

**Aus dem Institut für Tropenmedizin der Universität Tübingen**

**Direktor: Professor Dr. J. Knobloch**

**Sektion Humanparasitologie**

**Leiter: Professor Dr. P.G. Kremsner**

**Auswirkungen plazentarer *Plasmodium falciparum*-  
Infektionen primigravider Mütter auf die Ausbildung  
einer Immunantwort bei Neugeborenen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhards-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Stephan Brenner  
aus Nürtingen**

**2006**



Dekan: Professor Dr. C.D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. P.G. Kremsner

2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Biedermann



## **Abkürzungsverzeichnis:**

BCG – Bacillus-Calmette-Guérin	µg – Mikrogramm
BSA – Bovine Serum Albumin	µl – Mikroliter
°C – Grad Celsius	mg – Milligramm
CBMC – Cord Blood Mononuclear Cell	ml – Milliliter
CD – Cluster of Differentiation	MSP – Merozoite Surface Protein
CSA – Chondroitinsulfat A	ng – Nanogramm
CSF – Colony Stimulating Factor	NK – Natural Killer
ELISA – Enzyme- Linked Immunosorbent Assay	NO – Stickstoffmonoxid
g – Gramm	n.s. – nicht signifikant
HE – Hämatoxilin-Eosin	P. – Plasmodium
HEPES – 4-(2- hydroxyethyl)-1- piperazineethanesulfonic acid	PBS – Phosphate Buffered Saline
ICAM – Intercellular Adhesion Molecule	PfEMP – Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein
IFN – Interferon	Pg – Pikogramm
IG – Infektion Geburt	PHA – Phytohämagglutinin
Ig – Immunglobulin	PPD – Purified Protein Derivate
IL – Interleukin	RPMI – Roswell Park Memorial Institute
IS – Infektion Schwangerschaft	SSW – Schwangerschaftswoche
ITP – Intermittent Preventive Treatment	T <sub>H</sub> – T-Helferzelle
KG – Körpergewicht	TMB – Tetramethylbenzidin
kg – Kilogramm	TNF – Tumor Necrosis Factor
KI – Keine Infektion	TSP – Thrombospondin
l – Liter	VCAM – Vascular Cell Adhesion Molecule
LSA – Liver Stage Antigen	WHO – World Health Organization

## Inhaltsverzeichnis:

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1. Definition der Malaria und Klassifizierung der Erreger	1
2. Entwicklungszyklus des Parasiten	1
3. Epidemiologie	3
1.3.1. Epidemiologie allgemein	3
2. Epidemiologie bei Schwangeren und Neugeborenen	4
1.4. Krankheitsbild und Pathologie	5
1. Klinische Symptome der Malaria	5
2. Malaria in der Schwangerschaft	6
3. Malaria beim Neugeborenen	7
4. Pathogenese der Malaria	8
5. Pathogenese in der Schwangerschaft	10
6. Pathogenese beim Neugeborenen	12
1.5. Therapie der Malaria	12
1.5.1. Therapie in der Schwangerschaft	13
2. Therapie bei Kindern und Neugeborenen	14
1.6. Immunantwort und Immunmechanismen	15
1. Mechanismen der Immunantwort	15
2. T <sub>H</sub> 1- und T <sub>H</sub> 2-Immunantwort	16
3. Zytokine	18
4. Immunologische Vorgänge während Schwangerschaft	21
5. Immunsystem des Neugeborenen	22
7. Immunologische Vorgänge bei Plasmodieninfektion	24
1. Immunologische Vorgänge bei plazentarer Plasmodieninfektion	26
2. Immunologische Vorgänge des Neugeborenen bei Plasmodieninfektion	28
1.8. Zielsetzung	30

<b>2. Patienten und Methoden</b>	<b>31</b>
2.1. Studienort	31
2.2. Patienten und Aufnahmekriterien	33
2.3. Vorgehensweise bei Aufnahme	34
2.4. Therapie der Patienten	35
2.5. Diagnostik und Methoden	35
2.5.1. Bestimmung der Parasitämie	35
2.5.2. Separation der CBMC	36
2.5.3. Bestimmung der Zellzahl	36
2.5.4. Stimulation der CBMC	37
2.5.5. Bestimmung der Zytokinantwort	39
6. Statistische Auswertung	40
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>42</b>
3.1. Epidemiologische Auswertung	43
3.1.1. Konnatale Malaria	43
3.1.2. Malaria bei Geburt	44
3. Effekt von Chemoprophylaxe während der Schwangerschaft	44
3.2. Auswertung der CBMC-Stimulationen	45
1. Häufigkeitsverteilung der stimulierten Proben	45
3.2.2. Antwortraten nach Stimulation	46
3.2.2.1. Responderhäufigkeiten	46
3.2.2.2. Antwortraten bezogen auf Stimulans	47
3. Auswertung der Zytokinkonzentrationen	49
3.3.1. Charakteristik der Messdaten	50
3.3.2. Vergleich der Zytokinkonzentrationen	50
3.3.2.1. Konzentrationsvergleich für IL-10	51
3.3.2.2. Konzentrationsvergleich für IL-12	52
3.3.2.3. Konzentrationsvergleich für IFN- $\gamma$	53
4. Korrelationsergebnisse	55
1. Korrelation zwischen Isolat-Stimulantien und PPD in der	

Zytokinproduktion	55
2. Korrelation zwischen Zytokinpaaren bei Stimulation mit Isolaten	57
<b>4. Diskussion</b>	<b>60</b>
4.1. Auswirkungen des Infektionsmodus auf die Immunantwort	61
1. Interpretation der Responderaktivität in den Gruppen	61
2. Interpretation der Zytokinproduktion in den Gruppen	63
2.1. Interpretation der Zytokinproduktion nach Mitogen-Stimulation	64
2.2. Interpretation der Zytokinproduktion nach Stimulation mit PPD	65
2.3. Interpretation der Zytokinproduktion nach Isolat-Stimulation	67
4.2. Rückschlüsse aus dem Zytokinmuster auf die Art der Immunantwort	69
4.2.1. Einfluss der Lysat-Stimulantien auf die Zytokinbildung	70
4.2.2. Interpretation der verschiedenen Zytokinbildungsprofile	71
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>76</b>
<b>6. Verwendete Materialien</b>	<b>78</b>
<b>7. Literaturverzeichnis und Quellennachweise</b>	<b>80</b>
<b>8. Danksagung</b>	<b>97</b>
<b>9. Lebenslauf</b>	<b>98</b>





## 1. Einleitung

### 1.1. Definition der Malaria und Klassifizierung der Erreger

Malaria ist eine Infektionskrankheit der tropischen und subtropischen Regionen, die durch verschiedene Arten von Plasmodien hervorgerufen wird. Die Gattung **Plasmodium** wird zu den **Protozoen**, und dort zur Ordnung der **Haemosporida** gezählt<sup>1</sup>. Weltweit finden sich mehr als hundert Plasmodienarten, von denen nur *P. falciparum* (Malaria tropica), *P. malariae* (Malaria quartana), *P. ovale* und *P. vivax* (beide Malaria tertiana) zu den humanpathogenen Arten gehören. Infektionen mit schwerem Krankheitsverlauf erfolgen meist durch *P. falciparum*, dem Erreger der *Malaria tropica*<sup>2</sup>.

### 1.2. Entwicklungszyklus des Parasiten

Plasmodien sind intrazelluläre Parasiten, die einen zweiteiligen Entwicklungszyklus aufweisen, der in unterschiedlichen Wirtsorganismen stattfinden. (siehe Abb. 1 „Lebenszyklus des Parasiten“).

Der **ungeschlechtlich Vermehrungszyklus** findet im Menschen statt, nachdem die Plasmodien als **Sporozoiten** durch die weibliche *Anopheles*-mücke während einer Blutmahlzeit in die menschliche Blutbahn injiziert wurden. Nach nur wenige Minuten dauerndem Aufenthalt in der Zirkulation dringen die Erreger in die Parenchymzellen der Leber ein. In der Leber entwickeln sich die Sporozoiten durch ungeschlechtliche Teilung (**Schizogonie**) in präerythrozytäre **Schizonten**. In diesem mehrere Tage andauernden Stadium exprimiert der Parasit die leberstadien-spezifischen Antigene (z.B. LSA-1).

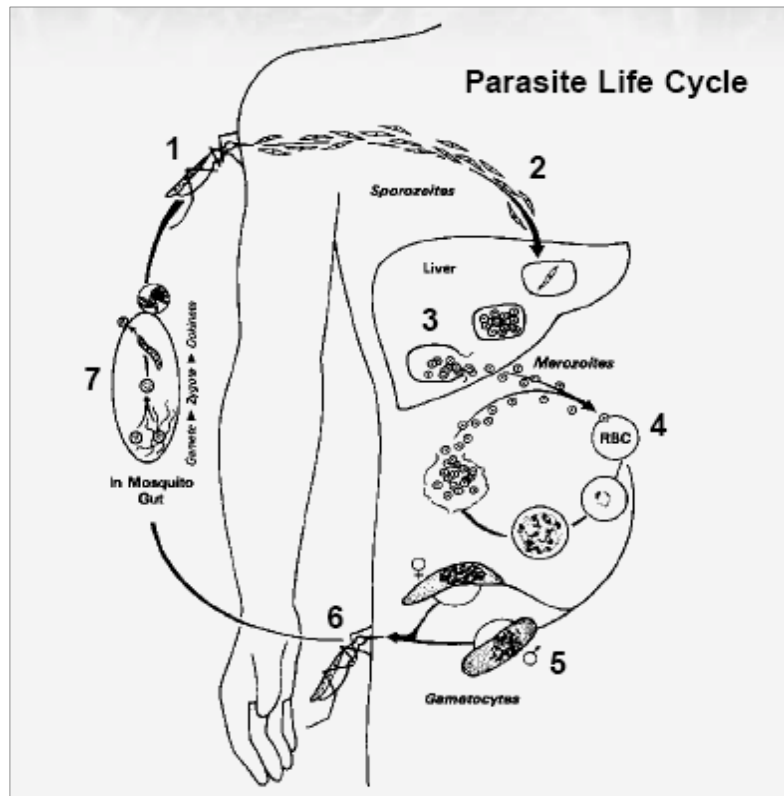


Abb.1: Lebenszyklus des Parasiten<sup>2</sup>

Bei *P. ovale* und *P. vivax* sind in die Leberzellen eingedrungenen Sporozoiten in der Lage sogenannte Hypnozoitenstadien auszubilden. Diese **Hypnozoiten** können noch nach Jahren ein Wiederauftreten der Erkrankung verursachen. Nach abgeschlossener Schizogonie rupturieren die infizierten Leberparenchymzellen und setzen die Parasiten als **Merozoiten** in die Blutbahn frei. In den Erythrozyten des peripheren Blutes, entwickeln sich die Merozoiten zu **Trophozoiten**, den sogenannten „Ringformen“. Diese bestehen aus einem Zellkern mit schwachem Zytoplasmasaum und sind von einer Vakuole umschlossen. In dieser erythrozytären Phase entwickeln sich die Erreger erneut durch ungeschlechtliche Zellteilung zu mehrkernigen Schizonten, die nach Ruptur der Blutzelle wiederum frei als Merozoiten in die Blutbahn übertreten. Je nach Plasmodienart variiert die Anzahl gebildeter Merozoiten und ist für *P. falciparum* mit 8-32 Merozoiten je Schizont am höchsten. Durch erneuten Erythrozytenbefall durch die freigesetzten Merozoiten schließt sich der erythrozytäre Zyklus,

der bei *P. falciparum* etwa 48 Stunden dauert. Antigene dieser asexuellen Blutstadien sind u.a. die Merozoiten-Surface-Proteine (MSP-1 bis 5)<sup>3</sup>.

Einige Merozoiten entwickeln sich durch sexuelle Differenzierung (**Gamogonie**) weiter zu männlichen **Mikrogametozyten** und weiblichen **Makrogametozyten**. Diese sexuellen Stadien können sich nicht im Menschen weitervermehren, sondern müssen von einer Anophelesmücke während einer Blutmahlzeit aufgenommen werden. Durch **geschlechtliche** und später ungeschlechtliche Vermehrung in der Mücke entstehen erneut Sporozoiten, die im weiteren Verlauf wieder auf den Menschen übertragen werden können<sup>1,4</sup>

### 1.3. Epidemiologie

#### 1.3.1. Epidemiologie allgemein

Malaria verursacht unter allen Infektionskrankheiten – mit Ausnahme der Tuberkulose – weltweit die meisten Todesfälle. Malaria stellt somit eines der gravierendsten Gesundheitsprobleme in mehr als 90 Ländern der Welt dar. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) leben 40% der Weltbevölkerung, (etwa 2,4 Milliarden Menschen) in Gebieten mit teilweiser oder ganzjähriger Malariaübertragung. Malaria tritt gegenwärtig in 101 Ländern auf, darunter allein 45 in Afrika. Die weltweite Inzidenz beläuft sich auf **300-500 Millionen Fälle pro Jahr** mit einer Mortalitätsrate von mindestens **1,1 Millionen Menschen jährlich**<sup>5</sup>.

In Afrika südlich der Sahara leben etwa 74% der Bevölkerung in hochendemischen Gebieten mit ganzjähriger *P. falciparum*-Transmission. Ungefähr 90% aller Malariafälle, sowie die überwiegende Mehrheit der durch Malaria verursachten Todesfälle, treten im tropischen Afrika auf – vorwiegend bei **Kindern, Immungeschwächten** und **Schwangeren**<sup>6,7</sup> (siehe Abb.2 „Malariatransmission in Afrika“).

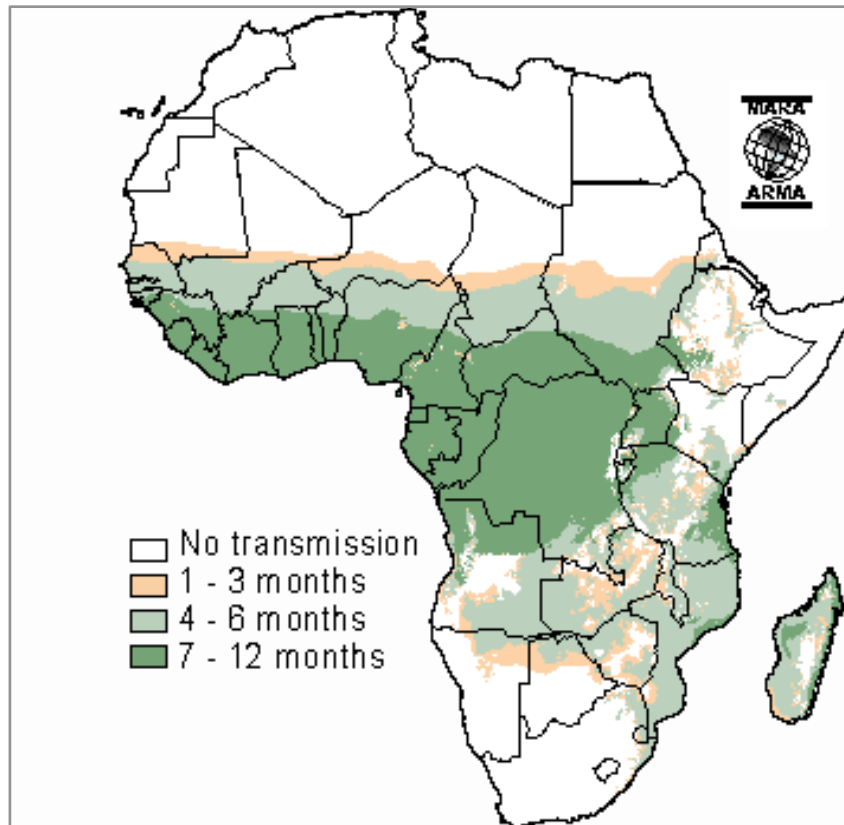


Abb.2: Malariatransmission in Afrika<sup>8</sup>

### 1.3.2. Epidemiologie bei Schwangeren und Neugeborenen

Unter den in Endemiegebieten Afrikas lebenden Frauen rechnet man jährlich mit mindestens **24 Millionen Schwangerschaften**. Schwangere gelten als eine der Hauptrisikogruppen für Malaria im Erwachsenenalter. Ausmaß und Folgen einer Infektion sind von der jeweiligen Erregerart abhängig. Die durch *P. falciparum*-Malaria bedingte Sterblichkeit bei schwangeren Frauen in Afrika beläuft sich auf etwa **10.000 pro Jahr**, wobei Anämie als weitaus häufigste malariainduzierte Todesursache innerhalb dieser Patientengruppe gilt<sup>9</sup>.

Schätzungen ergeben, dass in Endemiegebieten Afrikas **8-14 % aller Neugeborenen** mit zu geringem Geburtsgewicht (<2500g gemäß Definition) und **3-8 % aller Säuglinge**, die während der ersten Lebensmonate versterben, negative Folgen einer *P. falciparum*-Infektion während der Schwangerschaft darstellen<sup>9</sup>. Ein zusätzliches epidemiologisches Problem hinsichtlich der erhöhten

Erkrankungswahrscheinlichkeit Neugeborener stellt sich bei HIV-infizierten und zusätzlich an Malaria erkrankten Müttern dar, die durch die Plasmodieninfektion mit gesteigertem Risiko auch das HI-Virus perinatal auf das Kind übertragen können<sup>10,11</sup>.

## 1.4. Krankheitsbild und Pathologie

### 1.4.1. Klinische Symptome der Malaria

Alle klinischen Symptome und pathogenetischen Manifestationen beim Menschen werden durch die asexuellen, erythrozytären Stadien des Plasmodienzyklus verursacht und setzen demzufolge zeitlich kurz nach der Erythrozyteninvasion ein<sup>12</sup>.

Klinischer Verlauf und Symptome hängen stark vom bereits bestehenden Immunstatus des Erkrankten, sowie dem Endemiegebiet ab<sup>13,14</sup>. Personen, die in hyper- bis holoendemischen Malariagebieten aufwachsen, erlangen im Laufe der Zeit einen hohen Immunitätsgrad, der vor schwer verlaufenden Erkrankungen schützt<sup>15</sup>. Vollständige Immunität wird jedoch nie erreicht, es handelt sich vielmehr um eine Teil- bzw. Semiimmunität, die bei Aufenthalt außerhalb eines Endemiegebietes verloren gehen kann<sup>16</sup>. Die Semiimmunität wird also durch ständige Reinfektionen aufrecht erhalten, die sogenannte „natürliche Boosterung“<sup>12,17</sup>.

Im Allgemeinen beginnen Malariasymptome als grippeähnliche Erkrankung meist 8-30 Tage (speziesabhängig) nach Infektion, also mit dem Eindringen des Erregers in die Blutbahn. Semiimmune Patienten durchlaufen häufig milde bis **asymptomatische Formen**. Kopf- und Gelenkschmerzen, Fieber, Bauchschmerzen, Milzschwellung, Erbrechen und Durchfall in unterschiedlichen Kombinationen und Intensitäten sind bei diesen Patienten die vorrangigen Symptome<sup>18</sup>. Die für Malaria charakteristischen zyklischen Fieberverläufe sind vom erythrozytären Vermehrungszyklus der jeweiligen Plasmodienart abhängig. *P. falciparum* zeigt selten rein zyklische Fieberverläufe<sup>19</sup>, während *P. vivax*, *P.*

*ovale* und *P. malariae* eher zu den klassischen Malariaanfällen mit periodisch wiederkehrenden Fieberanfällen führen<sup>1,6,12</sup>.

**Schwere Formen** der Erkrankung weisen eine außerordentlich hohe Mortalität. Sie werden fast ausschließlich bei Kindern, nichtimmunen Erwachsenen (Touristen, Personen nach längerem Aufenthalt in Nichtendemiegebieten) und Schwangeren beobachtet<sup>20-23</sup>. Zu den Symptomen schwerer Malaria zählen zerebrale Symptome (Krampfanfälle, Koma)<sup>24,25</sup>, schwere Anämie<sup>26</sup>, Nierenversagen, Lungenödem, schwere Hypoglykämie, Kreislaufschock, disseminierte intravasale Gerinnung, Krampfanfälle, schwere metabolische Azidose und Makrohämaturie. Andere typische Manifestationen schwerer Malaria sind massive Hyperparasitämie im Blutbild (>5% der Erythrozyten infiziert)<sup>27</sup>, hohes Fieber (>40°C), Ikterus und Bewusstseinsstörungen<sup>1,22</sup>.

#### 1.4.2. Malaria in der Schwangerschaft

Klinische Manifestationen einer Malaria während einer Schwangerschaft hängen stark vom Immunitätsgrad der schwangeren Frau ab. Infektion einer nichtimmunen Schwangeren mit *P. falciparum* erhöht ihr Risiko an Anämie, Hypoglykämie und Lungenödem zu erkranken um ein Vielfaches<sup>28,29</sup>. Schwangere entwickeln häufiger zerebrale oder andere komplikationsreiche Formen schwerer Malaria<sup>24,28</sup>. Auswirkungen dieser 4- bis 12-fach erhöhten Infektionsanfälligkeit gegenüber nichtschwangeren Erwachsenen führen zu einem perinatal gehäuften Auftreten von Fehl-, Tot- und Frühgeburten<sup>30</sup>. Ebenso lässt sich in vielen Fällen intrauteriner Wachstumsretardierung ein eindeutiger Zusammenhang mit einer mütterlichen Malariainfektion nachweisen<sup>31,32</sup>. Oft lässt sich eine Abnahme des Geburtsgewichtes um 55-650 Gramm bei solchen Neugeborenen aufgrund einer plazentaren Plasmodieninfektion beobachten<sup>30</sup>. Dies stellt einen bedeutenden Risikofaktor für erhöhte Säuglingssterblichkeit dieser Kinder in den ersten Lebensmonaten dar<sup>9,33</sup>.

Diese Auswirkungen auf Mutter und Kind werden bei **nichtimmunen Schwangeren** aus Endemiegebieten mit niedriger jährlicher Transmission in höherem Ausmaß beobachtet als bei semiimmunen Schwangeren aus Gegenden mit

ganzjährig hoher Transmissionsrate<sup>28,34</sup>. Die Resistenzausbildung dieser Mütter bleibt trotz vereinzelt auftretender Plasmodieninfektionen unterentwickelt, da die erforderlichen Infektionsraten zu gering sind<sup>35</sup>. In hypoendemischen Gebieten ist deshalb bei infizierten, nichtimmunen Schwangeren die Abortrate vor allem während des ersten Trimenons stark erhöht<sup>36</sup>.

Auch bei **semiimmunen Schwangeren** aus Endemiegebieten mit ganzjährig hoher Transmission können schwere Infektionen mit gravierender klinischer Malariasymptomatik auftreten<sup>37-39</sup>. Besonders erstmalig schwangere Frauen zeigen bei *P. falciparum*-Infektionen oft schwere Formen von Anämie, die für das Auftreten perinataler Komplikationen verantwortlich ist. Bei erkrankten Erstgebärenden ist dadurch das Risiko für Fehl- und Frühgeburten höher. Auch ist die Abnahme des kindlichen Geburtsgewichts öfter beobachtbar<sup>40</sup>. Dieses Risiko scheint sich jedoch im Verlauf derselben Schwangerschaft und später bei jeder weiteren aufgrund sich ausbildender Abwehrmechanismen wieder zu verringern<sup>37,41-43</sup>.

#### 1.4.3. Malaria beim Neugeborenen

Als **Neugeborenenmalaria** wird das Auftreten einer Malariaerkrankung während der ersten Lebenstage bezeichnet<sup>44</sup>. Der Infektionsweg ist jedoch nicht immer eindeutig nachvollziehbar. Eine konnatal oder perinatal erworbene Malaria wird durch infizierte mütterliche Erythrozyten auf das Neugeborene übertragen und kann während der Schwangerschaft oder erst beim Geburtsvorgang erfolgen<sup>45</sup>. Sofort nach Geburt besteht die Möglichkeit der Übertragung von Plasmodien durch Mückenstiche. Vor allem immungeschwächte, frühgeborene oder unterentwickelte Säuglinge zeigen eine erhöhte Anfälligkeit für Malariaerkrankungen während der ersten Lebens-wochen<sup>46</sup>.

Die **konnatale Malaria** ist eine relativ seltene und nicht immer eindeutig belegbare Form der Infektion, da die intakte Plazenta als mechanische Barriere eigentlich einen Übertritt des Parasiten auf das Ungeborene verhindern sollte. Zusätzlich hat die transplazentare Übertragung malariaspezifischer maternaler IgG-Antikörper bei teilimmunen Müttern eine protektive Wirkung auf den



Föten<sup>47-49</sup>. Dennoch ist eine pränatale Übertragung des Erregers von Mutter auf das Kind nicht völlig auszuschließen, denn die Erkrankung kann noch Monate später nach Abklingen des übertragenen Immunschutzes im kindlichen Organismus ausbrechen<sup>46,50,51</sup>. Infizierte Neugeborene sind bei Geburt meist symptomlos, entwickeln aber schon nach wenigen Tagen typische Zeichen einer schweren Malariainfektion, wie hohes Fieber, hämolytische Anämie mit Parasitämie, Atemwegsbeschwerden, Diarrhö, Hepatosplenomegalie und Gelbsucht<sup>52</sup>.

Untersuchungen ergaben darüber hinaus, dass Säuglinge, deren Mütter während der Schwangerschaft eine Malariainfektion erlitten, wesentlich früher und stärker infiziert werden als gleichaltrige Kinder aus Schwangerschaften ohne mütterliche Plasmodieninfektion<sup>50</sup>.

#### 1.4.4. Pathogenese der Malaria

Die verschiedenen Symptombilder der Malaria werden durch unterschiedliche pathologische Vorgänge im Wirtsorganismus hervorgerufen und vorwiegend durch den im Blutzellsystem parasitierenden Erreger verursacht (siehe Abb. 3 „Infizierte Erythrozyten“)<sup>53</sup>.

Die wiederkehrenden **Fieberschübe** bei Malariaerkrankten sind durch die sich wiederholenden Zyklen von Lyse und erneuter Erythrozyteninvasion der Merozoiten bedingt<sup>19</sup>. Hierbei freiwerdende Glykolipide der Erreger veranlassen das Immunsystem des Wirts Zytokine (z.B. TNF, IL-1) und andere pyrogene Substanzen freizusetzen, die dann die nachfolgenden Fieberschübe auslösen<sup>54-57</sup>.

Der Befall vieler Erythrozyten bei massiver Hyperparasitämie (ab 100.000 Parasiten/ $\mu$ l, entspricht einem Anteil von etwa 5% aller Erythrozyten infiziert)<sup>58</sup> führt zu starker Autoimmunhämolyse aufgrund peroxidativer Vorgänge in befallenen Blutzellen<sup>59,60</sup>. Zytokinvermittelte Hemmung der Erythropoetinproduktion<sup>61,62</sup> und Dyserythropoese<sup>63</sup>, sowie gesteigerte Erythrozytenphagozytose<sup>64</sup> tragen zusätzlich zum Bild der schweren **Anämie** mit typischen Symptomen wie Blässe, Dyspnoe und körperlicher Schwäche bei<sup>26,65</sup>.

