynolds PR, Feldman RG, Sullivan MH. Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor. *Pediatr Res* **57**:404-411, 2005

Speer CP, Halliday HL. Surfactant therapie in the newborn. *Curr Pediatr* **4**:5-9, 1994

Speer CP. Neonatal respiratory distress syndrome: an inflammatory disease? *Neonatologie* **99**(4):316-319, 2011

Speer CP. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia: A continuing story. *Semin Fetal Neonatal Med* **11**:354-362, 2006

Speer CP. New insights into the pathogenesis of pulmonary inflammation in preterm infants. *Biol Neonate* **79**:205-209, 2001

Stevens TP, Blennow M, Soll RF. Early surfactant administration with brief ventilation vs selective surfactant and continued mechanical ventilation for preterm infants with or at risk for respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* (3): CD003063, 2004

Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Lemons JA, Donovan EF, Stark AR, Tyson JE, Oh W, Bauer CR, Koreones SB, Shankaran S, Laptook AR, Stevenson DK, Papile LA, Poole WK. Changes in pathogens causing early-onset sepsis in very-low-birth-infants. *N Engl J Med* **347**:240-247; 2002

Thomas W, Speer CP. Chorioamnionitis: important risk factor or innocent bystander for neonatal outcome? *Neonatology* 99(3):177-187, 2011

Toti P, De Felice C, Stumpo M, Schurfeld K, Di Leo I, Vatti R Bianciardi G, Buonocore G, Seemayer TA, Luzi P. Acute thymic involution in fetuses and neonates with chorioamnionitis. *Hum Pathol* **31**:1121-1128, 2000

Van Baarlen J, Schuurmann HJ, Huber J. Acute thymus involution in infancy and childhood: a reliable marker for duration of acute illness. *Hum Pathol* **19**:1155-1160, 1988

Van Baarlen J, Schuurmann HJ, Reitsma R, and Huber J. Acute thymus involution in infancy and childhood: immunohistology of the thymus and peripheral lymphoid tissues after acute illness. *Pediatr Pathol* **9**:261-275, 1989

Von Mutius E. Allergies, infections and the hygiene hypothesis- the epidemiological evidence. *Immunobiology* **212**:433-439, 2007

Welsch U, Lehrbuch für Histologie, Elsevier Urban und Fischer Verlag, 2. Auflage, 2009

Watterberg KL, Demers LM, Scott SM, Murphy S. Chorioamnionitis and early lung inflammation in infants in whom bronchopulmonary dysplasia develops. *Pediatrics* **97**:210-215, 1996

Willet KE, Jobe AH, Ikegami M, Brennan S, Newnham J, Sly PD. Antenatal endotoxin and glucocorticoid effects on lung morphometry in preterm lambs. *Pediatr Res* **48**:782-788, 2000

Wirbelauer J, Seidenspinner S, Thomas W, Kunzmann S, Speer CP. Funisitis is associated with increased interleukin-10 gene expression in cord blood mononuclear cells in preterm infants ≤ 32 weeks of gestation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **155**(1):31-35, 2011

Wirbelauer J, Speer CP. The role of surfactant treatment in preterm infants and term newborns with acute respiratory distress syndrome. *J Perinatol, Suppl* **2**:18-22, 2009

Wolfs TG, Buurmann WA, Zoer B, et al. Endotoxin induced chorioamnionitis prevents intestinal development during gestation in fetal sheep. *Plos One* **4e** 5837, 2009

Wood NS, Costeloe K, Gibson AT, Hennessey EM, Marlow N, Wilkinson AR. The EPICure Study: growth and associated problems in children born at weeks of gestational age or less. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **88**:F492-500, 2003

Wood NS, Costeloe K, Gibson AT, Hennessey EM, Marlow N, Wilkinson AR. The EPICure Study: associations and antecedents of neurological and developmental disability at 30month of age following extremely preterm birth. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **90**:F134-140, 2005

Yang XF. Factors regulating apoptosis and homeostasis of CD4⁺ CD25(high) FoxP3⁺ regulatory T cells are new therapeutic targets. *Front Biosci* **13**:1472-1499, 2008

Yinon Y, Zalel Y, Weisz B, Mazaki-Tovi S, Sivan E, Schiff E, and Achiron R. Fetal thymus size as a predictor of chorioamnionitis in women with preterm

premature rupture of membranes. *Ultrasound Obstet Gynecol* **29**: 639-643, 2007

Yoon BH, Romero R, Park JS, Kim CJ, Kim SH, Choi JH, Han TR. Fetal exposure to an intra-amniotic inflammation and the development of cerebral palsy at the age of three years. *Am J Obstet Gynecol* **182**:675-681, 2000

Yoon BH, Romero R, Park JS, Kim M, Oh SY, Kim CJ, Jun JK. The relationship among inflammatory lesions of the umbilical cord (funisitis), umbilical cord plasma interleukin 6 concentration, amniotic fluid infection, and neonatal sepsis. *Am J Obstet Gynecol* **183**:1124-1129, 2000

Yu CC, Filipe MI. Update on proliferation-associated antibodies applicable to formalin-fixed paraffin-embedded tissue and their clinical applications. *Histochem J* **25**: 843-853, 1993

Zimmermann LJ, Janssen DJ, Tibboel D, Hamvas A, Carnielli VP. Surfactant metabolism in the neonate. *Biol Neonate* **87**:296-307; 2005

Danksagung

Mein Dank gilt Herren Prof. Dr. med. C. P. Speer, FRCPE und Prof. Dr. Dr. med. Boris W. Kramer für die Überlassung des Themas und die Korrektur der Arbeit.

Vielen Dank an Frau Prof. Dr. Ulrike Kämmerer, Michaela Kapp, Silvia Seidenspinner und Daniela Herbst für die Unterstützung bei der Laborarbeit.

Herzlich bedanke ich mich bei all denjenigen, die mich beim Bildbearbeiten und Korrekturlesen unterstützt haben. Insbesondere danke ich meinem Bruder Holger und Christian Seume für das Layout.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Manfred Lutz bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferats.

Vor allem danke ich meinen Eltern. Dank ihrer immerwährenden Unterstützung konnte ich das Medizinstudium absolvieren und diese Arbeit verfassen.

Lebenslauf

Name: Kerstin Marisa Glogger

Ausbildung:

1998 Allgemeine Hochschulreife

1998-2005 Studium der Medizin, Friedrich-Schiller-Universität
Jena und Julius-Maximilians-Universität Würzburg

seit 2012 Fachärztin für Orthopädie und Unfallchirurgie

Augsburg, Dezember 2012