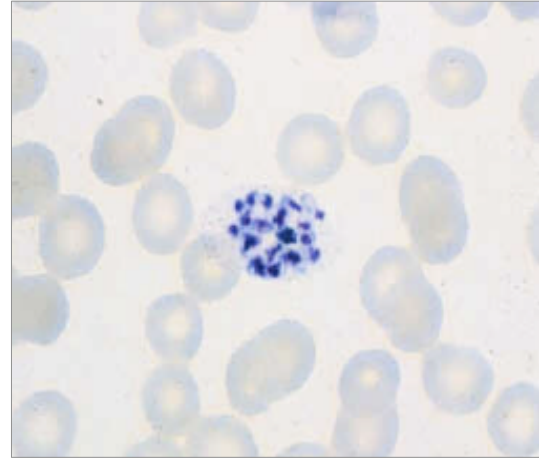
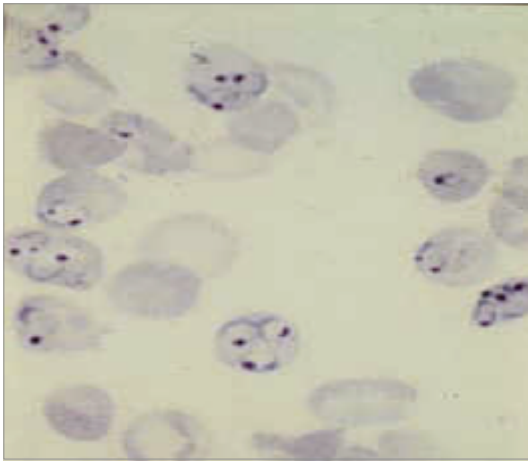


Abb. 3:

**Infizierte Erythrozyten.** Blutausstriche mit intraerythrozythären Ringformen, sog. Trophozoiten, von *P. falciparum* (links) und mehrkernigem Schizont nach asexueller Teilung von *P. vivax* (rechts).<sup>66</sup>

Die oft lebensbedrohlichen **Hypoglykämien** werden durch eine gesteigerte Glukoseaufnahme ins Gewebe ausgelöst. Die während einer Plasmodieninfektion gebildeten Phospholipide des Erregers weisen starke Antigenwirkung auf und ziehen den Anstieg von TNF- und Insulinspiegeln mit blutzucker-senkender Wirkung nach sich<sup>67-69</sup>. Gesteigerter Glukosebedarf führt zur Zunahme anaerober Glykolysemechanismen, die im Wirtsorganismus Hyperlaktatämie mit schwerwiegender metabolischer Entgleisung verursachen<sup>70</sup>.

Viele Folgesymptome erklären sich durch die extreme Immunstimulation während des Parasitenbefalls, sowie durch die massive Hämolyse. **Splenomegalie** entwickelt sich als Folge übermäßiger Aktivierung phagozytärer Zellen im retikulohistiozytären System<sup>71,72</sup>. Das Auftreten akuter und chronisch-progressiver **Nephritiden** dagegen wird durch abgelagerte Immunkomplexe in Nierenkapillaren hervorgerufen<sup>73</sup>. Jede Infektion mit Plasmodien kann darüber hinaus zu Veränderungen im **Immunsystem** des Wirtsorganismus führen und dadurch den Krankheitsverlauf bzw. die Abwehr anderer Krankheiten beeinträchtigen<sup>35</sup>.

Sequestrierung der Erythrozyten durch Adhäsion plasmodieneigener Rezeptoren an kapilläre Gefäße über spezifische Liganden (z.B. CD36, ICAM-1, VCAM-1, TSP) kann zu **zerebraler Malaria** führen und auch Schäden an

lebenswichtigen Organen (wie z.B. Gehirn, Herz, Nieren, Plazenta) verursachen. Dies kann mit Koma oder lebensbedrohlichem **Multiorganversagen** einhergehen<sup>74,75</sup>. Die Parasiten veranlassen befallene Erythrozyten, aber auch andere Blutzellen, wie Thrombozyten und Leukozyten, zu vermehrter Expression von Rezeptoren und Liganden (z.B. PfEMP-1) auf ihrer Zelloberfläche<sup>76</sup>. Vermehrte Endotheladhäsion und Rosettenbildung in Gefäßen führt letztendlich zur Unterbrechung der Mikrozirkulation im Gewebe<sup>77</sup>. Dabei spielen neben mechanischen Verstopfungen der Gefäße durch sequestrierte, parasitenbefallene Erythrozyten auch pathologisch veränderte Zytokinmuster und deren Wirkung auf Endothelzellen eine Rolle.

#### 1.4.5. Pathogenese in der Schwangerschaft

Ähnlich der zerebralen Malaria durch Sequestrierung parasitärer Erythrozyten in den Hirngefäßen, befallen die Erreger in der Schwangerschaft präferenziell die Plazenta (**plazentare Malaria**) (siehe Abb. 4 „Plasmodieninfektion der Plazenta“)<sup>78</sup>.

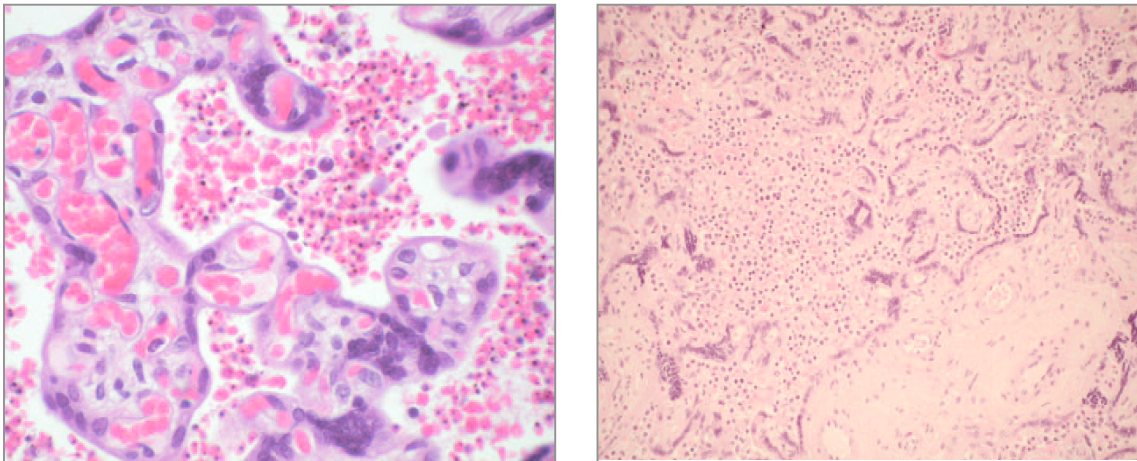


Abb.4:

**Plasmodieninfektion der Plazenta.** Infizierte mütterliche Erythrozyten im intervillösen Raum und kindliche Erythrozyten ohne Parasiten innerhalb der Zottenvilli (links, HE-Färbung, 200-fach vergrößert). **Intervillöse Entzündungsreaktion.** Infiltration des intervillösen Raumes durch monozytäre Zellen und Makrophagen mit Aussparung der Zottenvilli (rechts, HE-Färbung, 200-fach vergrößert)<sup>79</sup>.

Im peripheren Blut Schwangerer sind dabei oft nur geringe Parasitenmengen nachweisbar<sup>80</sup>. Zusätzlich zeigt sich besonders in mesoendemischen Gebieten mit geringerer *P. falciparum*-Infektionsrate innerhalb der Bevölkerung, dass Infektionen der Plazenta häufiger durch *P. falciparum* erfolgen als durch andere Plasmodien-spezien<sup>34</sup>.

Die Parasiten haften sich über spezifische Oberflächenantigene infizierter Erythrozyten an Synzytiotrophoblastenzotten und den intervillösen Raum des Plazentagewebes an. Die hauptsächlich durch die Glykosaminoglykanmoleküle *Chondroitinsulfat A* (CSA)- und *Hyaluronsäure* in der Plazenta vermittelte Adhäsion<sup>81,82</sup> führt zu verstärktem Einwandern von Immunzellen<sup>83</sup>. Die dadurch ausgelösten Entzündungsreaktionen mit anschließender Nekrose und Fibrinablagerung im placentaren Gewebe<sup>80</sup> verursacht eine insuffiziente Versorgung des Ungeborenen und hat somit negative Auswirkungen auf Schwangerschaftsdauer und Geburtsgewicht<sup>84</sup>. Zusätzlich erhöht sich das Risiko Neugeborener in den ersten zwei Lebensjahren an schwerer Malaria zu erkranken<sup>50</sup>.

Ein teilweiser Infektionsschutz entwickelt sich bei Frauen, die in der Lage sind, die Plasmodienanheftung der Plazenta durch Bildung spezifischer IgG-Antikörper gegen Plasmodienoberflächenantigene, sogenannte Anti-Adhäsionsantikörper, zu verhindern<sup>85,86</sup>. Dieser humorale Immunschutz ist allerdings bei Erstgebärenden noch nicht ausreichend ausgebildet, nimmt aber im Laufe weiterer Schwangerschaften kontinuierlich zu<sup>41,87</sup>.

Auch Schwangere werden, trotz vorher vorhandenem protektivem Immunstatus, während einer Schwangerschaft einem höheren Erkrankungsrisiko ausgesetzt. Semiimmune Frauen endemischer Gebiete zeigen ein zunehmendes Auftreten klinischer Malariasymptomatik bzw. massiveren Parasitenbefall im Blut während der Schwangerschaft bis etwa zwei Monaten nach der Entbindung. Die gesteigerte Krankheitsanfälligkeit hat ihr Maximum im ersten Trimenon und nimmt gegen Schwangerschaftsende hin wieder ab. Monate nach der Schwangerschaft weisen diese Frauen dann erneut ihren früheren Immunschutz auf. Dieses Phänomen hängt mit einem relativen Immunitätsverlust aufgrund immunologischer Veränderungen des schwangeren Organismus zusammen (**selektive Immunsuppression**)<sup>37,88</sup>.

#### 1.4.6. Pathogenese beim Neugeborenen

Der plazentare Befall durch Malariaerreger führt zu Entzündungsreaktionen und Fibrosierungen am **feto-maternalen Übergang** der Trophoblasten. Je nach Parasitendichte und Schwere einer mütterlichen Anämie können dadurch gravierende Folgen für die kindliche Blutversorgung über den mütterlichen Kreislauf entstehen. Eine Unterversorgung äußert sich beim Kind durch verringertes Geburtsgewicht sowie eine allgemeine Wachstumsretardierung<sup>89</sup>.

Der heranwachsende **Fötus** und sein sich entwickelndes Immunsystem kommen über die Plazentaschranke mit Parasitenantigenen in Kontakt<sup>90</sup>. In vielen Fällen plazentarer Malaria bzw. bei einer perinatalen Infektion mit Erregerübertragung von der Mutter auf ihr Kind weisen Neugeborene bereits eigene IgM-Antikörper auf, die spezifisch gegen die *in utero* aufgetretenen Antigene bzw. Erreger gerichtet sind<sup>91</sup>.

Zusätzlich überträgt die Mutter während der Schwangerschaft plazentagängige IgG-Antikörper auf ihr Kind. Diese plasmodienspezifischen Antikörper verleihen dem Fötus, und später auch dem Neugeborenen, gewissen Schutz gegenüber prä- bzw. postnatale Plasmodieninfektionen. **Neugeborene** weisen deshalb bereits vor der ersten natürlichen Malariainfektion eine plasmodienspezifische Immunabwehr auf<sup>92</sup>, jedoch nehmen die mütterlichen Antikörper im Laufe des ersten halben Jahres stetig ab<sup>49</sup>. Die Effektivität des kindlichen Immunstatus hängt deshalb vom Schwangerschaftsverlauf, der Schwere der mütterlichen bzw. plazentaren Infektion, sowie dem Reifezustand des Neugeborenen ab.

#### 1.5. Therapie der Malaria

Zur medikamentösen Behandlung der Malaria gibt es ein weites Spektrum von Chemotherapeutika. Da die Effektivität vieler Medikamente von Erregerart und jeweiligen regionalen Resistenzbildungen abhängt, muss die optimale Therapiewahl entsprechend individuell ermittelt werden<sup>93</sup>.

*P. falciparum*, Auslöser der *Malaria tropica*, weist häufig Multiresistenzen gegen die geläufigen Medikamentenkombinationen auf. In einigen Gegenden der Welt gilt **Chloroquin** jedoch immer noch als Mittel der Wahl bei Nicht-*Falciparum*-Malaria bzw. unkomplizierter *Falciparum*-Malaria, wenn ausreichende Sensitivität des jeweiligen Erregers gegeben ist<sup>1</sup>.

In chloroquinresistenten Gebieten wird in erster Linie das Kombinationspräparat **Sulfadoxin-Pyrimethamin** zur Behandlung unkomplizierter *Falciparum*-Malaria angewandt. Alternativen dazu bieten **Mefloquin**, **Artesunat**, **Atovaquon** plus **Proguanil** oder **Artemether** plus **Lumefantrin**. Beim Auftreten multiresistenter Erregerstämme sowie in Fällen komplizierter *Falciparum*-Malaria wird meist **Chinin**, oft in Kombination mit **Tetrazyklinen**, als Therapeutikum gewählt. Unter intensivmedizinischen Bedingungen kann die Chiningabe in Kombination mit Doxycyclin auch parenteral erfolgen<sup>1,94</sup>.

Obwohl zur Zeit noch keine wirksame Schutzimpfung zur Malariavorbeugung vorhanden ist, kann das individuelle Infektionsrisiko dennoch durch prophylaktische Maßnahmen verringert werden. Dazu zählen **Expositionsprophylaxe** (Vermeidung von Mückenstichen), **Chemoprophylaxe** (je nach geographischem Risikogebiet unterschiedlich) und die sogenannte „**standby therapy**“ (Notfallbehandlung) für den Akutfall<sup>1</sup>

#### 1.5.1. Therapie in der Schwangerschaft

Medikamentöse Interventionen sind während einer Schwangerschaft aufgrund möglicher Nebenwirkungen für das Ungeborene oft eingeschränkt. Obwohl bei vielen Wirkstoffen größte Vorsicht geboten ist, sollte dies im Falle einer Malariaerkrankung und den damit verbundenen negativen Auswirkungen auf Mutter und Kind gesondert beurteilt werden. Zu den in der Schwangerschaft kontraindizierten Antimalariamedikamenten zählen Primaquin, Tetrazykline, und Halofantrin. Auch die Kombinationspräparate Atovaquon plus Proguanil und Artemether plus Lumefantrin sollten vermieden werden. Als Therapieempfehlung bei unkomplizierter *Falciparum*-Malaria gilt **Chloroquin**, das sich in jedem Trimenon als sicher erwiesen hat<sup>95</sup>.

Bei resistenten Erregern wird **Sulfadoxin-Pyrimethamin** oder **Chinin** unabhängig vom Schwangerschaftsstadium gegeben, **Mefloquin**gabe sollte im ersten Trimenon jedoch vermieden werden<sup>96,97</sup>. Multiresistente *Falciparum*-Stämme werden mit einer Kombination aus **Chinin** und **Clindamycin** therapiert. Als Alternative kann **Artesunat** angewendet werden, allerdings nicht vor dem zweiten Trimenon<sup>1,94</sup>. Aufgrund zunehmender Resistenzen gegenüber Chloroquin, häufiger Nebenwirkungen vieler Antimalariamedikamente und geringer Compliance bei der relativ aufwendigen Chinintherapie, besteht die Dringlichkeit, weitere Alternativen an schwangerschaftstauglichen Therapeutika bzw. wirksame Impfstoffe zu finden<sup>5</sup>.

Prophylaktisch wirkungsvoll ist die Einnahme von Chloroquin als komplette **Chemoprophylaxe** während der Gesamtschwangerschaft oder als intermittierende präventive Therapie (ITP) mit mindestens zwei Behandlungen in der Schwangerschaft. Positive Auswirkungen einer solchen Schwangerschaftsprophylaxe hinsichtlich placentarer Infektionsrate und Geburtsgewichtsreduktion wurden nachgewiesen. Als wirkungsvolle **Expositionsprophylaxe** für Mutter und Kind wird der Gebrauch insektizidbehandelter Moskitonetze angesehen<sup>9</sup>.

#### 1.5.2. Therapie bei Kindern und Neugeborenen

Für Kleinkinder und Neugeborene gelten die weitgehend gleichen Therapieprotokolle wie bei erwachsenen Patienten. Es muss jedoch darauf geachtet werden, einzelne Medikamentendosen dem Körpergewicht entsprechend anzupassen. Bei Säuglingen und Neugeborenen ist oft die parenterale oder rektale Gabe von Arzneimitteln die einzig zuverlässige Darreichungsform. Zu den intravenös bzw. intramuskulär verabreichbaren Malariamedikamenten zählen u.a. **Chinin**, **Chloroquin** und **Artesunat**<sup>94</sup>. Es muss darauf geachtet werden, dass einige Medikamente, wie z.B. Tetrazykline, nicht an Kinder unter acht Jahren verabreicht werden sollten. In Gebieten mit Resistenzen gegen Chinin sollte deshalb eine Kombinationstherapie mit **Clindamycin** durchgeführt werden, da hierbei die gleichen Therapieeffekte wie mit Tetracyclin oder Doxycyclin erreicht werden können<sup>98</sup>. Mefloquin sollte nicht

bei Kindern unter drei Monaten bzw. unter fünf Kilogramm Körpergewicht zur Anwendung kommen<sup>1</sup>.

Zur **Chemoprophylaxe** sind Chloroquin plus Proguanil und Atovaquon plus Proguanil in entsprechender Dosierung unbedenklich. Weiterhin sollte bei Kleinkindern eine konsequente **Expositionsprophylaxe** mit Moskitonetzen durchgeführt werden<sup>1</sup>.

## 1.6. Immunantwort und Immunmechanismen

### 1.6.1. Mechanismen der Immunantwort

Die durch Malariaerreger im Wirt ausgelöste Immunantwort dient der Kontrolle und Elimination der parasitären Infektion, trägt zudem aber auch maßgeblich zur Pathologie der Erkrankung bei.

Die körpereigene Abwehr stützt sich auf **zelluläre** und **humorale** Mechanismen. Diese werden als **unspezifisch** bezeichnet, wenn sie zur Allgemeinabwehr verschiedenster Fremdstoffe dienen. Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten (Makrophagen) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) mit ihren unterschiedlichen Funktionen bilden die zelluläre Immunabwehr. Zu den humoralen Abwehrmechanismen rechnet man die eher unspezifisch wirkenden Antikörperklassen der IgE und IgA, das Komplementsystem, eine Vielzahl lysosomaler Enzyme, C-reaktives Protein, sowie unterschiedlichste Zytokingruppen. Die **spezifische Abwehr** dagegen erkennt selektiv Oberflächenstrukturen bestimmter Antigene und verfügt über ein immunologisches Gedächtnis. Ihr zellulärer Anteil wird durch unterschiedliche Arten von T- und B-Lymphozyten gebildet, während Immunglobuline und bestimmte Interleukine Teile der spezifisch-humoralen Abwehr darstellen.

Der Organismus setzt sich anhand dieser Mechanismen immunologisch mit eingedrungenen Fremdartigen auseinander. Das Immunsystem kann dann die als körperfremd erkannten Bestandteile inaktivieren bzw. eliminieren. Über das spezifisch-zelluläre Abwehrsystem ist der Organismus darüber hinaus in



der Lage, ein **immunologisches Gedächtnis** einzurichten, das dem Immunsystem bei erneutem Kontakt mit bekannten Antigenen erlaubt, stärker und rascher zu reagieren als beim Primärkontakt<sup>99</sup>. Als „immun“ bezeichnet man einen Organismus, dessen Immunsystem mit Fremdartigen ohne dem Auftreten pathologischer Reaktionen fertig werden kann. Solch ein **protektiver Immunstatus** kann sich nur durch ständige Auseinandersetzung mit Krankheitserregern entwickeln<sup>100,101</sup>.

#### 1.6.2. T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Immunantwort

T-Lymphozyten untergliedert man in drei T-Effektorzellgruppen, die sich durch Oberflächenrezeptoren (CD4 bzw. CD8) unterscheiden. T-Helferzellen gehören zur Gruppe der CD4-T-Zellen, während man T-Zytotoxische- und T-Suppressorzellen zu den CD8-T-Zellen rechnet.

**T-Helferzellen** (T<sub>H</sub>-Zellen) nehmen als Untergruppe der T-Effektorzellen an der zellvermittelten Immunität teil. Sie spielen eine Rolle bei der Spezifizierung von Immunantworten und bei der Auswahl von Effektormechanismen gegen die jeweiligen Zielantigene. T<sub>H</sub>-Zellen unterstützen Proliferation und Aktivierung von Phagozyten, B-Zellen, zytotoxischen und Suppressor-T-Zellen, sowie anderen Effektorzellen. Sie können auf diese Weise unterschiedlichste Entzündungsreaktionen hervorrufen (zellvermittelter Typ bzw. Reaktion vom verzögerten Typ)<sup>102</sup>.

Innerhalb der T<sub>H</sub>-Zell-Gruppen unterscheidet man verschiedene Unterordnungen, die sich hinsichtlich ihrer Zytokinmuster (Interleukine = IL, Tumornekrosefaktoren = TNF, Interferone = IFN), sowie nachfolgend ausgelösten Effektormechanismen differenzieren lassen. Gemeinsame Ausgangspopulation stellen die naiven T<sub>H</sub>P-Zellen dar. Sie produzieren ausschließlich IL-2. Kurzzeitige Stimulation führt zur Entwicklung von T<sub>H</sub>0-Zellen, die dann ein weites Spektrum an Zytokinen freisetzen können (IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , IL-2, -4, -5, -6, -9, -10, -13). Nach andauernder Stimulation entstehen weiter spezialisierte T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen. T<sub>H</sub>1-Zellen sezernieren hauptsächlich IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$  und IL-2, während T<sub>H</sub>2-Zellen vorwiegend IL-4 bis -6, -9, -10 und -13 produzieren<sup>103</sup>.

Die jeweiligen Zytokinmuster rufen unterschiedliche Effektormechanismen hervor (siehe Abb. 5 „Differenzierung der T<sub>H</sub>-Zelluntergruppen“). **T<sub>H</sub>1-Zellen** obliegt hauptsächlich die Aktivierung der zellulären Immunität (zytolytische T-Zellen, Makrophagen). Infizierte Makrophagen produzieren IL-12, welches die Entwicklung von T<sub>H</sub>1-Zellen fördert. Weiterhin trägt Sekretion von IL-2 und IFN- $\gamma$  durch stimulierte T<sub>H</sub>1-Zellen zur Aufrechterhaltung des T<sub>H</sub>1-Typs bei. Eine T<sub>H</sub>1-gewichtete Abwehrreaktion entspricht überwiegend einer **zellvermittelten Immunantwort** und ist charakteristisch für intrazelluläre, wie auch für Abstoßungsreaktionen. **T<sub>H</sub>2-Zellen** sind im Gegensatz dazu in erster Linie für die Aktivierung der humoralen Immunantwort verantwortlich. Sie erhöhen die Proliferation von Eosinophilen und Mastzellen und steigern in B-Zellen die Produktion opsonierender Antikörper, einschließlich IgE. Kontakt mit Allergenen, Helminthen und löslichen Proteine lösen die Bildung von IL-4 durch Mastzellen, Baso- und Eosinophile aus, und stimulieren bevorzugt die Entwicklung von T<sub>H</sub>2-Zellen. Die T<sub>H</sub>2-gewichtete Abwehrreaktion entspricht der **antikörpervermittelten Immunantwort** und ist charakteristisch für parasitäre Infektionen, sowie allergische Reaktionen<sup>104,105</sup>.

Weiterhin wirken **Regulatorische T-Zellen** auf die jeweilige T<sub>H</sub>-Antwort regulierend oder supprimierend ein. Sie werden vor allem durch IL-10 stimuliert und modulieren über IL-10 und TNF- $\beta$  die Entzündungsreaktion<sup>106</sup>.

Die Ausbildung des T<sub>H</sub>1- bzw. T<sub>H</sub>2-Immuntyps ist somit kein unabhängiger Prozess, vielmehr kontrollieren sich beide Aktivierungswege wechselseitig über die spezifische Sekretion von Zytokinen. Nach Induktion eines Antworttyps kann dennoch ein Immunmechanismus den anderen unterdrücken. So hemmt **IFN- $\gamma$**  die T<sub>H</sub>2-, **IL-4** dagegen die T<sub>H</sub>1-Zellentwicklung. In der Effektorphase unterstützt **TNF- $\alpha$**  die Makrophagenaktivierung durch IFN- $\gamma$  im Sinne des T<sub>H</sub>1-Typs, während das von B-Zellen und einigen Makrophagen produzierte **IL-10** die Makrophagenfunktion hemmt. IFN- $\gamma$  supprimiert dagegen die Bildung verschiedener Antikörperklassen, die sonst von Zytokinen des T<sub>H</sub>2-Typs stimuliert werden<sup>107</sup>.

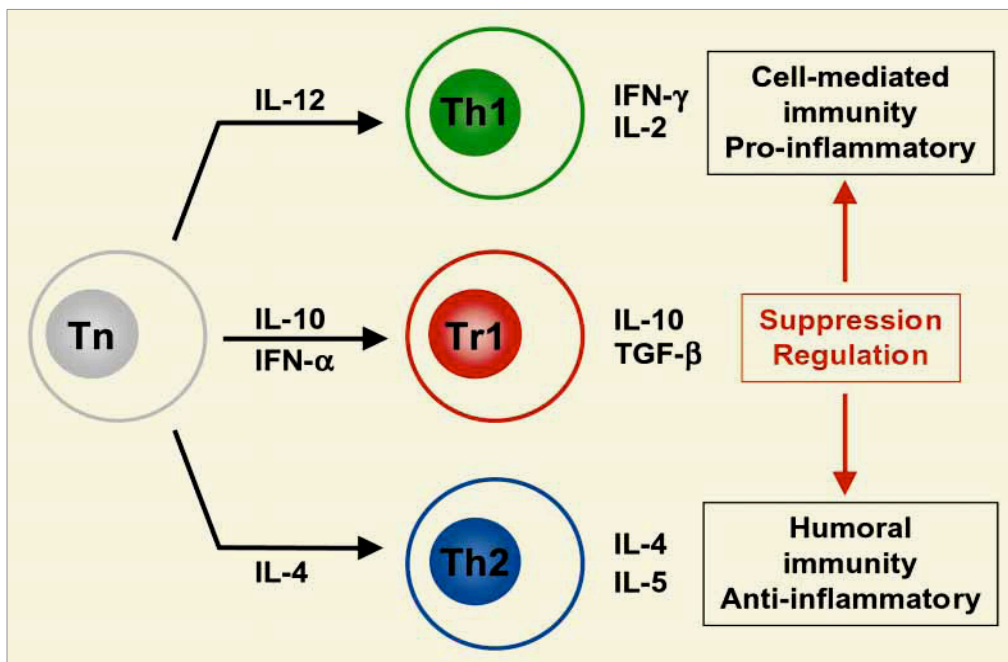


Abb. 5:

Differenzierung der T<sub>H</sub>-Zelluntergruppen (Tn = naive Helferzelle, Th1/2 = differenzierte Helferzelle, Tr1 = regulatorische Helferzelle).<sup>106</sup>

### 1.6.3. Zytokine

Zytokine sind Proteine bzw. Peptide, die für die Signalübermittlung zwischen verschiedenen Zellgruppen im Verlauf einer Immunantwort verantwortlich sind. Sie gewährleisten den regulären Ablauf der Immunreaktion und werden erst während des Immunprozesses von Leukozyten gebildet. Dadurch erfolgt ihre Sekretion nur innerhalb eines kurzen Zeitraums. Die Zytokinwirkung wird an Zielzellen über Rezeptoren vermittelt und kann autokrin, parakrin oder endokrin auf unterschiedlichste Zellgruppen einwirken. Der induzierte Effekt ist somit abhängig von der Art der Zielzelle. Man unterscheidet verschiedene Zytokinklassen, deren Funktionen mehr oder weniger spezifisch sein können (siehe Abb. 6 „Funktion der Zytokine bei normaler Immunität“).

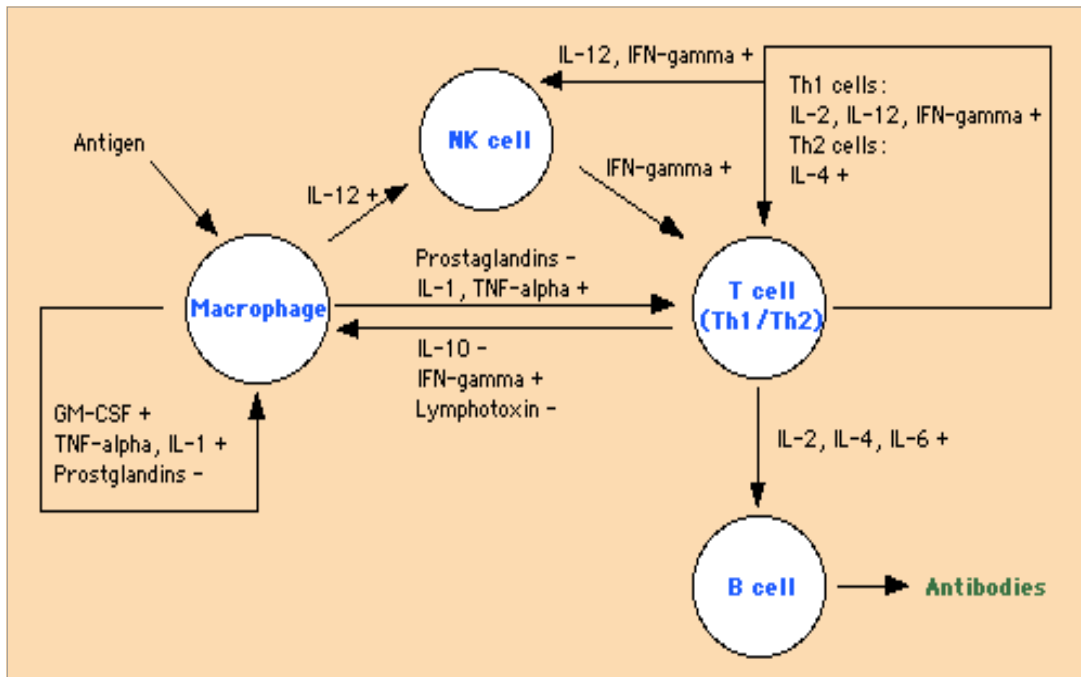


Abb. 6:

Funktion der Zytokine bei normaler Immunität.<sup>108</sup>

- Die **Tumor-Nekrose-Faktoren** (TNF)- $\alpha$  und - $\beta$  dienen vor allem als Mediatoren **proinflammatorischer** Reaktionen und werden hauptsächlich von T-Lymphozyten und Makrophagen gebildet. Sie steigern die Aktivität anderer phagozytierender Zellen und begünstigen das Einwandern von Entzündungszellen ins Gewebe. Sie sind über verschiedene andere Zytokine an Akut-Phase-Reaktionen beteiligt und können pyrogene Effekte auslösen. Langanhaltende TNF-Erhöhung im Körper führt zu Kachexie.
- **Colony-Stimulating-Factors** (CSF) fördern die Proliferation und Reifung myeloider und lymphoider **Vorläuferzellen**.
- Die **Typ-I-Interferone** IFN- $\alpha$  und - $\beta$  spielen eine wichtige Rolle bei Infektionen von Zellen durch **Viren**. Über Hemmung viraler Replikationsmechanismen und Steigerung lytischer Aktivität der NK-T-Zellen (als weitere Subklasse der T-Lymphozyten) schränken sie die Virusvermehrung und -ausbreitung ein.

- Das **Typ-II-Interferon** IFN- $\gamma$  wird von aktivierten T<sub>H</sub>1-Zellen und Zytolytischen-T-Lymphozyten produziert und wirkt sowohl **antiviral** auf intrazelluläre Erreger, als auch **antiproliferativ** auf Tumorzellen. Es stellt den wichtigsten Aktivator der Makrophagen dar und erhöht die zytolytische Aktivität der NK-Zellen. Außerdem fördert IFN- $\gamma$  die Ausbildung des **T<sub>H</sub>1-Typ** durch Anregung der T<sub>H</sub>1-Zell-differenzierung und hemmt so gleichzeitig das Entstehen einer T<sub>H</sub>2-Antwort<sup>109, 107</sup>.

Zur Gruppe der **Interleukine** (IL) gehört eine Vielzahl Zytokine, die hauptsächlich von mononukleären Zellen gebildet werden<sup>110</sup>. Besondere Bedeutung für den weiteren Verlauf haben folgende Interleukine:

- **IL-2** stammt vorwiegend von T<sub>H</sub>-Zellen und beeinflusst die Intensität der **T<sub>H</sub>1-Immunantwort** durch Synthesesteigerung anderer T<sub>H</sub>1-Zytokine, wie z.B. IFN- $\gamma$ . Es leitet somit **proinflammatorische** Effekte ein. Und stimuliert zusätzlich IL-2 NK- und B-Zellen.
- **IL-4** ist ein wesentlicher Mediator **antiinflammatorischer** Effekte, indem es die Differenzierung von T<sub>H</sub>-Zellen zum **T<sub>H</sub>2-Typ** stimuliert. Es wird vor allem von Baso- und Eosinophilen, sowie NK-Zellen gebildet. IL-4 reguliert das Entstehen allergischer Reaktionen durch Auslösung der IgE-Bildung in B-Lymphozyten.
- **IL-10** hat ebenfalls **antiinflammatorische** Wirkung und wird vorwiegend von T<sub>H</sub>2- und B-Zellen gebildet. IL-10 kann über Hemmung der T-Suppressorzellen die Zytokinproduktion in T<sub>H</sub>1-Zellen unterdrücken, wodurch die Konzentration von IFN- $\gamma$  indirekt gesenkt wird. Niedrige IFN- $\gamma$  -Spiegel hemmen ihrerseits wieder die Ausbildung des T<sub>H</sub>1-Typs zugunsten des **T<sub>H</sub>2-Typs** .
- **IL-12** dagegen weist durch IFN- $\gamma$ -abhängige Stimulation von T-Helfer-, T-Zytotoxische- und NK-Zellen **proinflammatorische** Effekte auf und ist an der Abwehrreaktion gegen intrazelluläre Erreger beteiligt. Es wird vorwiegend von Monozyten und Makrophagen gebildet und löst eine **T<sub>H</sub>1-Antwort** aus<sup>111</sup>. IL-12 ist ein Heterodimer, das sich aus den zwei Homodimeren IL-12p40 und IL-12p35 zusammensetzt<sup>112, 107</sup>

#### 1.6.4. Immunologische Vorgänge während der Schwangerschaft

Um den Fötus vor einer Abstoßungsreaktionen zu schützen und um die Schwangerschaft aufrechtzuerhalten, muss der mütterliche Organismus immunologische Toleranz gegenüber fötalem Gewebe entwickeln. Dazu finden im Rahmen der allgemeinen Umstellungsvorgänge zu Beginn einer Schwangerschaft neben anatomischen auch immunologische Anpassungen statt. Während im mütterlichen Organismus unspezifische Abwehrmechanismen unbeeinflusst bleiben, bildet sich im Uterus innerhalb der erworbenen Immunabwehr vorübergehend ein „**immunologisch privilegierten Status**“ aus<sup>113</sup>.

Teil der immunologischen Anpassung des Uterus an den Embryo sind Veränderungen im relativen Auftreten verschiedener Leukozytensubpopulationen. T- und B-Lymphozyten werden seltener, dafür wächst der Anteil an Makrophagen und NK-Zellen im Bereich der ein-wachsenden fötalen Trophoblastenzotten an<sup>114</sup>. Diese unspezifischen und teilweise in ihrer ursprünglichen Aggressivität gedämpften Immunzellen<sup>115</sup> übernehmen während der Schwangerschaft Abwehrfunktionen im Uterusgewebe und steuern dadurch zusätzlich zur Entwicklung und Reifung der Plazenta bei<sup>116</sup>. Zunehmende zellvermittelte Abwehrmechanismen, hervorgerufen durch Freisetzung von IFN- $\gamma$  über IL-2- und IL-12-Anstiege führen zu verstärkter Abortneigung. Deshalb tragen Zytotrophoblastzellen der Plazenta zusätzlich aktiv zur Produktion von IL-10 bei, um die Ausbildung eines T<sub>H</sub>1-Status durch Suppression des IFN- $\gamma$  und IL-12 direkt zu verhindern<sup>117,118</sup>. Außerdem steuert das in der Plazenta gebildete schwangerschaftserhaltende Hormon *Progesteron*, sowie die Mediators substanz *Prostaglandin-E2* dem Entstehen eines **T<sub>H</sub>2-gewichteten Immunstatus** durch Hemmung der IFN- $\gamma$ -Bildung zusätzlich bei. Das plazentare Milieu ist deshalb überwiegend von T<sub>H</sub>2-Zellen und deren spezifischem Zytokinmuster geprägt. IL-4 und IL-10 sind die vorherrschenden Zytokine der feto-maternalen Übergangszone<sup>119</sup>. Toleranz gegenüber dem heranwachsenden Fötus ist aber nicht nur durch immunologische Naivität neonataler Zellen bedingt, vielmehr spielen aktive Suppressionsmechanismen verschiedenster

Immunreaktionen, sowie die Aufrechterhaltung des T<sub>H</sub>2-Typs durch den mütterlichen Organismus selbst im Fortbestehen der Schwangerschaft eine tragende Rolle<sup>120</sup>.

#### 1.6.5. Immunsystem des Neugeborenen

Etwa in der vierten Schwangerschaftswoche (SSW) beginnt sich das Immunsystem des Fötus zu entwickeln. Zu diesem Zeitpunkt bilden sich auch lymphoide Organe, wie Thymus und Lymphknoten, aus. Gegen Ende des ersten Trimenons (10.-12. SSW) sind **fötale B-Lymphozyten** bereits in der Lage eigene IgM- und IgG-Antikörper zu bilden. Quantität und Qualität dieser Antikörper, sowie deren Lebensdauer, sind jedoch noch stark eingeschränkt, da neonatale B-Zellpopulationen eine Zusammensetzung und Funktionsreife aufweisen als B-Zellpopulationen des erwachsenen Organismus<sup>121</sup>. Das humorale Immunsystem der Neonatalperiode kann nur begrenzt Antigene erkennen, deshalb ist das Neugeborene während den ersten Lebensmonaten zusätzlich noch passiv über mütterliche Serumantikörper (IgG) geschützt (**Nestschutz**). Die für Erwachsene typischen Antikörperspiegel werden im Laufe der ersten vier bis sechs Lebensjahre erreicht.

Ähnlich veränderte Zusammensetzungen der Zellpopulationen lässt sich auch bei **fötalen T-Lymphozyten** finden. Hier überwiegt während der Fötalzeit bis etwa zum Ende des ersten Lebensjahres der Anteil neonataler T-Suppressorzellen und dadurch ein immunsupprimierender Effekt. Zusätzlich wird eine effiziente Immunantwort durch suboptimal funktionierende Interaktionen zwischen antigen-präsentierenden Zellen und antigenerkennenden T-Zellen des fötalen Immunsystems verhindert<sup>121</sup>.

Neonatale T-Lymphozyten produzieren beträchtlich niedrigere Spiegel an **Zytokinen**. Vor allem die zur Auslösung einer Entzündungsreaktion wichtigen Zytokine IL-2, IL-4 und IFN- $\gamma$  sind nur in sehr geringen Mengen nachweisbar. Dies führt zur verzögerten Reifung und unvollständigen Aktivierung neonataler Makrophagen, NK-Zellen und T-Helfer- bzw. T-Suppressorzellen, die eine

wichtige Rolle in der Stimulation von B-Zellen, sowie im Aufbau einer spezifischen Immunantwort spielen<sup>122</sup>.

Neugeborene sind dennoch zur Ausbildung einer T<sub>H</sub>1- bzw. T<sub>H</sub>2-Antwort fähig. Allerdings zeigen sie häufig eine **T<sub>H</sub>2-Verschiebung** auf Reize, die in Erwachsenen eine eindeutige T<sub>H</sub>1-Reaktionen auslösen. Dies lässt sich auf die Unfähigkeit zur Aktivierung naiver T-Zellen, also auch zur Ausbildung T<sub>H</sub>1-abhängiger Gedächtniszellen, zurückführen (Toleranzphänomen des Neugeborenen)<sup>123</sup>. Zusätzlich tritt ein eindeutiges Überwiegen der Produktion und Stimulation von IL-4 und IL-10 auf. Die erhöhte IL-4-Bildung neonataler T-Lymphozyten während der Fötalzeit hemmt direkt die IL-2-Produktion. Dadurch wird das Entstehen einer T<sub>H</sub>1-Immunantwort zugunsten des T<sub>H</sub>2-Typs unterdrückt. Auch Antigene, die zuvor zu T<sub>H</sub>1-Reaktionen führten, zeigen daraufhin eine auf das T<sub>H</sub>2-Profil beschränkte Sekundärantwort<sup>124</sup>. Erst während der Postnatalphase kommt es zum Anstieg der IL-2- und IFN- $\gamma$ -Produktion, wodurch der kindliche Organismus zunehmend die Fähigkeit erlangt, auf bestimmte Antigene eine T<sub>H</sub>1-Antwort auszubilden<sup>125</sup>. Die Präferenz des T<sub>H</sub>2-Immuntyps steht jedoch nicht gänzlich unter dem Einfluss des T<sub>H</sub>2-gewichteten Status der mütterlichen Plazenta<sup>126</sup>. Vielmehr kann das Immunsystem des Neugeborenen sogar starke Anstiege der IFN- $\gamma$ -Konzentration aufweisen, wenn perinatal z.B. intrauterine Infekte oder vorzeitiger Blasensprung auftreten<sup>127,128</sup>.

Neugeborene besitzen somit einen unvollständigen Immunschutz. Diese **relative Immunschwäche** scheint ihren Ursprung vorwiegend in der Unreife neonataler Immunzellen zu haben. Obwohl die Grunderfordernisse zur Auslösung einer spezifischen Immunantwort bei Geburt prinzipiell bereits vorhanden sind, setzt die morphologische und funktionelle Reifung des Immunsystems dennoch erst postnatal unter dem Einfluss exogenem, antigenetischem Materials ein. Die eingeschränkte Fähigkeit des neonatalen Abwehrsystems zur IL-12-Produktion bzw. IFN- $\gamma$ -Freisetzung hängt stark mit den schweren durch intrazelluläre Erreger hervorgerufenen Infektionsverläufen (z.B. RSV, Masern, Influenza, Pertussis) während der ersten Lebenswochen zusammen<sup>121</sup>.



## 1.7. Immunologische Vorgänge bei Plasmodieninfektion

Der Malariaparasit präsentiert sich dem menschlichen Immunsystem in zwei unterschiedlichen Formen: als **extrazellulärer Erreger** (Sporozoitens- und Merozoitenstadium) und als **intrazellulärer Erreger** (Hepatozyten- und Erythrozytenstadium). Deshalb werden bei einer Plasmodieninfektion sämtliche Komponenten der Immunabwehr stimuliert (Makrophagen, NK-Zellen, T-Helfer- und T-Suppressorzellen, sowie B-Zellen einschließlich Antikörperproduktion). Dennoch zeigt der Parasit oft schlechte Immunogenität, hervorgerufen durch eine Anzahl von Protektionsmechanismen, wie z.B. Antigenvariationen, Polymorphismen der Molekülstruktur oder Veränderungen der Oberflächenstruktur<sup>129</sup>.

Während der **präerythrozytären Phase** des Entwicklungszyklus (extrazelluläre Sporozoitens- und intrazelluläre Leberstadien) und im geschlechtlichen Stadium (Gametozyten) sind die Erreger nur sehr schwach immunogen<sup>130</sup>. So werden hauptsächlich die verschiedenen T-Zellpopulationen (**CD4- und CD8-Zellen**) und die Zellen der angeborenen Immunität (**NK-Zellen** und **Makrophagen**) aktiviert, die dann die Produktion spezifischer Antikörper (vorwiegend IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>3</sub>) gegen Plasmodienoberflächenantigene auslösen. Diese erregerspezifischen **IgG-Antikörper** werden aber selbst bei immunen Individuen nicht immer in einer für die Infektionskontrolle ausreichenden Masse gebildet.<sup>131</sup> Der menschliche Organismus ist deshalb nicht vollständig dazu fähig, eine infektionshemmende Abwehr aufzubauen. Dies kann bei Nicht-immunen sogar eine generalisierte Immunsuppression mit schwerem Krankheitsverlauf auslösen<sup>132</sup>. Protektiver Immunschutz, z.B. bei Individuen aus Endemiegebieten, erfolgt in diesem Stadium vorwiegend durch CD8-T-Zellen, die bereits während vorausgegangener Infektionen sensitiviert wurden. Reaktivierte CD8-T-Zellen leiten über ein Anwachsen der IFN- $\gamma$ - und IL-12-Produktion die zellvermittelte Abwehr (T<sub>H</sub>1) ein<sup>133</sup>. Eine zytokinvermittelte Stimulation verschiedener T<sub>H</sub>-Populationen erfolgt dann durch Antigenkontakt aktivierter **Dendritischer Zellen** (Antigenpräsentation) und deren dominantes proinflammatorisches Zytokinprofil<sup>134</sup>.

In der **intraerythrozytären Phase** dagegen spielt die Vermittlung spezifischer Abwehrreaktionen durch T-Helferzellen eine weitaus größere Rolle. T-Helferzellen sind in der Lage eine malariaspezifische adaptive Immunantwort durch  $T_H1$ - bzw.  $T_H2$ -Zelldifferenzierung zu aktivieren.

- Die proinflammatorische  **$T_H1$ -Antwort** dominiert während der frühen **Akutphase** der Infektion und wird durch  $IFN-\gamma$  und  $TNF-\alpha$  vermittelt.  $TNF-\alpha$  ist ursächlich für die Fiebersymptomatik, während  $IFN-\gamma$  neben der Aktivierung von Makrophagen und dem Anstieg parasiteneliminierenden Stickstoffmonoxids (NO) auch die Produktion spezifischer Antikörper in B-Zellen und damit die **Abtötung** der intrazellulären Erreger einleitet. Die gegen die asexuellen Erythrozytenstadien gerichteten Antikörper scheinen zudem **protektiven Immunschutz** gegen erneute Reinfektionen darzustellen<sup>4,135</sup>.
- Bei immunen Individuen kann eine Malaria im weiteren Krankheitsverlauf zu einem chronischen Stadium führen. Bei diesen **chronischen Formen**, sowie bei milden Krankheitsverläufen, steht allerdings die  **$T_H2$ -gewichtete Immunreaktion** mit Erhöhung der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-4 im Vordergrund<sup>136</sup>. Das Antikörperprofil einer  $T_H2$ -Antwort liefert neben einem **Reinfektionsschutz** auch eine bessere **Kontrolle der Parasitämie**. Die Umkehr des  $IFN-\gamma$ -gesteuerten  $T_H1$ -Typs zum IL-10-geprägten  $T_H2$ -Typ tritt in Endemiegebieten bereits bei Kindern nach nur wenigen Reinfektionen mit *P. falciparum* auf. Kinder, deren Immunsystem diesen Wechsel nicht vollzieht, erkranken häufig schwerer und weisen höhere Parasitämien im Blut auf<sup>137</sup>.

Insgesamt lässt sich die durch natürliche Malariainfektionen erworbene Immunität als typische **antiparasitäre Infektabwehr** interpretieren. Der Wirtsorganismus entwickelt eine kontrollierte Toleranz gegenüber dem Erreger, d.h. die Infektion wird beherrscht, ohne dass eine vollständige Erregerelimination stattfindet bzw. ohne den Aufbau eines langandauernden Immunschutzes zu gewährleisten<sup>138</sup>. Dies erklärt das Auftreten asymptomatischer Reinfektionen mit zwar geringgradiger Parasitämie, aber der Ausbildung infektiöser Gametozyten, sowie verringerte Komplikations- bzw. Mortalitätsraten bei immunen Individuen hyperendemischer Gebiete<sup>139</sup>. Ursächlich hierfür scheint die unter-

schiedliche Immunogenität der Plasmodienantigene zu sein. Stark immunogene Proteine weisen zwar eine stabile strukturelle Variationsbreite auf und führen bei Reinfektion durch die Gedächtnisfunktion des Immunsystems zu einer raschen Immunreaktion im Wirtsorganismus. Diese Abwehrreaktion kann eine Parasitenvermehrung jedoch nur einschränken, nicht aber eliminieren, dennoch schützt sie den Wirt gleichzeitig vor schweren und komplizierten Krankheitsverläufen<sup>140</sup>.

#### 1.7.1. Immunologische Vorgänge bei plazentarer Plasmodieninfektion

Aufgrund des  $T_H2$ -gewichteten Immunstatus am feto-maternalen Übergangsbereich wird angenommen, dass Schwangere in geringerem Masse gegenüber plazentaren Infektionen geschützt sind. Bei einer Malariainfektion während der Schwangerschaft erhöht das **antiinflammatorische Milieu** die Anfälligkeit des plazentaren Gewebes gegenüber intrazellulären Parasiten, weil Mechanismen der zellulären Abwehr (IL-2- und besonders IFN- $\gamma$ -Produktion mit Aktivierung von T-Helferzellen) zum Schutze des Fötus unterdrückt sind<sup>141</sup>. Die Plazenta bietet deshalb aufgrund ihres besonderen Immunstatus optimale Lebensbedingungen für die intraerythrozytären Plasmodienstadien<sup>142</sup>. Vor allem Schwangere in Endemiegebieten weisen in den Plazentagefäßen eine oft weit aus höhere **Parasitendichte** als im peripheren Blut auf. Dieses Phänomen macht die Diagnosestellung schwerer Infektionen bei Schwangeren deshalb oft problematisch.

Eine **akute Plasmodieninfektion** während der Schwangerschaft löst im mütterlichen Organismus außerhalb des Uterus zellvermittelte Immunreaktionen des  $T_H1$ -Typs aus. In der Plazenta dagegen lässt sich in begrenztem Masse eine **proinflammatorische Immunreaktion** (Anstieg der TNF- $\alpha$ -, IFN- $\gamma$ - und IL-2-Spiegel) nachweisen<sup>79,143</sup>. Entzündungszellen (Makrophagen, Monozyten und CD8-T-Zellen) sowie B-Zellen wandern verstärkt in den mütterlichen Teil des intervillösen Raums ein. Allerdings findet in diesem Bereich keine Infiltration der mütterlichen Dezidua durch uterine NK-Zellen statt, um eine Abstoßung des Fötus zu vermeiden<sup>144</sup>. Diese Vorsichtsmaßnahme unterdrückt aber gleich-

zeitig auch die Elimination intravillös auftretender Plasmodien. Eine massive  $T_H1$ -gewichtete Entzündungsreaktion des feto-maternalen Grenzbereichs entwickelt sich besonders bei Erstgebärenden (Primigravidae). Bei diesen Müttern wirkt sich zudem der veränderte Hormonhaushalt (Kortison und Prolaktin) dämpfend auf die Zytotoxizität der NK-Zellen aus<sup>145</sup>. Dies hat aber oft negative Auswirkungen auf die optimale Versorgung des heranwachsenden Fötus. Primigravidität zählt deshalb zu den ursächlichen Mitfaktoren eines gesteigerten Risikos für die Unterentwicklung der Kinder malariainfizierter Schwangerer<sup>143</sup>. Mehrgebärende Mütter (Multigravidae) endemischer Gebiete hingegen weisen im Verlauf nachfolgender Schwangerschaften Adaptionsvorgänge auf, die die Zytokinmuster in der Plazenta zunehmend aus-gleichen können. Zu den die Plazenta vor Parasitämie schützenden hohen IFN- $\gamma$ -Spiegeln treten dann parallel gesteigerte IL-10-Konzentrationen zum Schutze der Schwangerschaftserhaltung und der fötalen Versorgung hinzu<sup>146</sup>.

Ausgelöst durch Entzündungsreaktionen, werden in der Plazenta **Antiadhäsionsantikörper** gebildet, die das Anheften infizierter Erythrozyten an CSA blockieren<sup>79</sup>. Abhängig von Schwangerschaftsstatus und Gestationsalter können die jeweiligen Konzentrationen dieser Antikörper sehr unterschiedlich ausfallen. Obwohl die meisten Mütter am Geburtstermin ähnlich hohe Antikörperspiegel aufweisen, zeigt die Mehrzahl der Erstgebärenden bis etwa zur 20. SSW keine oder nur sehr geringe Konzentrationen. Mehrgebärenden dagegen weisen erniedrigte Spiegel nur bis etwa zur 12. SSW auf, später sind bereits starke Anstiege messbar<sup>147</sup>. Nach Beendigung der Schwangerschaft nehmen diese Antikörperspiegel allmählich wieder ab<sup>148</sup>.

Ursächlich für erhöhte Parasitendichte plazentaren Gewebes scheint zudem die Herausbildung besonderer **Parasitensubpopulationen** im Verlauf der Schwangerschaft zu sein. Ihr Anheftungsprofil prädisponiert diese Parasiten zur Adhäsion an CSA-Moleküle der Plazenta<sup>79</sup>. Da dieser CSA-bindende Parasitentyp allerdings nur im schwangeren Wirtsorganismus auftritt, Primigravide somit bis zur Erstschwangerschaft keinen Kontakt mit dieser immunologisch noch unbekanntem Erregersubpopulation hatten, ist ihre Antiadhäsionsantikörperbildung deshalb noch stark vermindert. Aufgrund der geringen Expositions-

häufigkeit des mütterlichen Immunsystems zu dem nur während der Schwangerschaft auftretenden Erregerphänotyp ist die plazentare Abwehrfunktion bei Primigraviden (Primärantwort) und Multigraviden (Sekundärantwort) deshalb unterschiedlich stark entwickelt. Primigravide Frauen neigen zu häufigeren Infektionen und massiverer Parasitämie der Plazenta – dem Hauptfaktor schlechter Prognosen hinsichtlich der Reifeentwicklung des Neugeborenen<sup>41,43</sup>.

#### 1.7.2. Immunologische Vorgänge des Neugeborenen bei Plasmodieninfektion

Massive Parasitämie wird bei Kleinkindern hochendemischer Gebiete während der ersten drei bis sechs Lebensmonate nur selten beobachtet. Ebenso sind diese Kinder innerhalb des ersten Lebensjahres nur in selten anfällig für komplizierte Malaria-Episoden<sup>149</sup>. Das Auftreten massiver Parasitämien bei plasmodieninfizierten Kindern wird dann nach Ende des ersten Lebensjahres verstärkter beobachtet<sup>48</sup>. Ursächlich für diesen **temporären Infektionsschutz** ist einerseits der relativ hohe Anteil fötalen Hämoglobins Neugeborener (kann von Plasmodien nicht verstoffwechselt werden), sowie bei gestillten Kindern der physiologische Mangel an para-Aminobenzoesäure (essentiell für Folsäurestoffwechsel in Plasmodien). Außerdem scheinen Maßnahmen der Exposition prophylaxe gegenüber Moskitos bei Kleinkindern besser durchführbar zu sein<sup>150,151</sup>.

Zum anderen ist die Tatsache, dass Neugeborene, deren Mütter Immunität gegen *P. falciparum* aufweisen, in den ersten fünf Monaten nur asymptomatische bzw. subklinische Infektionen (keine Malariasymptomatik mit äußerst geringer Parasitämie) kurzer Dauer präsentieren, von den in diesem Zeitraum noch vorhandenen mütterlichen Antikörper abhängig<sup>152</sup>. Hohe Spiegel transplazentar übertragener **maternaler Antikörper** nehmen allerdings ab der 16.–18. Lebenswoche zunehmend ab<sup>153</sup>. Es handelt sich bei diesen *in utero* erworbenen Immunglobulinen um plazentagängige IgG – vor allem aus den Subklassen IgG1 und IgG3<sup>154</sup>.

Des Weiteren können im Nabelschnurblut auch plasmodienspezifische Antikörper der nicht plazentagängigen Immunglobulinklassen IgM und IgE

nachgewiesen werden. Es führt also bereits *in utero* eine **Stimulation des fötalen Immunsystems** durch transplazentar übertragene Plasmodienantigene statt. Dieser Antigenkontakt führt begrenzt zum Aufbau einer humoralen Immunantwort mit spezifischer Antikörperbildung im fötalen System<sup>154</sup>. Ausreifung des Immunsystems des Neugeborenen und damit Ausbildung einer eigenen suffizienten IgG-Immunantwort findet etwa ab dem sechsten Lebensmonat statt. Somit ist die Effektivität der Abwehr einer Plasmodieninfektion nicht nur von prä- bzw. postnataler Infektionsrate, sondern zunehmend auch von der Reife des Immunsystems und dem Abklingen natürlicher und passiver Immunmechanismen abhängig<sup>155</sup>.

Das zelluläre Immunsystem Neugeborener weist bei Plasmodieninfektionen trotz anfänglicher Unreife dennoch deutliche lymphoproliferative Anstiege der T-Zellen und der IL-2-Sekretion auf. Die vollständige Ausbildung einer effektiv gegen intrazelluläre Parasiten gerichteten T<sub>H</sub>1-Antwort bleibt jedoch aus, da neonatale Zellen nicht zur Bildung adäquater IFN- $\gamma$ -Konzentrationen fähig sind<sup>156</sup>. Die T<sub>H</sub>2-Verschiebung der Abwehrreaktion hängt mit dem physiologischen T<sub>H</sub>2-Umfeld fötaler Immunzellen *in utero* zusammen. Die zur Ausbildung eines gegen Plasmodien gerichteten Immunschutzes notwendige Dominanz der T<sub>H</sub>1-Zellen wird in den ersten Lebensmonaten durch das fötal geprägte **Ungleichgewicht des Immunsystems** eingeschränkt<sup>157</sup>.

Kontakt zwischen fötalem Immunsystem und Plasmodienantigenen gegen Ende der Schwangerschaft während einer Malariainfektion der Mutter führt beim Fötus zum Anstieg IL-10-produzierender T-Zellen. Diese antigenspezifischen Zellen persistieren noch nach der Geburt und werden bei Neuinfektion sofort wieder reaktiviert. Die erneut IL-10-geprägte Immunreaktion und die Funktionshemmung antigen-präsentierender Zellen – und damit die Unterdrückung einer T<sub>H</sub>1-Antwort – spiegelt sich in der **erhöhten Malariaanfälligkeit** Neugeborener wieder, deren Mütter eine plazentare Plasmodieninfektion am Ende der Schwangerschaft aufwiesen<sup>158</sup>.

## 1.8. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss plazentarer *P. falciparum*-Infektionen primigravider Mütter auf das sich entwickelnde Immunsystem Neugeborener zu untersuchen. Die Auswirkungen des Kontaktes zwischen des sich entwickelnden Immunsystems heranwachsender Föten und *P. falciparum*-spezifischen Antigenen des plazentaren Umfelds auf die postnatale Immunität dieser Neugeborenen wurden hierbei anhand immunologischer Parameter als Untersuchungsziel gewählt.

Zusammenhänge zwischen pränataler antigenspezifischer Stimulation des fötalen Immunsystems *in utero* und der daraufhin bei Geburt veränderten Immunantwort solcher vorgeprägten Lymphozyten im Vergleich zu Kontrollen sollen hier dargestellt werden. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt dabei ausschließlich auf immunologischen Ausprägungen bei Kindern primigravider Mütter, um eventuell durch vorherige Schwangerschaften ausgebildete Protektionsmechanismen der Mutter weitgehend ausschließen zu können.

Die folgenden Auswertungen bedienen sich dem Vergleich unterschiedlicher Zytokinmuster anhand von Messungen gebildeter Konzentrationen von IL-10, IL-12 und IFN- $\gamma$  nach Stimulation mononukleärer Nabelschnurblutzellen. Die ermittelten Zytokinprofile der vorher isolierten Nabelschnurlymphozyten wurden statistischen Vergleichen unterzogen. Für die Durchführung der Vergleiche wurden die Neugeborenen in Gruppen eingeteilt, die sich gemäß dem Vorhandensein plazentarer Plasmodieninfektionen während der Schwangerschaft voneinander unterscheiden.

## 2. Patienten und Methoden

### 2.1. Studienort

Die Datenerhebung für diese Arbeit wurde im Forschungslabor des *Hôpital Albert Schweitzer* in Lambaréné, Gabun von 2001 bis 2002 durchgeführt.

**Gabun** liegt an der Westküste Zentralafrikas, benachbart zu Kamerun und Äquatorialguinea im Norden und zur Republik Kongo im Süden und Osten. (siehe Abb. 7 „Übersichtskarte Gabun“).



Abb. 7: Übersichtskarte Gabun <sup>98</sup>.



Gabun hat ungefähr 1,3 Millionen Einwohner und die Bevölkerungsdichte ist mit Ausnahme weniger urbaner Zentren insgesamt niedrig. Die durchschnittliche Lebenserwartung bei Geburt beträgt rund 59 Jahre (rund 61 Jahre Frauen) und die Säuglingssterblichkeit liegt bei 56 pro 1000 Lebendgeburten. Etwa 86% aller Schwangeren in Gabun nehmen schwangerschaftsvorsorgliche Maßnahmen in Anspruch, etwa 79% der Geburten finden in Gesundheitseinrichtungen unter Aufsicht ausgebildeter Geburtshelfer statt<sup>159-161</sup>.

Das Klima ist tropisch feucht mit abnehmender Niederschlagsintensität von der Küstenregion in Richtung Landesinnere, wobei allerdings das Gesamtjahresmittel von 1500 mm nicht unterschritten wird. Die relative Luftfeuchtigkeit liegt bei 70-90 %, die Temperatur im Jahresmittel bei 27 °C. Die landestypische Vegetation besteht aus Regenwald und einigen Savannengebieten, wovon einige Teile in landwirtschaftliche Nutzflächen und Siedlungsgebiete umgewandelt sind<sup>6</sup>.

Pro Jahr treten in Gabun ca. 60.000-80.000 Malariafälle innerhalb der Bevölkerung auf. In den nördlichen Landesteilen erfolgt die Malariatransmission das gesamte Jahr hindurch, während sie sich in den südlicheren Landesteilen auf die Monate von Oktober bis August beschränkt. In Gabun sind ca. 21 *Anopheles*arten endemisch, von denen zehn eindeutig als Plasmodienvektoren identifiziert sind. Der am häufigsten auftretende Malariaerreger ist *P. falciparum*<sup>159</sup>.

**Lambaréné**, die regionale Hauptstadt der Provinz Moyen-Ogooué und mit ca. 30.000 Einwohnern Gabuns drittgrößte Stadt, befindet sich landeinwärts am Ogooué gelegen, etwa 180 km südöstlich der Landeshauptstadt Libreville. Lambaréné und die von Regenwald geprägte Umgebung befinden sich in hyperendemischem Gebiet für das Auftreten von Malariaerkrankungen mit ganzjähriger Übertragung. Etwa 90% der hier auftretenden Malariafälle werden durch *P. falciparum*, die restlichen durch *P. ovale* und *P. malariae* verursacht. Die Transmission unterliegt regionalen und saisonalen Schwankungen, mit höchsten Raten während der Regenzeit von Oktober bis Dezember. Die Inokulationsrate beträgt etwa 20-60 infektiöse Stiche pro Jahr<sup>162,163</sup>.

Das **Hôpital Albert Schweitzer**, wenige Kilometer außerhalb Lambaréné gelegen, umfasst neben dem humanparasitologischen Forschungslabor noch Abteilungen für Innere Medizin, Chirurgie, Pädiatrie, Gynäkologie, Psychiatrie und Zahnheilkunde. Insgesamt stellen die Kliniken etwa 300 Patientenbetten zur Verfügung. Neben dem Hospital umfasst das Klinikgelände noch Wohnungen und Einrichtungen für Angestellte, sowie deren Angehörige. Das Hospital wird von Patienten der näheren Umgebung wie auch von Kranken aus entfernten und abgelegenen Gebieten der Region aufgesucht.

In der geburtshilflichen Station des Hospitals werden jährlich etwa 750 Kinder entbunden. Neugeborene erhalten hier auch ihre ersten Untersuchungen und Impfungen<sup>110</sup>.

## **2.2. Patienten und Aufnahmekriterien**

Im Juni 2000 begann das Forschungslabor eine Langzeitstudie, die zum Ziel hatte, pathophysiologische Zusammenhänge der Malaria bei schwangeren Frauen und Neugeborenen genauer zu untersuchen. Bei den in diese Studie aufgenommenen Frauen handelt es sich um Schwangere aus dem Großraum Lambaréné, die zu vorgeburtlichen Kontrollen, sowie zur Entbindung, die Geburtshilfestation des Hospitals (*La Maternité*) aufsuchten. Im Rahmen der von Hebammen durchgeführten Vorsorgeuntersuchungen wurden Ergebnisse von Bluttests, erneut aufgetretene Infektionskrankheiten, sowie Art und Weise der eingenommenen Malariachemoprophylaxe im Mutterpass jeder Schwangeren dokumentiert. Gemäß dem Behandlungsprotokoll des Albert-Schweitzer-Hospitals nahm die überwiegende Mehrheit der Mütter Chloroquin (meist 300 mg pro Woche) zur Infektionsprophylaxe einer Malaria während der Schwangerschaft ein.

Die Patientinnen wurden vor Aufnahme in die Studie mündlich über die Studienabsicht informiert und über die damit verbundenen Tests aufgeklärt. Der

freiwilligen Teilnahme an der Studie ging eine schriftlich dokumentierte Zustimmung der Patientin voraus.

In die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 238 primigravide Mütter und deren Neugeborene einbezogen, die in einem etwa zweijährigen Zeitraum von 2001 bis 2002 in der *Maternité* des Albert-Schweitzer-Hospitals entbunden hatten. Ausschlusskriterien waren Multigravidität, sowie Primiparität bei bereits früheren nicht ausgetragenen Schwangerschaften. Zusätzlich wurden alle Frühgeborene, unreife Geborene, Mehrlingsschwangerschaften, sowie durch Kaiserschnitt entbundene Schwangerschaften ausgeschlossen.

### **2.3. Vorgehensweise bei Aufnahme**

Direkt nach der Entbindung des Kindes im Kreißsaal wurde die Mutter über die Studie aufgeklärt, und ihre Teilnahme schriftlich dokumentiert. Mit Hilfe eines Fragebogens wurde neben den Stammdaten der Mutter (Alter, Ethnizität und Patientenummer) zusätzlich noch Informationen hinsichtlich Gravidität, Parität, Tag der letzten Menstruation, sowie Länge, Gewicht und Geschlecht des Neugeborenen erhoben und schriftlich eingetragen. Angaben über eventuelle Malaria- bzw. andere Erkrankungen während der Schwangerschaft wurden von der Mutter erfragt bzw. aus den Einträgen früherer Vorsorgeuntersuchungen im Mutterpass entnommen.

Nach der Ausstoßung der Plazenta wurden etwa 20 ml Blut aus den Nabelschnurgefäßen mit Hilfe heparinierter Monovetten entnommen. Dieses **Nabelschnurblut**, das dem Blut des Neugeborenen entspricht, diente als Grundlage der Untersuchungen hinsichtlich des neonatalen Gesundheitszustandes.

An der maternalen Plazentafläche wurden mittels mehrerer Objektträger Abklatschpräparate des mütterlichen, intervillösen Blutes angefertigt. Diese Präparate dienten der Diagnose eines plazentaren Malariabefalls.

Zusätzlich wurden der Mutter noch etwa 5 ml peripheres, venöses Blut in ebenfalls heparinisierte Monovetten entnommen, um Informationen über den mütterlichen Gesundheitszustand zu erlangen.

## 2.4. Therapie der Patienten

Die Mütter blieben für die ersten postnatalen Stunden bis Tage im Rahmen der im Hospital üblichen Gesundheitsfürsorge für Wöchnerinnen hospitalisiert und medizinisch versorgt. Wurden aufgrund der für Studienzwecke entnommenen Blutproben von Mutter bzw. Kind zusätzlich Infektionen mit Plasmodien diagnostiziert, erhielt die Patientin sofort eine adäquate chemotherapeutische Behandlung.

Bei Diagnose einer Infektion der Mutter mit *P. falciparum* wurde mit **Chinin** oral (3 mal 10 mg/kg KG täglich für sieben Tage) therapiert. Die Patientinnen wurden weiterhin in der Entbindungsstation des Albert-Schweitzer-Hospitals bis zur Entlassung überwacht.

## 2.5. Diagnostik und Methoden

### 2.5.1. Bestimmung der Parasitämie

Plasmodieninfektionen des mütterlichen bzw. neonatalen Blutes wurden durch die Methode des „**Dicken Tropfens**“ diagnostiziert. Dafür wurden 10 µl des mütterlichen peripheren bzw. des Nabelschnurblutes auf einem Objektträger über eine Fläche von 10 x 18 mm gleichmäßig verteilt. Anschließendes Trocknen des Tropfens erfolgte über einige Minuten im Trockenschrank. Das Präparat wurde dann für 20 Minuten in Giemsa-Lösung gefärbt. Diese Färbelösung wurde mehrmals täglich aus konzentrierter Giemsa und Titrisolphosphatpuffer (pH 7,2) im Verhältnis 1:4 frisch hergestellt und gefiltert. Nach dem Färbevorgang wurde der Objektträger kurz im Wasserbad abgespült und wiederum für einige Minuten getrocknet.

Die so angefertigten Präparate konnten dann im Mikroskop mit Ölimmersion bei 100-facher Vergrößerung untersucht werden. Die Parasitämie pro µl wurde bestimmt, indem die Parasitenzahl in 100 ausgezählten Sichtfeldern mit dem Faktor 6 multipliziert wurde.

Die Abklatschpräparate der Plazenta wurden nach dem gleichen Verfahren gefärbt und mikroskopisch untersucht. Dies diente allerdings nur zur qualitativen Bestimmung plazentarer Infektionen bzw. zur Erregeridentifikation. Eine exakte Berechnung der Parasitämie war bei diesen Präparaten aufgrund des nicht quantifizierbaren Blutvolumens unmöglich und auch nicht beabsichtigt.

### 2.5.2. Separation der CBMC

Lymphozyten und Monozyten des Nabelschnurblutes, weiterhin als **CBMC** (Cord Blood Mononuclear Cells) bezeichnet, wurden von anderen Blutzellen durch Dichtezentrifugation getrennt. Dafür wurden etwa 20 ml des heparinisierten Nabelschnurblutes in einem 50 ml LeucoSep®-Röhrchen mit Filterscheibe auf etwa 15,1 ml Ficoll-Paque® (Dichte 1,077 g/l) geschichtet und 10 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. Das Ficoll trennte aufgrund seiner Dichteigenschaften die mononukleären Zellen von Granulozyten und Erythrozyten, so dass sich die CBMC in einer Schicht oberhalb des Filters und bedeckt von Plasma separat ansammelten. Die so isolierten CBMC wurden für die weiteren Arbeitsvorgänge durch Abpipettieren gewonnen, um dann in 50 ml Falcon™-Tubes mit mindestens 10 ml Waschmedium – PBS-Lösung (Phosphate Buffered Saline) mit eingestelltem pH von 7,4 – für 10 Minuten in der Zentrifuge gewaschen zu werden. Nach Zentrifugation wurde der zellfreie Überstand dekantiert. Dieser Waschvorgang wurde zweimal mit Waschmedium durchgeführt. Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen an einer Arbeitsbank mit Laminarflow ausgeübt.

### 2.5.3. Bestimmung der Zellzahl

Die durch Zentrifugation isolierten und gewaschenen mononukleären Zellen wurden zur Bestimmung der Zellzahl in etwa 10 ml des späteren Kulturmediums resuspendiert. So konnte eine hochkonzentrierte Suspension reiner CBMC hergestellt werden.

Als **Kulturmedium** wurde eine Lösung aus 500 ml RPMI-1640-Medium (Bikarbonatpuffer) verwendet, welches zusätzlich 5 ml HEPES (Sulfonsäurepuffer), 50 ml bei 56 °C hitze-inaktiviertem humanem AB-Serum (menschliches Serum der Blutgruppe AB), 5 ml einer 100-fachen L-Glutaminlösung und 2 ml einer 10 mg/ml konzentrierten Gentamycinlösung enthielt.

Zur eigentlichen Bestimmung der Zellkonzentration wurde ein geringer Teil der CBMC-Suspension mit Türk-Lösung im Verhältnis 1:10 verdünnt und zum Auszählen in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht. Der Mittelwert zweier ausgezählter Quadranten der Zählkammer unter Berücksichtigung des Verdünnungsverhältnisses diente zur Berechnung der Zellzahl pro Milliliter (Mittelwert \* Verdünnungsfaktor \*  $10^4$ ).

#### 2.5.4. Stimulation der CBMC

Zur Kultivierung und Stimulation der CBMC wurden 96-Loch-Platten mit Rundböden verwendet. Jedes Stimulans, sowie die jeweiligen Kontrollen, wurden als Triplikate getestet, wobei die Zellzahl pro Testloch auf  $2 \cdot 10^5$  eingestellt wurde. In jedes Testloch wurden 50 µl des jeweiligen Stimulans bzw. des Kontrollmediums vorgelegt. Anschließend wurden pro Testloch 100 µl der Zellsuspension dazugegeben, um ein Endvolumen von 150 µl je Testloch zu erhalten.

Als Negativkontrolle diente reines Kulturmedium.

Als Positivkontrollen wurden dem Kulturmedium je eine der folgenden Stimulantien zugesetzt:

- **PHA** (Phytohämagglutinin), ein aus Pflanzen gewonnenes **Mitogen**, das die Zellteilung unspezifisch induziert. Als stark potentes und wenig spezifisches Immunstimulans wird von PHA erwartet, dass es das bis zu diesem Stadium ausgebildete Immunverhalten der CBMC zu maximaler Ausprägung bringen wird. Die verwendete Endkonzentration von PHA in der Zellkulturplatte betrug 10 µg/ml.
- **PPD** (Purified Protein Derivate), das Tuberkulin von *Mykobacterium tuberculosis*. Da der Großteil der gabunesischen Bevölkerung bei Geburt

eine BCG-Impfung erhält, dient PPD als **Recall-Antigen**, das beim Geimpften eine Sekundärantwort des Immunsystems vom verzögerten Typ ( $T_H1$ ) auszulösen vermag. Diese Sekundärantwort ist beim ungeimpften Neugeborenen allerdings nicht zu erwarten. Hier dient PPD mit seiner Eigenschaft eine  $T_H1$ -Antwort auszulösen dazu, das Verhalten der neonatalen Zellen mit dem allgemeinen Verhalten reifer Immunzellen gegenüber diesem Fremdartigen mit spezifischer Wirkung zu vergleichen. PPD wurde in einer Endkonzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  verwendet.

Als eigentliche Test-Stimulantien wurden zwei unterschiedliche **Parasitenlysate** eingesetzt. Diese Lysate enthalten Antigene von Schizontenstadien zweier Plasmodienstämme, die bei Kindern mit schwerer Malaria in Lambaréné vorgefunden wurden. Diese endemischen Feldisolate wurden für diesen Zweck in Erythrozytenkulturen gezüchtet:

- **Isolat-1** in einer 1:100 verdünnten niedrigen Dosierung.
- **Isolat-2** in einer hohen Dosierung und

Als Kontrollen für die Parasitenlysate dienten reine **Erythrozytenlysate** nicht-infizierter Erythrozyten, die auch zur Parasitenkultivierung eingesetzt wurden. Die Erythrozytenlysate wurden ebenfalls entsprechend in hoher und niedriger Dosierung eingesetzt.

Die so für jede Nabelschnurblutprobe erstellten Zellkulturplatten wurden für insgesamt sechs Tage bei 37,5 °C in feuchter 5%  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre inkubiert. Nach den ersten drei Tagen erfolgte die Abnahme von Zellkulturüberständen zur Konzentrationsmessung der Zytokine **IL-10** und **IL-12**. Dafür wurden pro Testloch 120  $\mu\text{l}$  des Überstandes abpipettiert. Die Zytokinüberstände der jeweiligen Triplikate wurden gepoolt und mit frischem Kulturmedium im Verhältnis 1:1 verdünnt. Die Aufbewahrung der Zytokinüberstände bis zur Zytokinanalyse erfolgte in frischen Rundbodenplatten bei -80 °C.

Nach Abnahme der Kulturüberstände am dritten Tag wurde das abgenommene Volumen pro Testloch durch frisches Kulturmedium ersetzt. Am sechsten Tag wurden erneut 120  $\mu\text{l}$  der Überstände abgenommen. Diese dienten später der

Konzentrationsbestimmung von **IFN- $\gamma$** . Die Zytokinüberstände für IFN- $\gamma$  wurden unverdünnt auf frischen Rundbodenplatten bis zur Analyse tiefgefroren.

#### 2.5.5. Bestimmung der Zytokinantwort

Die Messung der Zytokinkonzentrationen in Zellkulturüberständen erfolgte durch **ELISA** (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Überstände vom dritten Tag dienten der Bestimmung der Konzentrationen von IL-10 und IL-12p40, Überstände vom sechsten Tag der Bestimmung von IFN- $\gamma$ .

Für die Zytokinmessung mittels ELISA wurden spezielle Immunoassay-Mikrotiterplatten mit für das zu bestimmende Zytokin spezifischen Coating-Antikörpern inkubiert und anschließend mit BSA (bovines Serumalbumin) geblockt. Auf die gecoateten Platten wurden dann die zu untersuchenden Zytokinüberstände, sowie die jeweiligen Kontrollstandardzytokine zusammen mit zytokinspezifischen und Peroxidase-markierten Detektions-Antikörpern aufgetragen. Die Ausbildung von „Sandwich“-Konfigurationen zwischen Antikörpern und vorhandenen Zytokinen erfolgte während einer weiteren Inkubationsperiode. Danach wurden die Platten mehrmals mit PBS-Tween-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von chromogenem TMB (Tetramethylbenzidin), dem hier verwendeten Peroxidase-Reaktions-Substrat, zeigten alle Proben, die Sandwich-Immunkomplexe ausgebildet hatten, eine blaue Farbreaktion. Unterschiedlich starke Blaufärbungen der Überstände entsprachen unterschiedlich starken Konzentrationen von Zytokin-Antikörper-Komplexen in den Proben. Die Farbreaktion wurde nach kurzer Inkubationszeit durch Zugabe verdünnter Phosphorsäure in ihrem Fortschreiten gestoppt. Dies hatte einen Farbumschlag von Blau nach Gelb zur Folge.

Die optische Dichte der gefärbten Proben wurde mittels eines ELISA-Readers und entsprechender Microsoft-Software ausgewertet. Für die photometrischen Dichtemessungen wurde ein 450 nm-Messfilter und ein 550 nm-Referenzfilter verwendet. Die Detektionsgrenze betrug 6,0 pg/ml für IL-10, 4,5 pg/ml für IL-12 und 5,7 pg/ml für IFN- $\gamma$ . Durch den Vergleich mit den Messwerten der



Standardzytokinkonzentrationen konnte die Zytokinproduktionen der Proben berechnet werden.

## 2.6. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm *Statview*® verwendet.

Da bei den ermittelten Messwerten nicht grundlegend von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte, wurden der *Kruskal-Wallis-Test* und der *U-Test nach Mann-Whitney* als nichtparametrische Tests angewandt.

Der *Kruskal-Wallis-Test* dient dem Vergleich stetiger ungepaarter Variablen zwischen drei verschiedenen Gruppen und wurde hier herangezogen, um Unterschiede in der Ausprägung der Ergebnisdaten der jeweiligen Gruppen untereinander zu ermitteln. Signifikante und damit statistisch eindeutige Unterschiede der Datensätze der einzelnen Gruppen wurden bei einem  $p$ -Wert  $< 0,05$  angenommen.

Der *Mann-Whitney-Test* dagegen diente dem Vergleich ungepaarter, stetiger Variablen in zwei Gruppen und wurde hier eingesetzt, um die quantitativen Ergebnisse der Zytokinproduktion in Gruppenpaarungen aus je zwei der drei untersuchten Gruppen zu vergleichen. Die Testwahrscheinlichkeit wurde bei einem  $p$ -Wert  $< 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet.

Der Vergleich der prozentualen Anteile positiver Antwortraten an allen Proben zwischen den Gruppen wurde mit Hilfe des *Chi-squared ( $X^2$ )-Tests* durchgeführt. Dieser Test diente dem Vergleich der jeweiligen Anwohnhäufigkeiten innerhalb zweier Gruppen und gab somit Ausschluss über eine eventuelle gemeinsame Identität der Proben. Statistisch signifikantes Nichtübereinstimmen der Anteile an Proben mit positiver Antwortrate in zwei Vergleichsgruppen wurde bei einem  $p$ -Wert  $< 0,05$  angenommen.

Außerdem wurden paarweise Korrelationen mit dem *Spearman-Rank-Korrelations-Test* berechnet. Dieser nichtparametrische Test diente dem quantitativen Vergleich der Zytokinproduktion bei Stimulation mit den beiden Plas-

modienantigenen bzw. PPD, um Beziehungen zwischen gemeinsamer Bildung zweier Zytokine zu ermitteln. Statistisch signifikante Testwahrscheinlichkeiten wurden ebenfalls bei einem  $p$ -Wert  $< 0,05$  angenommen.

### **3. Ergebnisse**

Für diese Arbeit wurden insgesamt 238 von Neugeborenen primigravider Mütter gewonnene Nabelschnurblutproben ausgewertet, die im Zeitraum Juli 2000 bis Mai 2002 im Albert-Schweitzer-Hospital geboren wurden. Diese Proben lieferten die Grundlage für die nachfolgend aufgeführten epidemiologischen Daten. Von den 238 Proben wurden aus insgesamt 162 Proben CBMC zur Zytokinstimulation herangezogen. Sie lieferten die Ergebnisse zur Beurteilung des Zytokinverhaltens neonataler CBMC.

Aufgrund unterschiedlicher Blutvolumen der Nabelschnurgefäße bzw. bedingt durch unzureichenden Gehalt an CBMC mancher Proben konnten nur 97 der 162 Proben parallel für alle drei Zytokine getestet werden. Die übrigen Proben wurden nur auf einen oder zwei Zytokintypen getestet. Die Ergebnisse aller 162 stimulierten Proben wurden deshalb als Gesamtheit möglicher Zytokinverhalten neonataler Zellen betrachtet und dementsprechend ausgewertet.

Als Unterscheidungsmerkmal wurde das zeitliche Auftreten plazentarer Plasmodieninfektion in der Schwangerschaft gewählt. Für den statistischen Vergleich wurden deshalb abhängig vom Nachweis einer mikroskopischen Plazentainfektion bzw. von der schriftlichen Dokumentation einer Infektion während der Schwangerschaft im Mutterpass folgende drei Gruppen gebildet:

- Infektion zum Zeitpunkt der Geburt (**IG-Gruppe**): *P. falciparum*-Infektion mikroskopisch im plazentaren Gewebe nachgewiesen. Die CBMC dieser Neugeborenen hatten kurz vor Geburt eine akute Exposition gegenüber Plasmodienantigenen. Diese akute Infektion mag sich zudem auch auf die Schwangerschaftsbeendigung ausgewirkt haben.
- Infektion während der Schwangerschaft (**IS-Gruppe**): keine mikroskopisch nachweisbare *P. falciparum*-Infektion der Plazenta bei Geburt, aber dokumentierte Diagnose und Therapie einer Malaria während der Schwangerschaft gemäß Mutterpassdokumentation. CBMC dieser Neugeborenen waren sowohl einer akuten Exposition gegenüber Plasmodienantigenen, als auch einer Krankheitsbekämpfung durch den mütterlichen Organismus

während der Fötalzeit ausgesetzt. Die durchschnittliche Zeitspanne zwischen Therapie der Malariainfektion bis zum Geburtstermin betrug 113,4 Tage mit einem Minimalabstand zur Entbindung von 20 Tagen und einem Maximalabstand zur Entbindung von 213 Tagen. Chinin wurde am häufigsten als Therapeutikum während der Schwangerschaft angewendet.

- **Keine Infektion (KI-Gruppe):** keine Infektion mit *P. falciparum* nachgewiesen, weder während der Schwangerschaft noch zum Geburtszeitpunkt. CBMC dieser Neugeborenen sind hinsichtlich jeglichen Plasmodienantigenen unerfahren.

Tabelle 1 verdeutlicht die zahlenmäßige Verteilung der Proben auf die Untergruppen.

Tabelle 1:

Verteilung der Proben auf die Untergruppen.

<b>Probenaufteilung:</b>	<b>IG-Gruppe:</b>	<b>IS-Gruppe:</b>	<b>KI-Gruppe:</b>	<b><u>Summe:</u></b>
Proben gesamt:	62	54	122	238
- davon stimulierte Proben:	44	35	83	162
- davon 3 parallele Zytokinmessungen:	22	18	57	97

### **3.1. Epidemiologische Auswertung**

#### **3.1.1. Konnatale Malaria**

In allen in dieser Arbeit ausgewerteten Nabelschnurblutproben, konnten mikroskopisch – selbst bei Befall der Plazenta – keine Infektion mit *P. falciparum* nachgewiesen werden. Es gab darüber hinaus auch keine anderen Hinweise auf konnatale Malaria in den untersuchten Neugeborenen.

### 3.1.2. Malaria bei Geburt

81 (34,0%) aller Mütter wiesen eine Malariainfektion während der Schwangerschaft auf. Davon zeigten 27 Mütter (33,3%) eine erneute oder noch bestehende Infektion am Geburtstermin. Dementsprechend konnten für 157 (66,0%) der Mütter keine Malariaerkrankung während der Schwangerschaft festgestellt werden, dennoch waren am Geburtstermin 36 dieser Frauen (22,3%) plazenta-positiv. Es ließ sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Auftreten einer Plazentainfektion im frühen Schwangerschaftsverlauf und Bestehen einer plazentaren Infektion zum Geburtszeitpunkt ( $p = 0,066$ ) nachweisen. Erneutes Auftreten von Plasmodien im mütterlichen Blut bei Geburt scheint somit durch Reinfektionen gegen Ende der Schwangerschaft bedingt zu sein.

Etwa die Hälfte (51,3%) aller primigraviden Mütter entwickelte keine Infektion mit *P. falciparum* während der Schwangerschaft, aber etwa ein Viertel (26,0%) der Mütter eine Infektion bei Geburt. Dieses Verhältnis war unter multigraviden Müttern im gleichen Zeitraum mit 65,0% bzw. 6,1% zugunsten der nicht-infizierten Mütter verschoben (Daten hier nicht dargestellt).

### 3.1.3. Effekt von Chemoprophylaxe während der Schwangerschaft

Es konnte kein positiver Effekt einer Chemoprophylaxe mit Chloroquin auf das Infektions- und Erkrankungsrisiko der Mütter während der Schwangerschaft festgestellt werden. 203 (85,3%) aller Schwangeren nahmen prophylaktisch Chloroquin ein. 94 dieser Mütter (46,3%) präsentierten eine Malariaepisode während oder gegen Ende der Schwangerschaft, wohingegen 109 Mütter (53,7%) infektionsfrei blieben. Mehr als die Hälfte aller Schwangeren (62,9%), die keine Prophylaxe einnahmen, litt an einer Plasmodieninfektion im Verlauf der Schwangerschaft. Somit wurde ein über-zeugend positiver Effekt mit einem klaren Profitieren aus einer Chemoprophylaxe mit Chloroquin hinsichtlich der Erkrankungshäufigkeiten nicht deutlich.

Zwischen Schwangeren mit und ohne Chemoprophylaxe zeigten sich keine Unterschiede bezogen auf Verlauf und Ausgang der Schwangerschaft bzw. den Geburtsparametern des Kindes.

### 3.2. Auswertung der CBMC-Stimulationen

#### 3.2.1. Häufigkeitsverteilung der stimulierten Proben

Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse aus den Zytokinstimulationen wurden alle Proben (n = 162), die Resultate für mindestens eines der Zytokine lieferten, berücksichtigt.

Tabelle 2 gibt die Verteilung aller stimulierten und ausgewerteten Proben innerhalb der drei Gruppen, sowie die Gesamtzahl durchgeführter Zytokinstimulationen je Gruppe wieder.

Tabelle 2:

Anzahl ausgewerteter Zytokinstimulationen für IL-10, IL-12 und IFN- $\gamma$  in den untersuchten Gruppen.

	<b>IG-Gruppe</b>	<b>IS-Gruppe</b>	<b>KI-Gruppe</b>	<b><u>Summe:</u></b>
<b>IL-10</b>	33	25	70	128
<b>IL-12</b>	32	27	70	129
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	36	27	70	133
<b><u>Summe :</u></b>	101	79	210	390

Die zahlenmäßige Verteilung zeigt, dass die Anzahl durchgeführter Stimulationen pro Zytokintyp innerhalb jeder Untergruppe in etwa gleich verteilt ist. Die unterschiedliche Anzahl an Stimulationen je Untergruppe reflektiert die relative Häufung des Auftretens primigravider Schwangerer mit und ohne nachgewiesener Infektion entsprechend den angewendeten Unterteilungskriterien.

### 3.2.2. Antwortraten nach Stimulation

#### 3.2.2.1. Responderhäufigkeiten

Für die weitere Auswertung wurden nur Proben eingeschlossen, die nach Stimulation positiv auf das jeweilige Stimulans ansprachen (= Responderproben). Als positiv wurde eine Reaktion gewertet, deren gemessene Zytokinproduktion > 0 pg/ml betrug.

Die Anwendung des *Chi-squared-Tests* ergab, dass der Anteil an Proben mit positiver Antwort einer Gruppe dem Anteil positiver Proben der Vergleichsgruppe entsprachen. Ein statistisch signifikantes Nichtübereinstimmen der prozentualen Anteile wurde als einzige Ausnahme beim Vergleich der Häufigkeiten von Responderproben für IL-10 zwischen der IG- und IS-Gruppe nach PPD-Stimulation beobachtet ( $p = 0,04$ ).

Tabelle 3:

Prozentuale Anteile der Proben mit positiver Zytokinantwort an allen durchgeführten CBMC-Stimulationen für PHA, PPD und die beiden Malariaantigene in den verschiedenen Gruppen.

		Anzahl n	Responderhäufigkeit %		
			gesamt	IG	IS
<b>PHA</b>	IL-10	128	879	885	913
	IL-12	129	938	857	957
	IFN- $\gamma$	133	972	964	986
<b>PPD</b>	IL-10	128	758	500	69.6
	IL-12	129	844	821	928
	IFN- $\gamma$	133	667	786	812
<b>Isolat-1</b>	IL-10	128	545	731	580
	IL-12	129	656	714	696
	IFN- $\gamma$	133	639	750	667
<b>Isolat-2</b>	IL-10	128	576	615	594
	IL-12	129	656	607	667
	IFN- $\gamma$	133	556	786	710

Tabelle 3 stellt die Ansprechraten stimulierter Proben (Anteil Responder an allen stimulierten Proben) für jeden Zytokintyp und jedes der vier Stimulantien dar. *Anzahl n* entspricht der Gesamtzahl stimulierter Proben (Responder und Nichtresponder) je Zytokinstimulans. Proben, die auf Stimulation positiv reagiert haben, sind als prozentualer Anteil der Gesamtzahl an Respondern und Nichtrespondern (*Responderhäufigkeit*) in den drei Untergruppen wiedergegeben.

Die **Responderhäufigkeiten** liefern Auskunft über das Ansprechen neonataler Zellen auf die jeweiligen Stimulationsreize. Je höher der Anteil Proben, die auf eine bestimmte Stimulation mit messbarer Zytokinproduktion reagieren, desto entwickelter scheint der Reifegrad bzw. die Fähigkeit zur Proliferation und Auslösung einer Zytokinantwort innerhalb der jeweiligen Zellpopulation zu sein.

#### 3.2.2.2. Antwortraten bezogen auf Stimulans

**PHA**, ein Mitogen, wurde eingesetzt, um zu ermitteln, wie stark die allgemeine Kapazität zur Zytokinproduktion der stimulierten Zellen ist. Da PHA unspezifisch und somit ein Antigen mit hoher Stimulationspotenz darstellt, entsprachen die dadurch erzeugten Antwortraten der möglichen Maximalkapazität der stimulierten Zellen.

Stimulation mit PHA zeigte in allen Gruppen höchste Antwortraten im Vergleich zu den anderen eingesetzten Stimulantien. PHA übte die höchste Stimulationspotenz auf die neonatalen Zellen aus. Außerdem sprach in allen Untergruppen die Zytokinantwort bei IFN- $\gamma$  stärker als bei den beiden anderen Zytokintypen an. Der Vergleich der Infektionsgruppen ergab tendenziell höhere Antwortraten bei Zellen, die während der Schwangerschaft nie einer Plasmodieninfektion ausgesetzt waren. Dagegen traten die niedrigsten Ansprechquoten für IL-12 und IFN- $\gamma$  unter PHA-Stimulation nur bei Zellen aus der Gruppe mit Infektion in der Schwangerschaft auf.

Insgesamt stärkstes Ansprechen wurde nach Stimulation mit PHA in der KI-Gruppe für IFN- $\gamma$  (98,6%) und insgesamt schwächstes Ansprechen in der IS-Gruppe für IL-12 (85,7%) ermittelt. Es zeigte sich dennoch deutlich, dass alle



Zellen innerhalb der für eine Mitogen-Stimulation erwarteten hohen Antwortrate reagierten. Normalerweise weisen adulte Zellen ein maximal hohes Ansprechen nach PHA-Stimulation auf, nicht jedoch die hier verwendeten neonatalen Zellen. Dieser Unterschied zu dem für adulte Zellen üblichen Verhalten ist deshalb auf die noch nicht vollständig in ihrer Funktion ausgereiften neonatalen CBMC zurückzuführen.

Nach Stimulation mit **PPD** ergab sich ein eher uneinheitliches Bild innerhalb der Antwortraten. PPD als Antigen, das eine spezifische zellvermittelte Immunreaktion im voll entwickelten Immunsystem auszulösen vermag, dient dem Nachweis eventuell vorhandener Immunreife neonataler Zellen nach Stimulation mit diesem Antigen. Neonatale Zellen, die auf dieses Recall-Antigen ansprechen, müssen demnach also bereits über einen gewissen Grad an immunologischer Funktionsreife verfügen.

Der Vergleich der Gesamthäufigkeiten der Responder innerhalb der Stimulansklassen zeigte generell stärkeres Ansprechen der CBMC auf PPD als auf Plasmodienantigenen. Produktion von IL-12 war die am häufigsten auftretende Immunreaktion, während IL-10 (Ausnahme: IG-Gruppe) das geringste Antwortverhalten nach PPD-Stimulation aufwies.

In der Gruppe ohne vorhergehende Infektion finden sich die höchsten Antwortraten für IL-12 und IFN- $\gamma$ . Stärkstes Ansprechen in der IL-10-Produktion ließ sich allerdings in der IG-Gruppe nachweisen. Die schwächsten Responderraten zeigen sich in der IS-Gruppe für die Zytokine IL-10 und IL-12. Das geringste Ansprechen mit IFN- $\gamma$ -Bildung wurde allerdings in der IG-Gruppe gemessen.

Das mit Abstand schwächste Antwortverhalten (50,0%) nach PPD-Stimulation ließ sich für IL-10 in der IS-Gruppe ermitteln, am stärksten (92,8%) sprach die KI-Gruppe mit IL-12-Produktion auf PPD an.

Stimulation mit den lokal vorgefundenen Schizontenantigenen **Isolat-1** und **Isolat-2** diente der Simulation eines Antigenkontaktes, wie er während einer plazentaren Malariainfektion eintreten würde. Neonatale Zellen, die bei plazentarer Infektion während der Schwangerschaft bereits einem solchen Antigen-

kontakt ausgesetzt waren, sollten sich bei entsprechender Immunreife in ihrem Antwortverhalten von CBMC, die dem Antigen das erste Mal gegenüber treten, unterscheiden.

Für Plasmodienantigen ergaben die Responderhäufigkeiten ähnlich starke Antwortraten für alle Zytokinklassen. Beide Isolate zeigten im Gesamtvergleich IFN- $\gamma$  als das bei den meisten Zellen stimulierbare Zytokin. Im Gruppenvergleich dagegen traten Höchstwerte bei Isolat-1 nur in der IS-Gruppe allein (Ausnahmen: IL-12 in IG- und KI-Gruppe) und bei Isolat-2 nur in der IS- und der KI-Gruppe (Ausnahme: IL-12 in IG-Gruppe) auf.

Der Vergleich der Infektionsgruppen ergab stärkstes Ansprechen bei CBMC, die bereits in der frühen Schwangerschaft einer Plazentainfektion ausgesetzt waren (Ausnahme: IL-12 am stärksten in der KI-Gruppe bei Isolat-2). Außerdem zeigten Zellen der Gruppe mit Infektion bei Geburt die geringsten Antwortraten im Gruppenvergleich (Ausnahme: IL-12 in der IS-Gruppe bei Isolat-2).

Nach Stimulation mit Isolat-1 betrug die maximale bzw. minimale Responderate 75,0% (IFN- $\gamma$  in IS-Gruppe) bzw. 54,5% (IL-10 in IG-Gruppe). Die entsprechenden Raten nach Isolat-2-Stimulation beliefen sich auf 78,6% (IFN- $\gamma$  in IS-Gruppe) bzw. 55,6% (IFN- $\gamma$  in IG-Gruppe).

### **3.3. Auswertung der Zytokinkonzentrationen**

Die Stärke der Zytokinproduktion stimulierter Zellen wurde photometrisch gemessen und die Photointensität als Konzentrationen in *pg/ml* umgerechnet. Die tatsächlich produzierten Zytokinkonzentrationen je Stimulation wurden als Differenz zwischen den jeweiligen Stimulationswerten und den Messwerten der reinen Mediumproben (Kontroll- bzw. Leerwert) ermittelt. Negative Differenzen wurden als nicht vorhandene Zytokinproduktion mit einer Konzentration von 0,0 *pg/ml* gewertet.

### 3.3.1. Charakteristik der Messdaten

Die gemessenen Zytokinkonzentrationen aller Gruppen und Untergruppen zeigten im statistischen Vergleich eine nach links verschobene Normalverteilung (positive Verschiebung) mit einer Vielzahl von Proben, deren Maximalkonzentrationen im niedrigeren Konzentrationsbereich lagen. Zusätzlich konnte in allen Gruppen eine hohe Anzahl von Ausreißerwerten beobachtet werden, deren Maximalkonzentrationen im oberen Wertebereich lagen.

Dieses unregelmäßige Verteilungsmuster wurde statistisch besonders dadurch bemerkbar, dass sich für die errechneten Standardabweichungen meist höhere Beträge ergaben, als für die Beträge der jeweiligen Mittelwerte. Da dieses ungleichmäßige Verteilungsverhalten der Messwerte in allen untersuchten Gruppen zu finden war, konnte davon ausgegangen werden, dass eine allen Proben gemeinsam zugrundeliegende Ursache vorlag. Wahrscheinlich führte die ungleich entwickelte Immunreife der neonatalen CBMC zu dieser unregelmäßigen Werteverteilung. Offensichtlich waren nicht alle neonatalen Immunzellen in der Lage, ihre Zytokinproduktion nach Stimulation adäquat zu initiieren bzw. zu kontrollieren.

Insgesamt produzierten alle Zellen nach Stimulation mit PHA die jeweils höchsten Mediankonzentrationen für jedes der getesteten Zytokine.

### 3.3.2. Vergleich der Zytokinkonzentrationen

Die folgenden Auswertungen erfolgten mit Hilfe statistischer Tests für den Vergleich der verschiedenen Stimulationsergebnisse in den Gruppen. *Box-Plot-Diagramme* wurden hierbei zur graphischen Darstellung herangezogen, um die Spannbreite der Messwerte innerhalb der 10. und 90. Perzentile, sowie den Median und die 25%- bzw. 75%-Quartile darstellen zu können.

Die Diagramme stellen die gemessenen Zytokinkonzentrationen der Infektionsgruppen für die vier verwendeten Stimulantien dar. Signifikante  $p$ -Werte im statistischen Vergleich mittels des *Mann-Whitney-Tests* (nonparametrischer Vergleich zweier unpaariger Stichproben) sind durch \* markiert angegeben.

### 3.3.2.1. Konzentrationsvergleich für IL-10

Diagramm 1 zeigt die IL-10-Konzentrationen nach Stimulation, sowie die Verteilung innerhalb der Infektionsgruppen.

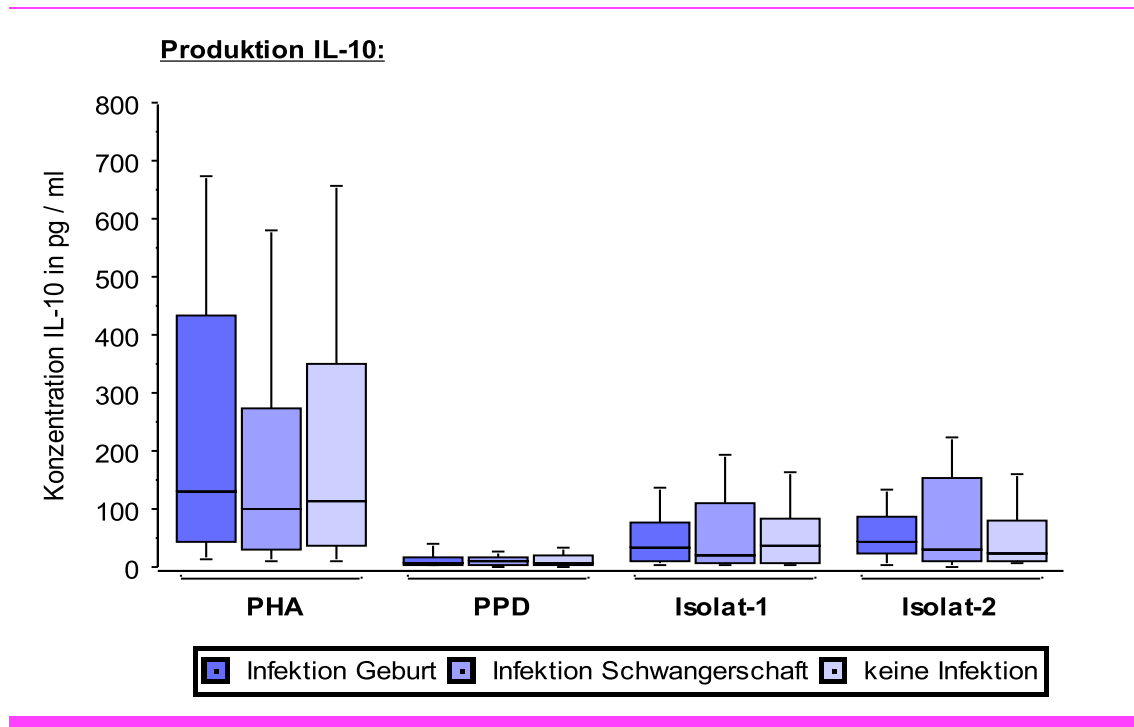


Diagramm 1:

IL-10-Produktion gemessen als Konzentrationen in pg /ml nach Stimulation mit PHA, PPD, Isolat-1 und Isolat-2.

**IL-10-Bildung** wurde am stärksten durch Stimulation mit **PHA** ausgelöst, während mit dem mykobakteriellen Antigen **PPD** nur relativ geringe Konzentrationen messbar waren. PPD scheint also die Produktion von IL-10 nicht sonderlich zu beeinflussen. Die Medianwerte der IL-10-Konzentrationen liegen für PHA in der IG-Gruppe mit 130,5 pg/ml am höchsten, gefolgt von 111,9 und 98,9 pg/ml in der KI- bzw. IS-Gruppe. Für PPD zeigt die IL-10-Produktion hingegen den höchsten Median mit 11,4 pg/ml in der IS-Gruppe gefolgt von 7,8 und 5,5 pg/ml in der KI- bzw. IG-Gruppe. Im statistischen Gruppenvergleich ergaben sich hierbei für beide Stimulantien keine signifikanten Unterschiede. Die IL-10-Konzentrationen nach Stimulation mit den Schizontenantigenen liegen höher als die Werte nach PPD-Stimulation. **Isolat-1** und **Isolat-2** scheinen somit im

Vergleich zum Mykobakterienantigen eine stärkere Stimulations-potenz hinsichtlich einer IL-10-Produktion in neonatalen Zellen auszuüben. Die Medianwerte für Isolat-1 lagen bei 33,3 und 35,9 pg/ml in der IG- und KI-Gruppe, wohingegen die mediane IL-10-Konzentration der CBMC der IS-Gruppe mit 21,1 pg/ml einen gewissen Abstand dazu aufwies. Für Isolat-2 lagen die Mediane wiederum stärker gestreut mit einem Höchstwert in der IG-Gruppe von 43,4 pg/ml, gefolgt von 31,4 und 24,0 pg/ml in der IS- bzw. KI-Gruppe. Obwohl im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede zu beobachten waren, ließ sich unter Stimulation mit Isolat-2 dennoch ein Trend zu niedrigeren Konzentrationswerten in der KI-Gruppe gegenüber der IS- und IG-Gruppe erkennen.

### 3.3.2.2. Konzentrationsvergleich für IL-12

Diagramm 2 zeigt die IL-12-Konzentrationen nach Stimulation, sowie die Verteilung innerhalb der Infektionsgruppen.

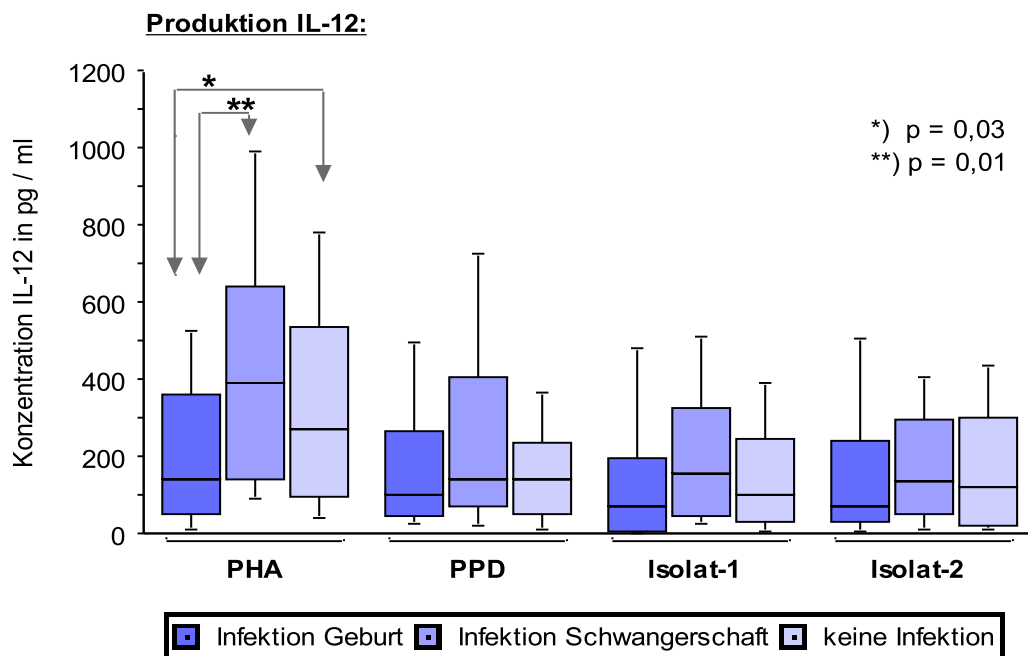


Diagramm 2:

IL-12-Produktion gemessen als Konzentrationen in pg /ml nach Stimulation mit PHA, PPD, Isolat-1 und Isolat-2.

Bei der **IL-12-Bildung** zeigten sich durchweg höhere Konzentrationslevel als die bei IL-10. Zusätzlich wurde die IL-12-Produktion durch PPD stärker beeinflusst.

Der Wertevergleich nach **PHA**-Stimulation ergab signifikante Unterschiede zwischen IG- und IS- bzw. KI-Gruppe (entsprechende Mediane: 138,7 und 390,3 bzw. 272,4 pg/ml). Zellen, die am Geburtszeitpunkt einer Malariainfektion der Mutter ausgesetzt waren, produzierten weniger PHA. Der Vergleich zwischen IS- und KI-Gruppe weist zudem Tendenzen einer stärkeren IL-12-Produktion in Zellen auf, die während der Schwangerschaft einer Malariainfektion ausgesetzt waren, allerdings ohne statistische Signifikanz im *Mann-Whitney-Test*. Dennoch zeigten die Ergebnisse des *Kruskal-Wallis-Tests* für PHA eine statistisch signifikante Beeinflussung der Daten durch die jeweilige Gruppenzugehörigkeit ( $p = 0,02$ ).

Für **PPD** zeigen die Medianwerte ebenfalls Unterschiede in der IL-12-Produktion zwischen CBMC, die kürzlich Infektion ausgesetzt waren (100,7 pg/ml) und den beiden anderen Gruppen (141,8 bzw. 139,4 pg/ml).

Nach Stimulation mit Plasmodienantigen bildeten sich für IL-12 diese Tendenzen ebenfalls andeutungsweise aus. Für beide **Isolate-1 und -2** weisen Zellen der Gruppe mit Infektion in der frühen Schwangerschaft die höchsten Medianwerte auf (155,8 pg/ml für Isolat-1 und 135,7 für Isolat-2). Zusätzlich erzielten CBMC der Gruppe ohne Infektion ähnlich hohe Werte für IL-12 (120,2 pg/ml) nach Stimulation mit Isolat-2. Die medianen Konzentrationen der IG-Gruppe fielen mit 69,4 bzw. 71,1 pg/ml dagegen weitaus geringer aus.

### 3.3.2.3. Konzentrationsvergleich für IFN- $\gamma$

Diagramm 3 zeigt die IFN- $\gamma$ -Konzentrationen nach Stimulation, sowie die Verteilung innerhalb der Infektionsgruppen.

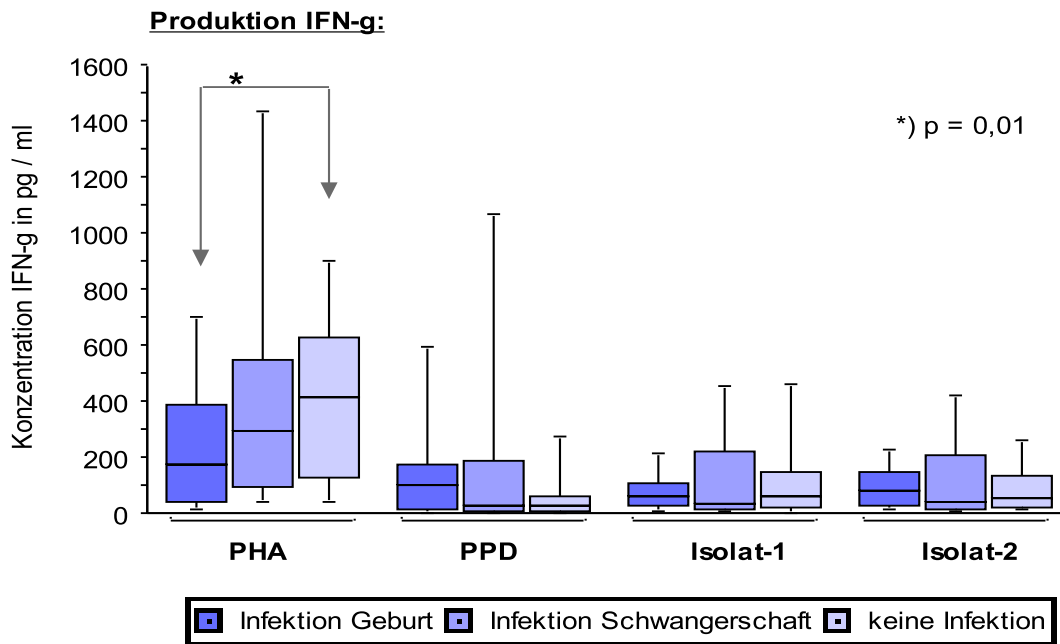


Diagramm 3:

IFN- $\gamma$ -Produktion gemessen als Konzentrationen in pg /ml nach Stimulation mit PHA, PPD, Isolat-1 und Isolat-2.

Im Rahmen der **IFN- $\gamma$ -Produktion** stellte sich wiederum eine Verschiebung der Konzentrationslevel der Medianwerte ein.

Nach Stimulation mit **PHA** ergab der Gruppenvergleich erneut signifikante Unterschiede hinsichtlich der Zytokinproduktion zwischen der IG-Gruppe (Medianwert 176,6 pg/ml) und der Gruppe ohne vorausgegangene Infektion (Medianwert 410,6 pg/ml). Die mediane IFN- $\gamma$ -Konzentration der Zellen der IS-Gruppe wiesen ebenfalls eine relativ hohe Produktionskapazität mit 295,3 pg/ml auf. Auch hier lieferte der *Kruskal-Wallis-Test* statistisch eindeutige Ergebnisse hinsichtlich der Verschiedenheit der ermittelten Daten in den drei Gruppen bzw. einer Beeinflussung der Daten durch die Gruppenzugehörigkeit der jeweiligen Proben ( $p = 0,03$ ).

Innerhalb der **PPD**-Stimulation zeigt sich ein Konzentrationsanstieg in der IG-Gruppe mit 97,2 pg/ml als Median. Dagegen liegen die Werte der beiden anderen Gruppen mit 28,1 und 25,8 pg/ml eng beieinander im unteren Bereich. Hier ergab der statistische Vergleich allerdings keine signifikanten Unterschiede.

Ein ähnliches Verhalten hinsichtlich der IFN- $\gamma$ -Produktion wurde auch für die beiden Isolate deutlich. Nach Stimulation mit **Isolat-1** und **Isolat-2** wurden in der Gruppe mit placentarer Infektion bei Geburt die höchsten Medianwerte bei 59,7 bzw. 78,3 pg/ml gemessen. CBMC der Gruppe ohne Infektion zeigten eine ebenfalls hohe IFN- $\gamma$ -Produktion nach Stimulation mit Isolat-1 (57,0 pg/ml), wohingegen der Median für Isolat-2 (51,0 vs. 78,3 pg/ml in der IG-Gruppe) relativ niedrig ausfiel. Die erzielten Mediankonzentrationen für die IS-Gruppe lagen mit 34,9 bzw. 40,6 pg/ml dagegen im unteren Wertebereich.

### 3.4. Korrelationsergebnisse

#### 3.4.1. Korrelation zwischen Isolat-Stimulantien und PPD in der Zytokinproduktion

Mit Hilfe der *Spearman-Rangkorrelation* (nichtparametrischer Test zum Vergleich der Korrelation zweier Datensets) sollte ermittelt werden, wieweit das Auftreten einer Zytokinantwort unter Stimulation mit einem der Plasmodienantigenisolate mit dem Auftreten der selben Zytokinantwort unter Stimulation mit dem anderen Plasmodienantigenisolat korreliert.

Die  $p$ -Werte für die Wahrscheinlichkeit im Auftreten der ermittelten Korrelation bei der Produktion eines Zytokins unter verschiedenen Stimulantien sind in Tabelle 4 für die Schizontenantigene des Isolat-2 und Isolat-1 und in Tabelle 5 und 6 für den Vergleich von PPD mit je einem der Schizontenantigene dargestellt.

Positive Korrelationen zeichnen sich durch einen Korrelationskoeffizienten  $r > 0$  und  $\leq 1$  aus.  $p$ -Werte  $> 0,05$  nach Testung der Eintretenswahrscheinlichkeit der ermittelten Korrelationskoeffizienten wurden als statistisch nicht signifikant (n.s.) für das Auftreten eines Zusammenhanges innerhalb der Zytokinproduktion aufgeführt.



Tabelle 4:

Werte für die Testwahrscheinlichkeit  $p$  bei Korrelation zwischen den Konzentrationen eines Zytokins unter Stimulationen mit den Schizontenantigenen Isolat-1 und Isolat-2.

	<b>Infektionsmodus</b>	<b>IL-10</b>	<b>IL-12</b>	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>
<b>Isolat-1/ Isolat-2</b>	Infektion Geburt	1	n. s.	1
	Infektion Schwangerschaft	1	4	1
	Keine Infektion	1	1	3

Tabelle 4 zeigt, dass die antigenetischen Eigenschaften bzw. die Stimulationspotenz der beiden Plasmodienantigene stark korrelieren und eine etwa gleichartig ausgerichtete Zytokinreaktion in Zellen aller Gruppen auszulösen vermögen. Alle Korrelationen innerhalb der Zytokinbildung infolge Isolat-1- oder Isolat-2-Stimulation waren positiv, und die gemessenen Zusammenhänge stellten sich überwiegend als signifikant dar. Für IL-12 in der IG-Gruppe ergab sich eine statistisch nicht signifikante Korrelation, da in dieser Gruppe die Zytokinwerte unter Isolat-1-Stimulation weitaus ungleichmäßiger verteilt waren, wohingegen die korrelierten Isolat-2-Werte für IL-12 geringere Schwankungen aufwiesen.

Tabelle 5 und 6:

Werte für die Testwahrscheinlichkeit  $p$  bei Korrelation zwischen den Konzentrationen verschiedener Zytokine unter Stimulationen mit Isolat-1 bzw. Isolat-2 und PPD.

	<b>Infektionsmodus</b>	<b>IL-10</b>	<b>IL-12</b>	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>
<b>Isolat-1/ PPD</b>	Infektion Geburt	n. s.	n. s.	1
	Infektion Schwangerschaft	n. s.	5	n. s.
	Keine Infektion	n. s.	n. s.	n. s.

	<b>Infektionsmodus</b>	<b>IL-10</b>	<b>IL-12</b>	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>
<b>Isolat-2/ PPD</b>	Infektion Geburt	n. s.	n. s.	n. s.
	Infektion Schwangerschaft	n. s.	1	n. s.
	Keine Infektion	n. s.	2	n. s.

Der Korrelationsvergleich je Zytokin für die Kombination aus Schizontenantigen und Mitogen (Isolat-1/PPD bzw. Isolat-2/PPD) in Tabellen 5 und 6 ließ bei beiden Stimulanskombinationen signifikante Zusammenhänge in der IL-12-Produktion für die IS-Gruppe erkennen. Die Verteilung der Zytokinkonzentrationen in den entsprechenden Teildiagrammen (siehe Diagramm 2) zeigt, dass diese signifikanten Zusammenhänge in der IL-12-Produktion hier auf eine höhere Verteilung der Konzentrationswerte für dieses Zytokin nach PPD-Stimulation zurückzuführen sind, und sich diese Gruppe dadurch von den anderen Infektionsgruppen unterscheidet. Infolge der Antigen-Stimulationen trat ein solch starkes Ansteigen der Konzentrationswerte für IL-12 in der IS-Gruppe gegenüber den anderen Gruppen nicht auf.

Bei allen drei Infektionsgruppen ergaben sich stärkere Zusammenhänge zwischen IL-12-Produktion in der Vergleichskombination PPD/Isolat-2 als in PPD/Isolat-1 (signifikanter  $p$ -Wert in der KI-Gruppe und  $p = 0,09$  in der IG-Gruppe). Es zeigt sich, dass das Konzentrationsmuster nach PPD-Stimulation eher den Ergebnissen der Isolat-2-Stimulation entspricht, wohingegen die Werte infolge Isolat-1-Stimulation in den Gruppen ohne und mit Infektion bei Geburt eine insgesamt niedrigere Verteilung aufwiesen.

Zusätzlich stellte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der IFN- $\gamma$ -Produktion nach Stimulation mit Mitogen und Isolat-1 in der IG-Gruppe ein, der allerdings bei Korrelation von PPD mit Isolat-2 nicht so eindeutig nachzuweisen war ( $p = 0,07$ ). Dieses Ergebnis erklärt sich ebenfalls durch die insgesamt höheren Werte bei PPD in dieser gegenüber der IS- und KI-Gruppe.

#### 3.4.2. Korrelation zwischen Zytokinpaaren bei Stimulation mit Isolaten

Durch die *Spearman-Rangkorrelation* (nichtparametrischer Test zum Vergleich der Korrelation zweier Datensets) wurde geprüft, ob die gemessenen Zytokinwerte unter Stimulation mit den Plasmodienantigenen einander beeinflussen. Beim Paarvergleich zwischen den Antwortwerten jeweils zweier Zytokinarten

lässt sich somit erkennen, inwieweit die Produktion eines Zytokintyps mit der Produktion eines anderen innerhalb der selben Zellpopulation korreliert.

Tabelle 7 stellt die signifikanten  $p$ -Werte nach Testung der ermittelten Korrelationskoeffizienten  $r$  (positive Korrelation bei  $0 < r \leq 1$ ) für die Zytokinpaarungen in den drei Untergruppen für Stimulation mit Isolat-2 und Isolat-1 dar. Testwahrscheinlichkeiten, deren  $p$ -Werte  $> 0,05$  lagen, wurden als nicht signifikant (n.s.) markiert. Dies bedeutet, dass ein bestehender Zusammenhang statistisch nicht ausreichend belegt werden konnte.

Tabelle 7:

Werte für die Testwahrscheinlichkeit  $p$  bei Korrelation zwischen je zwei der gemessenen Zytokine für die Stimulationen mit den Schizontenantigenen Isolat-2 bzw. Isolat-1.

<b>Antigen bzw. Infektionsmodus</b>	<b>IL-10 / IL-12</b>	<b>IL-12 / IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>IFN-<math>\gamma</math> / IL-10</b>
Infektion Geburt	n. s.	n. s.	n. s.
<b>Isolat-1</b> Infektion Schwangerschaft	n. s.	n. s.	2
Keine Infektion	3	n. s.	< 0,0001
Infektion Geburt	n. s.	n. s.	n. s.
<b>Isolat-2</b> Infektion Schwangerschaft	n. s.	2	2
Keine Infektion	4	n. s.	4

Die **Korrelationskoeffizienten** spiegeln den linearen Zusammenhang der Zytokinwertepaare wieder. Sie geben Aufschluss darüber, ob die Produktion eines Zytokins mit der Bildung eines anderen Zytokins in Beziehung steht, und wie stark sich dieser Zusammenhang darstellt.

Die Auswertung ergab für alle  $r$ -Werte der unterschiedlichen Zytokinpaarungen unter Isolat-1- bzw. Isolat-2-Stimulation Beträge im positiven Bereich. Die Bildungen verschiedener hier untersuchter Zytokine sind miteinander **positiv korreliert**. Der Anstieg eines Zytokins hängt somit mit dem Anstieg der anderen beiden Zytokine zusammen. Eine negative Korrelation, bei der die Aus-

schüttung eines Zytokins die Ausschüttung eines anderen in zunehmendem Masse hemmt, trat nicht auf.

Zwischen dem Konzentrationsanstieg von IL-10 und IFN- $\gamma$  stellte sich für beide Antigene in den Gruppen mit Infektion in der Schwangerschaft und ohne Infektion eine signifikante Testwahrscheinlichkeit der Korrelationskoeffizienten dar. Es besteht also ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Bildung dieser beiden Zytokine nach Stimulation mit Schizontenantigenen.

Auch die Korrelation von IL-10 und IL-12 in der Gruppe ohne Infektion lieferte für beide Antigene signifikante Testwerte, was auf eine enge Verknüpfung der IL-10- und IL-12 Produktion schließen lässt.

Ein weiterer signifikanter Zusammenhang konnte nach Isolat-2-Stimulation in der IS-Gruppe für die Zytokine IL-12 und IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden.

Für Zellen aus Schwangerschaften mit Malariainfektion zum Geburtszeitpunkt allerdings ließen sich für beide Antigene der Zytokinpaarungen keine statistisch signifikanten Korrelationsergebnisse ermitteln.

Für die Stimulationen mit PPD, jedoch nicht mit PHA, ergaben sich überdies auch negative  $r$ -Werte bei Korrelation der Zytokine IL-10 und IFN- $\gamma$  in der IS- und KI-Gruppe, die sich allerdings als statistisch nicht signifikant erwiesen. Es scheint also eine Tendenz negativen Zusammenhangs für die Bildung dieser beiden Zytokine zu bestehen. Zudem zeigte die Wahrscheinlichkeitstestung signifikante  $p$ -Werte in der KI-Gruppe für die Kombination IL-10/IL-12 und in der IG-Gruppe für die Kombination IL-10/IFN- $\gamma$  unter PHA-Einfluss (Ergebnisse hier nicht dargestellt).

#### **4. Diskussion**

Ziel dieser Arbeit ist es, die nach Stimulation von CBMC aufgetretenen unterschiedlichen Reaktionsmuster der Immunsysteme Neugeborener zu vergleichen. **Monozytäre Zellen** mit ihrer Fähigkeit zur dem Infektionstyp angepassten Zytokinbildung und der daraus resultierenden **Schlüsselfunktion** für weitere immunologische Auswirkungen auf den Organismus wurden hierfür als repräsentative Marker des neonatalen Abwehrsystems herangezogen<sup>164,165</sup>.

Es ist bekannt, dass verschiedenste Faktoren modulierende Effekte auf Entwicklungsvorgänge innerhalb des Immunsystems haben. Exo- sowie endogene Einflussgrößen können bereits während der Schwangerschaft (intrauterin), sowie noch im frühen Kindesalter (extrauterin) modulierend und prägend auf das immunologische Basisreaktionsmuster eines Individuums einwirken. Auf diesem Grundwissen beruhen viele Modelle über das Entstehen von Allergien und Atopien bis hin zum durch frühkindliche Impfungen hervorgerufenen Immunschutz<sup>121,166-168</sup>.

In dieser Studie wurde als einwirkende Modulationsgröße die intrauterine Exposition des kindlichen Immunsystems zu Malariaantigenen bzw. dadurch ausgelösten immunologischen Veränderungen in Uterus und Plazenta aufgrund plazentarer Plasmodieninfektion herangezogen. Viele Studien aus diesem Bereich belegen, dass nicht nur direkte diaplazentare Infektionen des Fötus, sondern auch diaplazentares Übertreten plasmodienspezifischer Antigene gemeinsam mit durch Infektion hervorgerufene Ungleichgewichte im plazentaren Milieu Veränderungen im neonatalen Immungefüge hervorrufen können<sup>91,124,157</sup>.

Zur Bestimmung der Auswirkung einer Plazentainfektion auf das neonatale Immunsystem wurde in dieser Arbeit das zeitliche Auftreten intrauteriner Exposition zu Plasmodienantigenen als Hauptmerkmal auf die untersuchten Proben angewendet.

#### 4.1. Auswirkungen des Infektionsmodus auf die Immunantwort

Bereits die Einteilung der primigraviden Mütter und ihrer Neugeborenen in die drei Vergleichsgruppen (keine Infektion vs. Infektion in Schwangerschaft vs. Infektion der Plazenta bei Geburt) lieferte aufschlussreiche epidemiologische Daten (Tab.1). So ist ersichtlich, dass im endemischen Malariagebiet Gabuns jede primigravide Schwangere einem etwa 50%-igen Risiko ausgesetzt ist, während der Schwangerschaftsphase an einer Malaria zu erkranken. Die damit verbundenen möglichen Komplikationen für die mütterliche Gesundheit, sowie die des Ungeborenen (auch ohne dessen direkte Infektion) sind dementsprechend hoch<sup>169,170</sup>.

##### 4.1.1. Interpretation der Responderaktivität in den Gruppen

Die Responderhäufigkeiten dienen der Beurteilung des **Reife- bzw. Spezifitätsgrades** der Immunzellen, sowie als Parameter für eingetretenes **Proliferationsverhalten** *in vitro*. Da nicht nur die Qualität der Immunantwort, sondern auch das Ausmaß der Reaktionsstärke vom Entwicklungszustand der Zellen abhängt, lassen sich aus der Intensität des Antwortverhaltens zusätzliche Aussagen über die Funktionsfähigkeit des Immunsystems machen (siehe Tab. 3). Vorwegnehmend kann gesagt werden, dass sich in allen Infektionsgruppen bei beiden Isolaten die Responderraten nur in einem Häufigkeitsbereich von etwa 50-70 % aufhielten. Dies kann neben der Unreife der CBMC auch mit der unzureichenden Stimulationspotenz der Antigenlysate zusammen hängen, da Extrakte aus Schizontenlysaten im Vergleich zu lebenden Schizonten eine verringerte Stimulationspotenz gegenüber bestimmten Zellsubpopulationen (NK- und  $\gamma\delta$ -T-Zellen) zeigen<sup>171,172</sup>.

Neonatale Zellen, die hinsichtlich der Exposition gegenüber Plasmodienantigenen unerfahren sind (**KI**), zeigen ihre stärksten Antwortraten auf Stimulation mit Mitogen und Tuberkel-Antigen für alle drei der getesteten Zytokine. Das bei diesen Zellen besonders hohe Ansprechen für IL-10 hängt mit der bei

neonatalen Immunzellen beobachteten Tendenz zur Ausbildung einer T<sub>H</sub>2-Funktion in allen Phasen einer Immunreaktion zusammen<sup>123</sup>.

Das **quantitativ starke Ansprechen** der KI-Zellen auf Stimulation mit PHA und PPD im Vergleich zu CBMC anderer Kategorien hat seine Ursache in der vorausgegangenen ungehemmten Entwicklung und Proliferation dieser Zellen während der fötalen Reifeperiode in utero<sup>173</sup>. Diese Zellen haben hinsichtlich ihres Aktivitätspotentials offensichtliche Vorteile gegenüber den beiden anderen Untergruppen. Auch das Antwortverhalten nach Stimulation mit den Schizontenlysaten, obwohl um ein Vielfaches gedämpft, entspricht dennoch der bei allen Zellen gemessenen Aktivität. Dies lässt aber dennoch keine Rückschlüsse auf die Qualität der Immunantwort ziehen.

Bei CBMC, deren *in vivo* Kontakt zu Plasmodienantigenen gerade erst stattgefunden hatte (**IG**), lagen die Responderhäufigkeiten nur nach Stimulation mit PHA für T<sub>H</sub>1-stimulierenden Zellen äußerst hoch. Zusätzlich zeigten diese Zellen aber dennoch relativ starkes Ansprechen der IL-10-Produktion nach PPD-Stimulation, was auf ein **Anwachsen der Zahl IL-10-produzierender Zellen** im T<sub>H</sub>2-geprägten Milieu der infizierten Plazenta schließen lässt. Diese aktivierten T<sub>H</sub>2-vermittelnden Zellen scheinen über IL-10 die durch proinflammatorische Reize des PPD zur IFN- $\gamma$ -Produktion angeregten Zellen zu hemmen<sup>174</sup>.

Allerdings lässt sich dieser Anstieg in der T<sub>H</sub>2-Aktivität nicht nach Stimulation mit den Plasmodienisolaten feststellen. Insgesamt zeigt hier die Responderhäufigkeit bei beiden Lysaten für alle Zytokine die niedrigsten Raten. Das **ineffektive Ansprechen** der CBMC auf diese Reize kann mit der zum Schwangerschaftsende hin aufgetretenen Plazentainfektion zusammen hängen. Unterdrücktes Responderverhalten während akuter Infektion bei Stimulation mit strukturell ähnlichen Antigenen, jedoch normal hohe Raten nach Stimulation mit Mitogen oder Fremdartigen, konnte auch in anderen Studien beobachtet werden<sup>175,176</sup>.

Bei gleichen Bedingungen allerdings zeigen CBMC, die in der Vergangenheit einer Plasmodieninfektion der Plazenta ausgesetzt waren (**IS**), nach Stimulation mit Schizontenantigen gesteigertes Ansprechen und vermehrte Proliferation. Dieser **Reaktivierungseffekt** lässt sich besonders an dem Anstieg der Antwortraten in der IFN- $\gamma$ -Produktion bei beiden Isolaten, sowie in den Zunahmen der IL-12- und IL-10-produzierende Zellen bei Isolat-1 erkennen. Dieses Verhalten der CBMC von Individuen mit überstandener bzw. therapierter Malariainfektion wurde zudem auch in anderen Studien gefunden<sup>176,177</sup>. PHA und PPD lösen in dieser Gruppe ebenfalls massive Responderaktivität für IFN- $\gamma$  aus. Immunzellen dieser Neu-geborenen scheinen auf unterschiedliche Stimulationsreize hin mit vermehrter **Bereitstellung IFN- $\gamma$ -produzierender Zellen** zu reagieren. Dieser Anstieg IFN- $\gamma$ -bildender Zellpopulationen unter PPD-Einfluss ist allerdings eher ein Hinweis auf die stark ausgeprägte Entwicklungsreife dieser Zellen.

#### 4.1.2. Interpretation der Zytokinproduktion in den Gruppen

Die Verteilung der Konzentrationswerte innerhalb der Zytokinklassen (Diagramme 1-3) erlaubt Aussagen hinsichtlich der Funktionsrichtung des weiteren Verlaufs innerhalb der Immunkaskade. Anhand unterschiedlicher Produktionsausmaße eines Zytokins können Rückschlüsse auf die immunologische Prägung monozytärer Zellen dieser Untergruppe während ihres Reifeprozesses gezogen werden. Angenommen, dass unter Stimulation mit **PHA** jede Zelle ihre maximale Produktionskapazität anstrebt, Einschränkungen der Konzentrationsstärke aber als gegenseitige Hemmprozesse innerhalb der Zytokinproduktion bzw. als Unreife der CBMC aufgefasst werden kann, lassen sich anhand der gemessenen Konzentrationen Rückschlüsse auf den gegenwärtigen Funktionszustand des Immunsystems ziehen. Hingegen erlauben **PPD** und **Isolate** als immunologisch richtungsweisende Marker eher Aussagen über die Fähigkeit der Zellen, eine spezifisch ausgerichtete Immunantwort ausbilden zu können.

Vorwegnehmend sollte dennoch erwähnt werden, dass neonatale Lymphozyten, und speziell die des Nabelschnurblutes, im Vergleich zu Zellen des



Erwachsenen hinsichtlich ihrer Stimulierbarkeit durch Antigene, als auch ihrer jeweiligen Zytokinmuster, noch extrem reduziert sein können<sup>178</sup>. T-Zellen Neugeborener sind in der Lage ähnlich hohe Zytokinantworten für IFN- $\gamma$  und IL-2 zu produzieren, wenn kostimulierende Faktoren ausreichend zur Verfügung stehen – also in Abhängigkeit von AP-Zellen, T-Zell-Rezeptoren, stimulierenden Interleukinen, u.a.. Da diese Kofaktoren innerhalb des neonatalen Immunsystems noch relativ unterentwickelt zu sein scheinen, ergibt sich dadurch ein etwas verändertes Antwortverhalten nach Stimulation solcher T-Zellen<sup>171</sup>. Weiterhin scheint ein Mangel an Gedächtniszellen Einfluss auf die Aktivierungsstärke neonataler Immunzellen zu haben<sup>179</sup>.

#### 4.1.2.1. Interpretation der Zytokinproduktion nach Mitogenstimulation

Monozytäre Zellen, die bei Geburt einem Kontakt mit Plasmodienantigenen ausgesetzt waren (**IG**), weisen bei Mitogenstimulation *in vitro* eine **Zunahme der IL-10-Produktion** mit signifikanter **Abnahme der T<sub>H</sub>1-Zytokine** IL-12 und IFN- $\gamma$  auf. Eine akute Exposition zur Plasmodieninfektion der Plazenta scheint im kindlichen Immunsystem den Anteil IL-10-produzierender Zellen zu erhöhen und dadurch eine T<sub>H</sub>2-Typ-Verschiebung zu verursachen<sup>142</sup>. Von diesen nach unspezifischer Mitogenstimulation eingetretenen antiinflammatorischen Effekten kann angenommen werden, dass die Präsenz von Plasmodienantigenen und anderer immunologischer Mechanismen das neonatale Abwehrsystem im Rahmen der plazentaren Infektion beeinflusst hat. Ähnlich einer Helminthinfektion während der Schwangerschaft scheinen Plasmodien ebenfalls eine **T<sub>H</sub>2-Verschiebung des neonatalen Immunsystems** auszulösen<sup>180</sup>. Auch die ermittelten Testsignifikanzen zeigen eindeutig eine verringerte Zytokinbildung für IL-12 und IFN- $\gamma$  bei Zellen der IG-Gruppe im Vergleich zu Zellen ohne Plazentainfektion (in beiden Fällen) und im Vergleich zu früherer Infektion (nur bei IL-12). **Hemmung der T<sub>H</sub>1-Differenzierung** nach Mitogenstimulation durch plazentare Plasmodieninfektion wurde in ähnlicher Weise auch in anderen Studien beobachtet<sup>181</sup>.

Vergleicht man hierzu das T<sub>H</sub>-Profil PHA-stimulierter Zellen der beiden anderen Gruppen (KI bzw. IS), wird ein genau umgekehrtes Reaktionsverhalten erkennbar. Die starke IL-12- und IFN- $\gamma$ -Gewichtung im Antwortverhalten verdeutlicht die Verschiebung hin zum **proinflammatorischen Typ**. Untersuchungen an gesunden Neugeborenen belegen die physiologische Zunahme der T<sub>H</sub>1-Zellen gegen Ende der Schwangerschaft<sup>182,183</sup>. Diese natürliche Entwicklung scheint bei der IG-Gruppe durch den akuten Entzündungsprozess in der Spätschwangerschaft allerdings unterbrochen worden zu sein.

Zellen, die nie oder bereits früh in der Entwicklungsphase einer Malariainfektion ausgesetzt waren, wurden immunologisch dahin geprägt, bei maximaler Stimulierung durch Mitogen eine **T<sub>H</sub>1-gewichtete Basisreaktion** auszulösen. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit anderen Studien, die demonstrieren konnten, dass Antigenexposition *in utero* bei neonatalen Zellen nach spezifischer Stimulation zu einer gesteigerten entzündungssteigernden Reaktion führt<sup>184</sup>. Für CBMC, die einer Plazentainfektion mit Plasmodien ausgesetzt waren, ist diese Reaktion weitaus IL-12-betonter als bei Zellen, die ohne diesen Einfluss heranreifen. Solche Zellen dagegen zeigen einen Vorteil bei der Produktion von IFN- $\gamma$  gegenüber CBMC der IS-Gruppe. Die Fähigkeit ausreichend hohe IFN- $\gamma$ -Spiegel zu bilden, dient dem Aufbau eines protektiven, aber unspezifischen Immunschutzes und ist bei diesen Zellen Teil der angeborenen Immunabwehr<sup>185</sup>. Die unterschiedliche Zytokingewichtung erklärt sich also dadurch, dass CBMC ohne Infektion (**KI**) ein Ansteigen der **IFN- $\gamma$ -produzierenden Zellpopulationen** anstreben, während CBMC, die bereits einer Plasmodienexposition ausgesetzt waren (**IS**), vielmehr **IL-12** den Vorrang geben.

#### 4.1.2.2. Interpretation der Zytokinproduktion nach Stimulation mit PPD

PPD wurde als Antigen mit spezifischer Wirkung eingesetzt. Bei Individuen mit durchgemachter Tuberkuloseinfektion bzw. nach Impfung mit Bacillus-Calmette-Guérin (BCG) wird *in vitro* bei T-Lymphozytenstimulation ein spezifisches Reaktionsverhalten beobachtet. Dieses besteht aus einer Th1-Antwort mit Anstieg

von IFN- $\gamma$ <sup>186</sup>. Eine Auseinandersetzung des fötalen Organismus mit mykobakteriellen Antigenen *in utero* löst beim neonatalen Zellen eine starke Th1-Antwort aus<sup>187</sup>.

Die Zytokinwerte nach Stimulation mit dem Recall-Antigen PPD spiegeln die bereits erworbene Immunkompetenz der neonatalen CBMC wieder. Obwohl das Immunsystem Neugeborener nie direkt einer BCG-Impfung ausgesetzt war, scheint das Antigen dennoch zur Auslösung einer adäquaten Immunreaktion des T<sub>H</sub>1-Typs fähig zu sein. Eine **proinflammatorische Reaktion** (niedrige Level für IL-10 bei gleichzeitig hohen Werten für IL-12 und IFN- $\gamma$ ) auf dieses Antigen, das die Infektion mit intrazellulären Tuberkelbakterien simuliert, ist in allen drei Infektionsgruppen gleichermaßen zu beobachten<sup>188</sup>.

Neonatale Zellen sind also in der Lage, adäquat auf die Stimulation mit PPD zu reagieren. Eine immunologische Prägung hinsichtlich Vorhandenseins eventueller Plasmodieninfektionen spielt bei der Reaktivierung des Immunsystems durch PPD eher eine untergeordnete Rolle. PPD ist in seiner immunologischen Wirkung so spezifisch, dass auch die in Richtung T<sub>H</sub>2 veränderten Immunsysteme Neugeborener nach akuter Plazentainfektion (**IG**) eine primär T<sub>H</sub>1-getriebene Immunantwort ausbilden. Allerdings weisen diese Zellen weiterhin die niedrigsten Konzentrationen für IL-12 auf. **Senkung der IL-12-Spiegel**, hier ausgelöst durch eine Plazentainfektion spät in der Schwangerschaft, haben postnatal eindeutig negative Auswirkungen auf Auftretenswahrscheinlichkeit von und Erkrankungsrisiko gegenüber anderen Infektionskrankheiten<sup>189</sup>.

Verglichen dazu scheint aber Exposition gegenüber Plasmodienantigenen in der Spätschwangerschaft die Immunantwort Neugeborener nach PPD-Stimulation hinsichtlich der Bildung von IL-12 und IFN- $\gamma$  besonders stark zu beeinflussen. Während CBMC, die in der frühen Schwangerschaft (**IS**) oder niemals (**KI**) einer Plasmodieninfektion ausgesetzt waren, nach PPD-Stimulation mit einer stark **IL-12-geprägten Immunreaktion** antworten, scheint der gleiche Stimulus bei Nabelschnurzellen, die direkt vor Geburt einer plazentaren Infektion ausgesetzt waren (**IG**), eine eindeutig **IFN- $\gamma$ -geprägte Reaktion** auszulösen. Der PPD-Reiz scheint bei diesen Neugeborenen ein für eine Reaktivie-

rungsreaktion weitaus weniger typisches Antwortmuster auszubilden. Das starke Überwiegen von IFN- $\gamma$  gegenüber IL-12 in der T<sub>H</sub>1-geprägten Antwort zusammen mit hohen Konzentrationen entzündungshemmender Zytokine sind typisch für Immunzellen, die einer intrauterinen Infektion ausgesetzt waren<sup>127</sup>.

#### 4.1.2.3. Interpretation der Zytokinproduktion nach Isolat-Stimulation

Die Stimulation mit **Schizontenlysat** simuliert immunologische Vorgänge innerhalb des neonatalen Immunsystems im Rahmen einer akuten Infektion mit Plasmodienschizonten. Die Ergebnisse geben dadurch Einblick hinsichtlich des unterschiedlichen Verhaltens der drei Zellkategorien.

CBMC, die einer akuten Infektion der Plazenta zum Zeitpunkt der Geburt ausgesetzt waren (**IG**), zeigen ein relativ starkes Ansteigen der IL-10-Produktion. Dies spiegelt die eingetretene Prägung zum T<sub>H</sub>2-Typ auf diesen Stimulus wieder. Dies scheint eine Folge des physiologischen T<sub>H</sub>2-Umfelds der infizierten Plazenta zu sein<sup>142</sup>. Gleichzeitig bilden diese Zellen eine IFN- $\gamma$ -geprägte T<sub>H</sub>1-Antwort aus, wie durch Konzentrationsanstiege dieses Zytokins deutlich erkennbar wird. Die durch Schizontenantigen ausgelöste Immunreaktion in der IG-Gruppe ist deshalb **zweifach ausgerichtet** – einerseits die hohe IL-10-Ausschüttung aufgrund der T<sub>H</sub>2-Prägung *in utero*, andererseits die dem Erregertyp angepasste auf IFN- $\gamma$  beruhende T<sub>H</sub>1-Antwort. Diese Doppelläufigkeit stellt aber die wirkliche Effektivität einer solchen Immunreaktion in Frage, da IL-10 die Interaktion zwischen Dendritischen und spezifischen T-Zellen zu unterbinden scheint<sup>190</sup>. Studien belegen aber auch, dass ein gemeinsames Auftreten hoher Konzentrationen von IL-10 und IFN- $\gamma$  in engem Zusammenhang mit der Akutphasereaktion einer Malariainfektion steht. Die gemeinsame Ausschüttung stimulierender und hemmender Zytokine unterstreicht dadurch die multifaktoriellen Abläufe zwischen Parasit und Wirt während der akuten Infektionsphase<sup>191</sup>.

Dagegen zeigen CBMC solcher Kinder, die bereits früh einer plazentaren Plasmodieninfektion ausgesetzt waren (**IS**), ein gänzlich verschiedenes Antwortverhalten. Das Immunsystem dieser Neugeborenen wurde durch Stimulation mit Schizontenantigenen zu gesteigerter IL-12-Produktion angeregt. IL-12 als typisches proinflammatorisches Zytokin ist hinweisgebend für einen Befall mit intrazellulären Parasiten, da es in abhängig von IFN- $\gamma$  die Reaktivierung von Killer- und anderen zytotoxischen Zellen vermittelt. Seine Produktion scheint bei Zellen, die bereits einer Plasmodieninfektion ausgesetzt waren, auch am stärksten ausgeprägt zu sein, was den Charakter der **Reaktivierung spezifischer Immunmechanismen** zusätzlich unterstreicht. Zellen dieser Gruppe haben *in utero* offensichtlich gelernt, Schizontenantigene als gelerntes Fremdantigen zu erkennen und die folgende Immunantwort dementsprechend spezifisch auszurichten<sup>192</sup>.

Auffällig hier sind auch die verringerten Konzentrationswerte für IFN- $\gamma$  im Gegensatz zu den anderen Gruppen. Es wird oft auf den Zusammenhang zwischen **Ausprägung klinischer Symptome** und Konzentrationsabnahme proinflammatorischer Zytokine, speziell IFN- $\gamma$ , hingewiesen<sup>193</sup>. Dieses Phänomen – überwiegend bei Individuen anzutreffen, die durch häufige Reinfektionen einen immunologischen Schutz gegenüber schweren Malariaverläufen aufweisen – kann auch bei dieser Gruppe die Downregulation des IFN- $\gamma$  und dadurch die verringerte Krankheitsanfälligkeit erklären.

Monozytäre Zellen der Gruppe ohne vorausgegangene Infektion in der Schwangerschaft (**KI**) zeigen dagegen eine sehr **unspezifisch ausgerichtete Immunreaktion**. Auf Isolat-1 reagieren diese CBMC einerseits zwar mit einer gesteigerten IL-10-Produktion, andererseits aber auch mit einem Anstieg in der IFN- $\gamma$ -Bildung. Isolat-2 dagegen veranlasst die Zellen nur die Produktion von IL-12 zu steigern. Auch wenn die zugrundeliegenden Mechanismen dieses Antwortverhaltens zweideutig zu sein scheinen, zeigt der hier stattgefundenen erstmalige Kontakt dieser Zellen mit Plasmodienantigenen immerhin ein einerseits unspezifisches, aber auch stärker auf T<sub>H</sub>1-Abwehrmechanismen ausgerichtetes

Reaktionsverhalten. Dieses wenig differenzierte Bild naiver Zellen wurde auch in anderen Studien beobachtet<sup>194,195</sup>.

#### **4.2. Rückschlüsse aus dem Zytokinmuster auf die Art der Immunantwort**

Das Zusammenspiel verschiedener Zytokine bei Ausbildung einer Immunantwort bahnt die Aktivierung verschiedener Effektormechanismen. IL-12 und IFN- $\gamma$  lösen zusammen mit anderen Zytokinen, z.B. IL-2 und TNF- $\alpha$ , eine proinflammatorisch wirkende T<sub>H</sub>1-Antwort aus. Deren Effektormechanismen stellen die Steigerung der Zytotoxizität von Immunzellen und die Zunahme der Aktivität von Makrophagen dar und gehen mit Anstiegen der opsonierenden Antikörper IgM und IgG<sub>2</sub> auf humoraler Ebene einher. Das antiinflammatorische Bild der T<sub>H</sub>2-Antwort, ausgelöst durch IL-10, IL-4, und IL-5, ist dagegen geprägt durch ein vermehrtes Auftreten von Mastzellen, zunehmender Eosinophilie, sowie den immunregulatorischen Antikörpern IgE und IgG<sub>1+3</sub> als humoralen Markern<sup>196</sup>. Zusätzlich scheinen die durch IL-10 gesteuerten Subpopulationen regulatorischer T-Zellen über IL-10 und TGF- $\beta$  regulierend und supprimierend auf die entstehende Entzündungsreaktion einzuwirken<sup>106</sup>.

Ähnlich der Stimulation mit PPD, die zumindest bei geimpften Individuen eine eindeutige T<sub>H</sub>1-Reaktion auslöst, erwartet man auch bei Stimulation mit Schizontenantigenen eine stärker T<sub>H</sub>1-gewichtete Reaktion, die für die frühe und teilweise aber für die späte Phase des Krankheitsverlaufes charakteristisch ist. Da die T<sub>H</sub>2-Reaktion bei der Parasitenelimination keine wesentliche Rolle spielt, weil Schizontenantigene keine sonderlich dominante allergene bzw. extrazellulärparasitäre Potenz besitzen, treten *in vivo* unter Plasmodieneinfluss nur in der Frühphase der Infektion erhöhte Wirkkonzentrationen für IL-10 auf. Sie werden im Sinne gegenregulatorischer Maßnahmen zur Kontrolle einer überschüssigen T<sub>H</sub>1-Antwort verstanden und spielen bei der suffizienten Infektionskontrolle und der Ausprägung verschiedenster Symptomenkomplexe im Rahmen der Infektion eine wichtige Rolle<sup>197</sup>. Ein genau ausbalanciertes Ver-

hältnis von T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Mechanismen ist somit besonders bei Reinfektionen für den akuten, aber auch späteren Krankheitsverlauf ausschlaggebend.

#### 4.2.1. Einfluss der Lysat-Stimulantien auf die Zytokinbildung

Vor diesem Hintergrund kann anhand der Ergebnisse der Korrelationsvergleiche (Tabellen 4 bis 6) das Stimulationsprofil der hier verwendeten Schizontenlysate näher beurteilt werden.

Tabelle 4 zeigt für beide Isolat-Stimulantien einander entsprechende Zytokinprofile für alle Zellproben. Isolat-1 und -2 besitzen demnach ähnlich wirkendes antigenes Potential und lösen in den CBMC somit gleichartig gestaltete Immunreaktionen aus<sup>198</sup>. Das für die IL-12-Produktion bei Zellen nach akuter Plazentainfektion (IG) eingetretene Abweichen von diesem Muster beruht mitunter auf starken Schwankungen innerhalb der Konzentrationsverteilung der Einzelproben. Dies kann auf die unzureichende Stimulationspotenz des Isolat-2 in dieser Gruppe hindeuten. Da sonst bei beiden Isolaten eine auffällig enge Korrelation hinsichtlich der Effektivität zur Stimulation einer spezifischen Zytokinbildung deutlich wird, scheint Isolat-2 CBMC der IG-Gruppe hinsichtlich ihrer IL-12-Produktion eher insuffizient anzuregen. Diese Insuffizienz deutet auf ein **unkoordiniertes Zusammenwirken der Immunzellen** hin. Hierbei können verschieden Ursachen eine Rolle spielen – das akute Infektionsgeschehen *in utero*, äußere Umstände während der Geburt, sowie die allgemein geringere Neigung zur Produktion von IL-12 bei neonatalen Zellen<sup>181,199,200</sup>.

Die Korrelationsvergleiche zwischen Isolaten und PPD (Tab. 5 und 6) verdeutlichen einen den Isolaten eigenen Charakter zur Auslösung spezifischer IL-12-Bildung. Beide Isolate besitzen daher antigene Eigenschaften, die die CBMC eindeutig als spezifische durch Plasmodieninfektion hervorgerufene Fremdproteine erkennen können. Besonders für CBMC mit frühzeitiger Plazentainfektion (IS) scheinen Isolate-1 und -2 die **Funktion eines Recall-Antigens** zu haben, das die Zellen verstärkt zur Bildung von T<sub>H</sub>1-Zytokinen

veranlasst. Da IL-12 innerhalb des Immunsystems speziell für die Reaktivierung früher erworbener Resistenzmechanismen gegenüber bekannten Antigenen verantwortlich ist, kommt dies hier nach Stimulation dieser vorgeprägten Zellen mit Schizontenisolaten deutlich zum Ausdruck<sup>201</sup>.

Eine weitere derartige Übereinstimmung tritt in der IS-Gruppe für die Bildung von IFN- $\gamma$  in Zusammenhang mit PPD-/Isolat-2-Stimulation auf. Auch hier zeigt sich der Charakter einer **Immunreaktivierung**. IL-12 ist in seiner Wirkung IFN- $\gamma$ -abhängig, wodurch das gebildete IFN- $\gamma$  einer Schlüsselfunktion in der T<sub>H</sub>1-Reaktivierungskaskade nachkommt<sup>202</sup>. Dies wird durch das Korrelieren hoher IL-12-Spiegel mit der Produktion von IFN- $\gamma$  sowohl nach PPD-, wie auch Isolat-Stimulation, deutlich.

Auch Zellen, die bei Geburt einer Plazentainfektion mit Plasmodien ausgesetzt waren (IG), weisen eine starke Korrelation der IFN- $\gamma$ -Bildung nach Stimulation mit PPD bzw. Isolat-2 auf. Allerdings ist bei diesen Zellen kein Zusammenhang mit einer stark ausgelösten IL-12-Produktion zu erkennen. CBMC, deren Erstkontakt mit Plasmodienantigenen erst spät in der Schwangerschaft stattfand, können nach Stimulation mit Schizontenantigenen kein spezifisches IL-12-geprägtes Reaktivierungsmuster ausbilden. Es entsteht vielmehr ein noch **eingeschränkt wirkender T<sub>H</sub>1-Mechanismus**, der gänzlich auf einer gesteigerten Bildung von IFN- $\gamma$  beruht<sup>203</sup>.

Solch ein eingeschränkter T<sub>H</sub>1-Mechanismus ist bei diesen Zellen ebenfalls nach Stimulation mit PPD erkennbar. Eine in der Fötalzeit erst spät aufgetretene Infektion der Plazenta mit Malariaerregern scheint bei diesen CBMC auch die Ausbildung adäquater Immunverhalten gegenüber anderen bekannten Antigenen zu beeinflussen.

#### 4.2.2 Interpretation der verschiedenen Zytokinbildungsprofile

Die Unterteilung der drei CBMC-Untergruppen hinsichtlich dem Zeitpunkt ihrer *in utero* erfolgten Infektion der Plazenta, zeigt eindeutige Unterschiede



hinsichtlich des Infektionsmodus aufgrund der nach Stimulation durch verschiedene Antigene erhaltenen Zytokinprofile.

Eine **IL-12-dominierte Immunantwort** ließ sich bei Zellen, die früh in der Schwangerschaft einer plazentaren Malariainfektion ausgesetzt waren (IS), nach Stimulation mit jedem der Antigene (Mitogen, proinflammatorisches Antigen, sowie den beiden Lysaten) nachweisen. Besonders für die Isolat-Stimulationen schien das fötale Immunsystem bei vorausgegangener Exposition dahin geprägt worden zu sein, durch Simulation einer Reinfektion Mechanismen einer spezifischen T<sub>H</sub>1-Antwort nach sich zu ziehen<sup>193</sup>.

Überdies verdeutlichen die Responderraten zusammen mit den Korrelationsergebnissen den starken **Zusammenhang zwischen IL-12 und IFN- $\gamma$**  bei Zellen dieser Gruppe. Effiziente IL-12-Produktion und der daraus folgender Anstieg des IFN- $\gamma$  durch Aktivierung von Makrophagen und spezifischen NK-Zellen kann nur durch das Zusammenspiel adäquater Konzentrationen beider Zytokine zustande kommen<sup>204,205</sup>. Allerdings kann eine Zunahme der durch IL-12 ausgelösten IFN- $\gamma$ -Wirkung auch nachteilige Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf haben. Bei der Auslösung vieler Symptombilder, die im Rahmen einer Plasmodieninfektion eintreten können (Leberschädigung, Immunsuppression, zerebrale Malaria) spielt IFN- $\gamma$  nämlich eine Schlüsselrolle<sup>206</sup>. Während hohe Spiegel proinflammatorischer Zytokine das Krankheitsbild erschweren, scheinen dagegen moderate Konzentrationen von IL-12, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  das Auftreten klinischer Symptome sogar abwenden zu können<sup>207,208</sup>.

Zusätzlich deuten die Korrelationsvergleiche verschiedener Zytokine (Tab. 7) nach Isolat-Stimulation bei CBMC der IS-Gruppe auf einen **Zusammenhang zwischen der Bildung von IL-10 und IFN- $\gamma$**  hin. Aufgabe dieser beiden gegensätzlichen Zytokine ist die Unterdrückung der jeweils anderen Immunantwort<sup>204,205</sup>. Nur ein optimales Gleichgewicht zwischen T<sub>H</sub>1-fördernder Wirkung des IFN- $\gamma$  und T<sub>H</sub>1-hemmender Wirkung des IL-10 kann eine effektive,

nicht einseitig überschüssende proinflammatorische Immunreaktion ohne schwere Krankheitssymptomatik aus-bilden<sup>209</sup>.

Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, dass die Immunsysteme Neugeborener, deren Mütter während der Schwangerschaft an einer Malariainfektion litten, diesen spezifischen Abwehrmechanismus auch *in vivo* auszulösen vermögen. Diese Kinder werden auch in den ersten Lebensmonaten nach Geburt weiterhin in der Lage sein, eine erneute Infektion mit Plasmodien durch diese spezifisch auf intrazelluläre Parasiten ausgerichtete Immunabwehr kontrollieren zu können. Dadurch wird bei diesen Kindern der Übergang einer unkomplizierten Malariaerkrankung zu schwerem Krankheitsverlauf verhindert werden<sup>210</sup>. Durch die relativ frühe Auseinandersetzung mit Plasmodienantigenen im Rahmen der fötalen Entwicklung des Immunsystems haben diese Kinder einen Vorteil gegenüber anderen Neugeborenen, was das Erkrankungsrisiko gegenüber Malaria angeht.

Auch Nabelschnurzellen, die während der Schwangerschaft keiner Infektion ausgesetzt waren (KI), zeigen in ihrem Zytokinbildungsprofil einen Zusammenhang zwischen IL-12 bzw. IFN- $\gamma$  einerseits und IL-10 andererseits (Tab. 7). Obwohl bei der Immunantwort dieser Zellen weder die Produktion von IL-12 noch die von IFN- $\gamma$  eindeutig im Vordergrund zu stehen scheint, ist im Gesamtprofil dennoch eine deutliche **T<sub>H</sub>1-Gewichtung** zu erkennen<sup>193</sup>. Diese Kombination aus IL-12 und IFN- $\gamma$  wird auch bei nichtimmunen Individuen während des akuten Infektionsgeschehens beobachtet und als Teil der angeborenen Infektabwehr verstanden<sup>211</sup>.

Die hier untersuchten Immunzellen nichtimmuner Neugeborener besitzen daher ausreichend Reife, um dem Erreger eine adäquate T<sub>H</sub>1-Antwort gegenüberstellen zu können. Dennoch scheint die Intensität dieser Antwort bei beiden Isolaten nicht einheitlich ausgebildet zu sein. Während Isolat-1 die Bildung von IFN- $\gamma$  in stärkerem Maße auszulösen scheint, treibt Isolat-2 eher die IL-12-Produktion der Zellen an. Isolat-1 scheint zudem stärker auf die Ausschüttung von IL-10 einzuwirken, während Isolat-2 diese Eigenschaft weniger zeigt. Dennoch weist die positive Korrelation zwischen gebildetem IL-10 und IL-12

bzw. IFN- $\gamma$  darauf hin, dass diese nichtimmunen Zellen – entsprechend dem Immunsystem nichtimmuner Kinder – auf die simulierte Plasmodieninfektion mit Verminderung der IL-12- bei gleichzeitiger Erhöhung der IL-10-Aktivität reagieren<sup>208</sup>. Der Unterschied zur IS-Gruppe scheint daher nur zu sein, dass bei der T<sub>H</sub>1-Antwort der KI-Zellen das individuelle **Gleichgewicht zwischen fördernden und hemmenden Impulsen** (Hemmung hoher IL-12-Spiegel durch Anstiege des IL-10) viel stärker zum Ausdruck kommt.<sup>212</sup>

Obwohl Kinder, deren Immunsystem während der Entwicklungsphase keinem Kontakt mit Malariaantigenen ausgesetzt war, keine spezifisch auf Plasmodienantigene ausgerichteten Abwehrmechanismen aufweisen, zeichnen sie sich dennoch durch eine sonst unbeeinträchtigte Immunkompetenz aus. Die gegenüber Plasmodien unerfahrenen Immunzellen scheinen dahin entwickelt zu sein, nach Kontakt dem Erreger eine gegen ihn gerichtete unspezifische T<sub>H</sub>1-Reaktion entgegenstellen zu können. Diese Immunantwort unterscheidet sich somit nicht grundlegend von Abwehrreaktionen, die bei nichtimmunen Individuen zu erwarten wären. Dennoch haben diese Kinder den Vorteil, vor schweren Krankheitsverläufen während der ersten Lebensmonate durch den von der Mutter übertragenen humoralen Immunschutz geschützt zu sein. Ihr Abwehrsystem kann sich somit im Verlauf der nächsten Monate bzw. Jahre, ohne einer früheren Beeinträchtigung des Immunsystems ausgesetzt gewesen zu sein, auf rezidivierende Infektionen mit Plasmodien einstellen. Dennoch kann die Schwere des Erkrankungsbildes je nach Art des Gleichgewichts zwischen pro- und antiinflammatorischen Komponenten unterschiedlich stark ausfallen.

CBMC, die noch gegen Ende der Schwangerschaft einer Infektion der Plazenta ausgesetzt waren (IG), liefern für die beiden Isolate **Anstiege der IFN- $\gamma$ -Konzentration**. Dies unterstreicht den T<sub>H</sub>1-Charakter der in diesen Zellen ausgelösten Immunreaktion. Allerdings zeigen diese Zellen auch starke **Anstiege bei IL-10**, während IL-12 nur minimal und eher ungleichmäßig ausgeschüttet wird. Zytokinuntersuchungen ohne vorherige Stimulation an CBMC zeigten sogar, dass neonatale Zellen auf perinatal eingetretene intrauterine Infektionen allgemein mit Anstiegen der IFN- $\gamma$ - und IL-4-Produktion reagieren<sup>127</sup>.

Einerseits führt also der fehlende Reaktivierungscharakter dieser Stimulantien bei diesen Zellen zu mangelnder IL-12-Bildung. Andererseits steht die gesteigerte IL-10-Antwort für den Versuch, die Ausbildung einer zu starken T<sub>H</sub>1-Reaktion effektiv hemmen zu wollen. Dieses zweideutige Antwortprofil reflektiert die intrauterine Prägung des Immunsystems mit Hemmung der T<sub>H</sub>1-Differenzierung<sup>181</sup>. *In utero* standen die CBMC unter dem Einfluss des plazentaren Immunmilieus, das darauf bedacht war, zum Schutze des Fötus und zum Erhalt der Schwangerschaft jede **überschiessende T<sub>H</sub>1-Aktivität zu unterdrücken**. Während des akuten Infektionsgeschehens an der Plazenta-schranke, hatten die CBMC ihren ersten Kontakt mit Plasmodienantigenen und wurden durch die entzündungshemmende Umgebung dahin geprägt, starke T<sub>H</sub>1-gewichtete Immunreaktionen zu unterdrücken. Dieses Verhalten lässt sich auch bei anderen Antigenen bzw. Allergenen, die diaplazentar auf das Ungeborene übertragbar sind, nachweisen<sup>168</sup>. Studien haben ergeben, dass dieses Entzündungsbild (Vorherrschen einer antiinflammatorischen Immunantwort mit gesteigerter IFN- $\gamma$ -Konzentrationen und unterdrückter IL-12-Bildung) zusammen mit der Ausbildung schwerer Malariasymptome (Hyperparasitämie, zerebrale Malaria, fataler Krankheitsausgang) einhergeht<sup>136,213,214</sup>.

Es ist deshalb anzunehmen, dass diese Neugeborenen noch während der nächsten Lebensjahre im Falle einer erneuten Malariaerkrankung diesen Folgen der antiinflammatorischen Immunabwehr ausgesetzt sein werden<sup>189</sup>. Dadurch erklärt sich das Auftreten schwerer Malariaformen bei Neugeborenen, die in der späten Schwangerschaftsphase einer Infektion der Mutter ausgesetzt waren, weil diese Kinder bis zur vollständigen Ausreifung ihres Immunsystems Plasmodieninfektionen mit unterdrückten T<sub>H</sub>1-Mechanismen begegnen. Die Prägung der Immunzellen am Ende der Schwangerschaft mit dem Ziel, das Ungeborene zu schützen, erhöht bei diesen Kindern postnatal das Erkrankungsrisiko für Malaria sowie die Ausbildung einer schweren Krankheitssymptomatik<sup>157</sup>.

Zusätzlich wird bei diesen Föten beobachtet, dass Anstiege in der IL-10-Bildung gegen Ende der Schwangerschaft in engem Zusammenhang mit dem Auftreten von Frühgeburten stehen<sup>215</sup>. Dadurch kann eine intrauterine Malariainfektion

auch über immunologische Vorgänge nachhaltig Einfluss auf die Schwangerschaftsdauer ausüben.

## 5. Zusammenfassung

Zusammenfassend kann eine klare Beeinflussung des neonatalen Immunhaushaltes durch akute Infektionen der Plazenta mit *P. falciparum* festgestellt werden. Je nach zeitlichem Auftreten einer solchen Infektion während des Schwangerschaftsverlaufes zeigen sich unterschiedliche Auswirkungen auf das kindliche Immunsystem.

Ein plazentarer Plasmodienbefall mit ausreichend zeitlichem Abstand zum Entbindungstermin birgt hinsichtlich des immunologischen Aspekts Vorteile für das Neugeborene nach Geburt. Das kindliche Immunsystem scheint bereits in der frühen Schwangerschaft in der Lage zu sein, Gedächtnisfunktionen auszubilden, die bei späterer Neuinfektion effektiv reaktiviert werden können. Dies beeinflusst in starkem Maße die Differenzierung neonataler T-Lymphozyten zum T<sub>H</sub>1-Typ, was bei Neugeborenen und Kleinkindern ausschlaggebend hinsichtlich dem Schutz gegenüber Infektionskrankheiten ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern Hinweise auf die Ausbildung malariaspezifischer Gedächtnisfunktionen *in utero*. Stärkeres Antwortverhalten insbesondere für IL-12 und IFN- $\gamma$  bei Neugeborenen deren Mütter während der Schwangerschaft eine Malariainfektion durchliefen, lässt sich eindeutig auf eine Auseinandersetzung des fötalen Immunsystems mit diaplazentar übertragenen *P. falciparum*-Antigenen zurückführen. Dieser Schutz äußert sich unter anderem in einer gesenkten Anfälligkeit gegenüber schweren symptomatischen Verläufen späterer Malariaerkrankungen im Kleinkindesalter.

Tritt die Auseinandersetzung des Immunsystems mit einer plazentaren *P. falciparum*-Infektion allerdings erst in einem weiter fortgeschrittenen Stadium der Schwangerschaft auf, scheint die kindliche Immunabwehr in ihrem Antwortverhalten durch das dominante Immunmilieu der Plazenta zu stark beeinflusst zu werden. Um Schwangerschaft gefährdende Mechanismen zu unterdrücken, werden auch die kindlichen T-Lymphozyten dahin geprägt, keine proinflammatorischen Immunreaktionen auszubilden, sondern diese vielmehr durch aktive Steigerung des T<sub>H</sub>2-Typs zu unterbinden. Dies verhindert die Ausbildung effektiver immunologischer Gedächtnisfunktionen und veranlasst

den kindlichen Organismus auch noch nach Geburt proinflammatorische Antwortverhalten durch eine gesteigerte IL-10-Produktion zu unterdrücken. Die primär beabsichtigte Unterbindung einer vorzeitigen Schwangerschaftsbeendigung wird dadurch allerdings durch das Auftreten gesteigerter IL-10-Konzentrationen, sowie durch direkte Auswirkungen der unkontrollierbaren Plasmodienausbreitung innerhalb der Plazenta in eine Zunahme der Frühgeburtlichkeit umgekehrt.

Mit dieser Arbeit konnte zudem aber auch gezeigt werden, dass Neugeborene, die während der Schwangerschaft keiner Plasmodieninfektion ausgesetzt waren, einen nur unvollständigen effektiven Immunschutz gegenüber postnatalen Malariainfektionen besitzen. Ihr Immunsystem hängt dadurch in viel stärkerem Masse als bei Kindern mit bereits entwickelter immunologischer Gedächtnisfunktion gegenüber *P. falciparum* vom Nestschutz mütterlicher Immunglobuline ab.

Prospektive Studien bei Kleinkindern in der der Geburt folgenden Lebensphase könnten deshalb weiterhin hilfreiche Informationen über das Ausmaß des Effektes intrauterin erworbener immunologischer Gedächtnisfunktionen Neugeborener liefern. Somit könnte untersucht werden, ob es sich bei der Reaktivierung einer Immunantwort nur um eine kurzfristige und damit unzulängliche Anpassung des kindlichen Immunsystems an intrauterine Vorgänge handelt, oder ob sich die spezifische T<sub>H</sub>1-Verlagerung etwa längerfristig auf die ersten Lebensmonate erstreckt. Diese frühe Ausbildung spezifischer Gedächtnisfunktionen hätte somit nämlich auch Auswirkungen auf das Verhalten des kindlichen Immunsystems gegenüber anderen intrazellulären Krankheitserregern und darüber hinaus auch auf verschiedenste im frühen Kindesalter einsetzbare Impfvakzine, sowie auf den Versuch, diese bereits pränatal dem fötalen Immunsystem präsentieren zu können.





## 6. Verwendete Materialien

Die Analysen und Laborarbeiten zu dieser Arbeit wurden im Forschungslabor des Albert-Schweitzer-Hospitals in Lambaréné, Gabun, durchgeführt.

Alle verwendeten Materialien und Reagenzien wurden den Herstellerangaben entsprechend transportiert (bei Bedarf in Kühlboxen bzw. auf Trockeneis) und entsprechend gelagert (je nach Bedarf bei Raumtemperatur, im Kühlschrank bzw. in der Tiefkühltruhe).

### Gewinnung der Blutproben und Bestimmung der Parasitämie:

Heparin Monovetten® (9 ml)	Sarstedt, Deutschland
Kanülen (20G, 21G)	Sarstedt, Deutschland
Butterfly-Kanülen (21G), Adapter	R. Langenbrinck, Deutschland
Objekträger	Sigma Diagnostics, USA
Giemsa-Färbelösung	Merck, Deutschland
Titrisolphosphatpuffer (pH 7,2)	Roth, Deutschland
Einkanal-Pipetten	Sarstedt, Deutschland
Pipettenspitzen (gelb, blau)	Zeiss, Deutschland
Lichtmikroskop	Safeskin, Deutschland
Latex-Untersuchungshandschuhe	

Sarstedt, Deutschland

### Gewinnung der CBMC:

Serologische Pipetten (5ml,10ml,25ml)	
Automatische Pipettierhilfe	Sarstedt, Deutschland
LeucoSep®-Röhrchen (15ml, 50ml)	Sarstedt, Deutschland
Ficoll-Paque™	Greiner, Deutschland
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Amersham Biosciences, Deutschland
Sterilfilter	Sigma-Aldrich, Deutschland
Zentrifugationsröhrchen (15ml, 50ml)	Milipore, Frankreich
Sterile Arbeitsbank	Falcon, USA
Zentrifuge	Heraeus Beckmann

### Bestimmung der Zellzahl:

RPMI-1640-Medium	Sigma-Aldrich, Deutschland
HEPES-Puffer	PAA, Deutschland
Humanes AB-Serum	GIBCO, Deutschland
L-Glutamin (200mM)	GIBCO, Deutschland
Gentamycinlösung (10mg/ml)	Hoechst, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Merck, Deutschland
Türk-Färbelösung	
Sigma-Aldrich, Deutschland	

### Zellkultivation und Stimulation:

Sterile Costar-96-Loch-Zellkulturplatte mit Rundböden	Integra Biosciences
PHA (5ng/ml)	Sigma-Aldrich, Deutschland
PPD	Sigma-Aldrich, Deutschland
Multikanalpipette	Eppendorf
Tiefkühltruhe (-80 °C)	Revco

### ELISA:

Mikrotiter Immunoassay-Platten	Dynex-Technologies
ELISA-Kit Flexia™ (IL-10, IL-12p40, IFN- $\gamma$ )	Biosource
BSA (Bovine Serum Albumine)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Tween 20-Puffer	Sigma-Aldrich, Deutschland
TMB (Tetramethyl-Benzidin)-Peroxidase-Substratlösung	Biosource
Phosphorsäure	Merck, Deutschland
ELISA-Reader Mikrotek MPP 4008	Dunn

## 6. Literaturverzeichnis und Quellenangaben

1. Robert-Koch-Institut (2000). Merkblätter für Ärzte - Malaria. *Epidemiologisches Bulletin* **20**
2. National-Institute-of-Allergies-and-Infectious-Diseases. Malaria. Vol. NIH Publication No. 02-7139 (ed. U.S.-Department-of-Health-and-Human-Service) (National Institutes of Health, 2002).
3. Wilson, R.J. (1990). Biochemistry of red cell invasion. *Blood Cells* **16**, 237-52.
4. Holder, A.A. & Langborne, J. *Malaria*, 1658-1663 (Academic Press, San Diego, 1998).
5. WHO. State of the art of new vaccines: research and development. (World Health Organisation, 2005).
6. WHO. Malaria - Disease Information. (World Health Organisation, 2004).
7. Snow, R.W. & Marsh, K. (2002). The consequences of reducing transmission of *Plasmodium falciparum* in Africa. *Adv Parasitol* **52**, 235-64.
8. MARA/ARMA. Distribution of endemic malaria. (MARA/ARMA collaboration (Mapping Malaria Risk in Africa), 2002).
9. WHO. Malaria in pregnancy. in *Roll Back Malaria* (2002).
10. Ayisi, J.G., van Eijk, A.M., Newman, R.D., ter Kuile, F.O., Shi, Y.P., Yang, C., Kolczak, M.S., Otieno, J.A., Misore, A.O., Kager, P.A., Lal, R.B., Steketee, R.W. & Nahlen, B.L. (2004). Maternal malaria and perinatal HIV transmission, western Kenya. *Emerg Infect Dis* **10**, 643-52.
11. Cohen, J. (2003). Epidemiology. Mother's malaria appears to enhance spread of AIDS virus. *Science* **302**, 1311.
12. Ignatius, R. & Janitschke, K. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, (Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2000).
13. Greenwood, B.M. (1997). The epidemiology of malaria. *Ann Trop Med Parasitol* **91**, 763-9.
14. Artavanis-Tsakonas, K., Tongren, J.E. & Riley, E.M. (2003). The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin Exp Immunol* **133**, 145-52.
15. Nielsen, M.A., Staalsoe, T., Kurtzhals, J.A., Goka, B.Q., Doodoo, D., Alifrangis, M., Theander, T.G., Akanmori, B.D. & Hviid, L. (2002). *Plasmodium falciparum* variant surface antigen expression varies between isolates causing severe and nonsevere malaria and is modified by acquired immunity. *J Immunol* **168**, 3444-50.
16. Dobi, S. & Ali, A. (2002). [Malaria of native Africans after returning home from European residence]. *Orv Hetil* **143**, 2043-5.

17. Ranawaka, M.B., Munasinghe, Y.D., de Silva, D.M., Carter, R. & Mendis, K.N. (1988). Boosting of transmission-blocking immunity during natural *Plasmodium vivax* infections in humans depends upon frequent reinfection. *Infect Immun* **56**, 1820-4.
18. Harrison, N.E., Odunukwe, N.N., Ijoma, C.K. & Mafe, A.G. (2004). Current clinical presentation of malaria in Enugu, Nigeria. *Niger Postgrad Med J* **11**, 240-5.
19. Kwiatkowski, D. & Nowak, M. (1991). Periodic and chaotic host-parasite interactions in human malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5111-3.
20. Satpathy, S.K., Mohanty, N., Nanda, P. & Samal, G. (2004). Severe falciparum malaria. *Indian J Pediatr* **71**, 133-5.
21. Leder, K., Black, J., O'Brien, D., Greenwood, Z., Kain, K.C., Schwartz, E., Brown, G. & Torresi, J. (2004). Malaria in travelers: a review of the GeoSentinel surveillance network. *Clin Infect Dis* **39**, 1104-12.
22. Rogeaux, O. (1992). [Severe malaria]. *Dev Sante*, 4-9.
23. Blumberg, L., Lee, R.P., Lipman, J. & Beards, S. (1996). Predictors of mortality in severe malaria: a two year experience in a non-endemic area. *Anaesth Intensive Care* **24**, 217-23.
24. Marsden, P.D. & Bruce-Chwatt, L.J. (1975). Cerebral Malaria. *Contemp Neurol Ser* **12**, 29-44.
25. Warrell, D.A. (1997). Cerebral malaria: clinical features, pathophysiology and treatment. *Ann Trop Med Parasitol* **91**, 875-84.
26. Phillips, R.E. & Pasvol, G. (1992). Anaemia of *Plasmodium falciparum* malaria. *Baillieres Clin Haematol* **5**, 315-30.
27. Sowunmi, A., Walker, O. & Salako, L.A. (1992). Hyperparasitaemia: not a reliable indicator of severity or poor prognosis in falciparum malaria in children in endemic African countries. *Ann Trop Paediatr* **12**, 155-8.
28. Shulman, C.E. & Dorman, E.K. (2003). Importance and prevention of malaria in pregnancy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **97**, 30-5.
29. Fleming, A.F., Ghatoura, G.B., Harrison, K.A., Briggs, N.D. & Dunn, D.T. (1986). The prevention of anaemia in pregnancy in primigravidae in the guinea savanna of Nigeria. *Ann Trop Med Parasitol* **80**, 211-33.
30. Brabin, B. The risks and severity of malaria in pregnant women. in *Applied Field Research in Malaria Reports No. 1*. (ed. WHO) (UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), Geneva, 1991).
31. Verhoeff, F.H., Brabin, B.J., van Buuren, S., Chimsuku, L., Kazembe, P., Wit, J.M. & Broadhead, R.L. (2001). An analysis of intra-uterine growth retardation in rural Malawi. *Eur J Clin Nutr* **55**, 682-9.
32. Kaushik, A., Sharma, V.K., Sadhana & Kumar, R. (1992). Malarial placental infection and low birth weight babies. *J Commun Dis* **24**, 65-9.

33. Steketee, R.W., Nahlen, B.L., Parise, M.E. & Menendez, C. (2001). The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. *Am J Trop Med Hyg* **64**, 28-35.
34. Martinez-Espinosa, F.E., Daniel-Ribeiro, C.T. & Alecrim, W.D. (2004). Malaria during pregnancy in a reference centre from the Brazilian Amazon: unexpected increase in the frequency of Plasmodium falciparum infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **99**, 19-21.
35. Perlmann, P. & Troye-Blomberg, M. (2000). Malaria blood-stage infection and its control by the immune system. *Folia Biol (Praha)* **46**, 210-8.
36. Maitra, N., Joshi, M. & Hazra, M. (1993). Maternal manifestations of malaria in pregnancy: a review. *Indian J Matern Child Health* **4**, 98-101.
37. Brabin, B.J. (1983). An analysis of malaria in pregnancy in Africa. *Bull World Health Organ* **61**, 1005-16.
38. McGregor, I.A. (1987). Thoughts on malaria in pregnancy with consideration of some factors which influence remedial strategies. *Parassitologia* **29**, 153-63.
39. Hennequin, C. & Bouree, P. (1991). [Malaria of the pregnant woman and the newborn]. *Bull Soc Pathol Exot* **84**, 465-70.
40. Kochar, D.K., Thanvi, I., Joshi, A., Subhakaran, Aseri, S. & Kumawat, B.L. (1998). Falciparum malaria and pregnancy. *Indian J Malariol* **35**, 123-30.
41. Fried, M., Nosten, F., Brockman, A., Brabin, B.J. & Duffy, P.E. (1998). Maternal antibodies block malaria. *Nature* **395**, 851-2.
42. Diagne, N., Rogier, C., Cisse, B. & Trape, J.F. (1997). Incidence of clinical malaria in pregnant women exposed to intense perennial transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **91**, 166-70.
43. Okoko, B.J., Enwere, G. & Ota, M.O. (2003). The epidemiology and consequences of maternal malaria: a review of immunological basis. *Acta Trop* **87**, 193-205.
44. Kothare, S.V., Kallapur, S.G., Irani, S.F., Prabhu, S.B., Gangal, P.S. & Agarwal, G.J. (1987). Congenital malaria (a report of 2 cases). *J Postgrad Med* **33**, 158-61.
45. Zenz, W., Trop, M., Kollaritsch, H. & Reinthaler, F. (2000). Congenital malaria due to Plasmodium falciparum and Plasmodium malariae. *Wien Klin Wochenschrift* **112**, 459-61.
46. Hindi, R.D. & Azimi, P.H. (1980). Congenital malaria due to Plasmodium falciparum. *Pediatrics* **66**, 977-9.
47. Thomas, V. & Chit, C.W. (1980). A case of congenital malaria in Malaysia with IgM malaria antibodies. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **74**, 73-6.
48. Sehgal, V.M., Siddjiqui, W.A. & Alpers, M.P. (1989). A seroepidemiological study to evaluate the role of passive maternal immunity to malaria in infants. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **83 Suppl**, 105-6.

49. Nardin, E.H., Nussenzweig, R.S., Bryan, J.H. & McGregor, I.A. (1981). Congenital transfer of antibodies against malarial sporozoites detected in Gambian infants. *Am J Trop Med Hyg* **30**, 1159-63.
50. Hesran, J.Y.L., Cot, M., Personne, P., Fievet, N., Dubois, B., Beyeme, M., Boudin, C. & Deloron, P. (1997). Maternal placental infection with *Plasmodium falciparum* and malaria morbidity during the first 2 years of life. *Am J Epidemiol* **146**, 826-31.
51. Romand, S., Bouree, P., Gelez, J., Bader-Meunier, B., Bisaro, F. & Dommergues, J.P. (1994). Congenital malaria. A case observed in twins born to an asymptomatic mother. *Presse Med* **23**, 797-800.
52. Ibhanebhor, S.E. (1995). Clinical characteristics of neonatal malaria. *J Trop Pediatr* **41**, 330-3.
53. Sexton, A.C., Good, R.T., Hansen, D.S., D'Ombrian, M.C., Buckingham, L., Simpson, K. & Schofield, L. (2004). Transcriptional profiling reveals suppressed erythropoiesis, up-regulated glycolysis, and interferon-associated responses in murine malaria. *J Infect Dis* **189**, 1245-56.
54. Boutlis, C.S., Gowda, D.C., Naik, R.S., Maguire, G.P., Mgone, C.S., Bockarie, M.J., Lagog, M., Ibam, E., Lorry, K. & Anstey, N.M. (2002). Antibodies to *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositols: inverse association with tolerance of parasitemia in Papua New Guinean children and adults. *Infect Immun* **70**, 5052-7.
55. Groeneveld, A.B., Bossink, A.W., van Mierlo, G.J. & Hack, C.E. (2001). Circulating inflammatory mediators in patients with fever: predicting bloodstream infection. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**, 1189-95.
56. Clark, I.A., Virelizier, J.L., Carswell, E.A. & Wood, P.R. (1981). Possible importance of macrophage-derived mediators in acute malaria. *Infect Immun* **32**, 1058-66.
57. Bate, C.A. & Kwiatkowski, D.P. (1994). Stimulators of tumour necrosis factor production released by damaged erythrocytes. *Immunology* **83**, 256-61.
58. Kakkilaya, B.S. Hyperparasitemia. in *The Malaria Site* (2004).
59. Meera, S., Rao, A.V., D'Souza, V. & Rao, S.B. (1999). In vitro studies on peroxidative changes leading to hemolysis of erythrocytes infested with malarial parasite *Plasmodium vivax*. *Indian J Exp Biol* **37**, 729-30.
60. Mohan, K., Ganguly, N.K., Dubey, M.L. & Mahajan, R.C. (1992). Oxidative damage of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. An in vitro study. *Ann Hematol* **65**, 131-4.
61. el Hassan, A.M., Saeed, A.M., Fandrey, J. & Jelkmann, W. (1997). Decreased erythropoietin response in *Plasmodium falciparum* malaria-associated anaemia. *Eur J Haematol* **59**, 299-304.
62. Chang, K.H. & Stevenson, M.M. (2004). Effect of anemia and renal cytokine production on erythropoietin production during blood-stage malaria. *Kidney Int* **65**, 1640-6.

63. Gorski, J., Nahorski, W., Goljan, J., Felczak-Korzybska, I. & Flasiński, J. (1994). [Anemia and thrombocytopenia in malaria. I. Mechanisms]. *Przegl Lek* **51**, 221-3.
64. Martiney, J.A., Sherry, B., Metz, C.N., Espinoza, M., Ferrer, A.S., Calandra, T., Broxmeyer, H.E. & Bucala, R. (2000). Macrophage migration inhibitory factor release by macrophages after ingestion of *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes: possible role in the pathogenesis of malarial anemia. *Infect Immun* **68**, 2259-67.
65. Trape, J.F., Peelman, P. & Morault-Peelman, B. (1985). Criteria for diagnosing clinical malaria among a semi-immune population exposed to intense and perennial transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **79**, 435-42.
66. MacLean, J.D. Lecture 2. Malaria.
67. Grau, G.E., Taylor, T.E., Molyneux, M.E., Wirima, J.J., Vassalli, P., Hommel, M. & Lambert, P.H. (1989). Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *N Engl J Med* **320**, 1586-91.
68. Schofield, L. & Hackett, F. (1993). Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J Exp Med* **177**, 145-53.
69. Taylor, K., Bate, C.A., Carr, R.E., Butcher, G.A., Taverne, J. & Playfair, J.H. (1992). Phospholipid-containing toxic malaria antigens induce hypoglycaemia. *Clin Exp Immunol* **90**, 1-5.
70. Day, N.P., Phu, N.H., Mai, N.T., Chau, T.T., Loc, P.P., Chuong, L.V., Sinh, D.X., Holloway, P., Hien, T.T. & White, N.J. (2000). The pathophysiologic and prognostic significance of acidosis in severe adult malaria. *Crit Care Med* **28**, 1833-40.
71. Kern, P., Knobloch, J., Riethmüller, G. & Dietrich, M. (1983). Serological and immunological investigations in patients with gross splenomegaly from the Gabon. *Tropenmed Parasitol* **34**, 253-8.
72. Kelly, K.M. (1996). IGHG3 G and the pathogenesis of hyperreactive malarious splenomegaly. *Med Hypotheses* **46**, 135-9.
73. el-Shoura, S.M. (1994). Falciparum malaria in naturally infected human patients: X. Ultrastructural pathological alterations of renal glomeruli. *Parasite* **1**, 205-10.
74. Smith, C.D., Brown, A.E., Nakazawa, S., Fujioka, H. & Aikawa, M. (1996). Multi-organ erythrocyte sequestration and ligand expression in rhesus monkeys infected with *Plasmodium coatneyi* malaria. *Am J Trop Med Hyg* **55**, 379-83.
75. Udomsangpetch, R., Taylor, B.J., Looareesuwan, S., White, N.J., Elliott, J.F. & Ho, M. (1996). Receptor specificity of clinical *Plasmodium falciparum* isolates: nonadherence to cell-bound E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *Blood* **88**, 2754-60.
76. Chen, Q., Barragan, A., Fernandez, V., Sundstrom, A., Schlichtherle, M., Sahlen, A., Carlson, J., Datta, S. & Wahlgren, M. (1998). Identification of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) as the rosetting ligand of the malaria parasite *P. falciparum*. *J Exp Med* **187**, 15-23.

77. Udomsangpetch, R., Webster, K., Pattanapanyasat, K., Pitchayangkul, S. & Thaitong, S. (1992). Cythoadherence Characteristics of Rosette-Forming Plasmodium falciparum. *Infection and Immunity* **60**, 4483-4490.
78. Mayengue, P.I., Rieth, H., Khattab, A., Issifou, S., Kremsner, P.G., Klinkert, M.Q. & Ntoumi, F. (2004). Submicroscopic Plasmodium falciparum infections and multiplicity of infection in matched peripheral, placental and umbilical cord blood samples from Gabonese women. *Trop Med Int Health* **9**, 949-58.
79. Brabin, B.J., Romagosa, C., Abdelgalil, S., Menendez, C., Verhoeff, F.H., McGready, R., Fletcher, K.A., Owens, S., D'Alessandro, U., Nosten, F., Fischer, P.R. & Ordi, J. (2004). The sick placenta-the role of malaria. *Placenta* **25**, 359-78.
80. Walter, P.R., Garin, Y. & Blot, P. (1982). Placental pathologic changes in malaria. A histologic and ultrastructural study. *Am J Pathol* **109**, 330-42.
81. Fried, M. & Duffy, P.E. (1996). Adherence of Plasmodium falciparum to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science* **272**, 1502-04.
82. Beeson, J.G., Rogerson, S.J., Cooke, B.M., Reeder, J.C., Chai, W., Lawson, A.M., Molyneux, M.E. & Brown, G.V. (2000). Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to hyaluronic acid in placental malaria. *Nat Med* **6**, 86-90.
83. Menendez, C., Ordi, J., Ismail, M.R., Ventura, P.J., Aponte, J.J., Kahigwa, E., Font, F. & Alonso, P.L. (2000). The impact of placental malaria on gestational age and birth weight. *J Infect Dis* **181**, 1740-5.
84. Fried, M. & Duffy, P.E. (1998). Maternal malaria and parasite adhesion. *J Mol Med* **76**, 162-71.
85. Khattab, A., Reinhardt, C., Staalsoe, T., Fievet, N., Kremsner, P.G., Deloron, P., Hviid, L. & Klinkert, M.Q. (2004). Analysis of IgG with specificity for variant surface antigens expressed by placental Plasmodium falciparum isolates. *Malar J* **3**, 21.
86. Duffy, P.E. & Fried, M. (2003). Antibodies that inhibit Plasmodium falciparum adhesion to chondroitin sulfate A are associated with increased birth weight and the gestational age of newborns. *Infect Immun* **71**, 6620-3.
87. Ricke, C.H., Staalsoe, T., Koram, K., Akanmori, B.D., Riley, E.M., Theander, T.G. & Hviid, L. (2000). Plasma antibodies from malaria-exposed pregnant women recognize variant surface antigens on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes in a parity-dependent manner and block parasite adhesion to chonroitin sulfate A. *J Immunol* **165**, 3309-3316.
88. Diagne, N., Rogier, C., Sokhna, C.S., Tall, A., Fontenille, D., Roussilhon, C., Spiegel, A. & Trape, J.F. (2000). Increased susceptibility to malaria during the early postpartum period. *N Engl J Med* **343**, 598-603.
89. Meuris, S., Piko, B.B., Eerens, P., Vanbellinghen, A.M., Dramaix, M. & Hennart, P. (1993). Gestational malaria: assessment of its consequences on fetal growth. *Am J Trop Med Hyg* **48**, 603-9.
90. Jakobsen, P.H., Rasheed, F.N., Bulmer, J.N., Theisen, M., Ridley, R.G. & Greenwood, B.M. (1998). Inflammatory reactions in placental blood of Plasmodium falciparum-infected women and high concentrations of soluble E-



selectin and a circulating *P. falciparum* protein in the cord sera. *Immunology* **93**, 264-9.

91. Xi, G., Leke, R.G., Thuita, L.W., Zhou, A., Leke, R.J., Mbu, R. & Taylor, D.W. (2003). Congenital exposure to *Plasmodium falciparum* antigens: prevalence and antigenic specificity of in utero-produced antimalarial immunoglobulin M antibodies. *Infect Immun* **71**, 1242-6.
92. Franks, S., Koram, K.A., Wagner, G.E., Tetteh, K., McGuinness, D., Wheeler, J.G., Nkrumah, F., Ranford-Cartwright, L. & Riley, E.M. (2001). Frequent and persistent, asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections in African infants, characterized by multilocus genotyping. *J Infect Dis* **183**, 796-804.
93. Taylor, W.R. & White, N.J. (2004). Antimalarial drug toxicity: a review. *Drug Saf* **27**, 25-61.
94. WHO. Management of Severe Malaria - A Practical Handbook. 2nd edn (ed. Organization, W.H.) (Geneva, 2000).
95. Fakeye, T.O., Fehintola, F.A., Ademowo, O.G. & Walker, O. (2002). Therapeutic monitoring of chloroquine in pregnant women with malaria. *West Afr J Med* **21**, 286-7.
96. Verhoeff, F.H., Brabin, B.J., Chimsuku, L., Kazembe, P., Russell, W.B. & Broadhead, R.L. (1998). An evaluation of the effects of intermittent sulfadoxine-pyrimethamine treatment in pregnancy on parasite clearance and risk of low birthweight in rural Malawi. *Ann Trop Med Parasitol* **92**, 141-50.
97. Adam, I., Ali, D.A., Alwaseila, A., Kheir, M.M. & Elbashir, M.I. (2004). Mefloquine in the treatment of *falciparum* malaria during pregnancy in Eastern Sudan. *Saudi Med J* **25**, 1400-2.
98. Kremsner, P.G., Radloff, P., Metzger, W., Wildling, E., Mordmuller, B., Philipps, J., Jenne, L., Nkeyi, M., Prada, J., Bienzle, U. & et al. (1995). Quinine plus clindamycin improves chemotherapy of severe malaria in children. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 1603-5.
99. Geiler, G. (1985). [Common and contradictory aspects of inflammatory reactions and pathogenic immune reactions]. *Zentralbl Allg Pathol* **130**, 307-12.
100. Delves, P.J. & Roitt, I.M. (2000). The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* **343**, 37-49.
101. Delves, P.J. & Roitt, I.M. (2000). The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* **343**, 108-17.
102. Collins, F.M. (1978). Cellular antimicrobial immunity. *CRC Crit Rev Microbiol* **7**, 27-91.
103. Chtanova, T. & Mackay, C.R. (2001). T cell effector subsets: extending the Th1/Th2 paradigm. *Adv Immunol* **78**, 233-66.
104. Romagnani, S. (2000). T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* **85**, 9-18; quiz 18, 21.

105. McHugh, S., Deighton, J., Rifkin, I. & Ewan, P. (1996). Kinetics and functional implications of Th1 and Th2 cytokine production following activation of peripheral blood mononuclear cells in primary culture. *Eur J Immunol* **26**, 1260-5.
106. Roncarolo, M.G., Bacchetta, R., Bordignon, C., Narula, S. & Levings, M.K. (2001). Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* **182**, 68-79.
107. Belardelli, F. (1995). Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *Apmis* **103**, 161-79.
108. McInnes, I.B. Role of cytokines in normal immunity. in *Role of cytokines in the immune system* Vol. 2005 (ed. UpToDate) (UpToDate.online, 2005).
109. Murray, H.W. (1994). Interferon-gamma and host antimicrobial defense: current and future clinical applications. *Am J Med* **97**, 459-67.
110. Heike, M., Schlaak, J., Heyl, S., Schulze-Bergkamen, H., Schmitt, U. & Meyer zum Buschenfelde, K.H. (1997). Contrary roles of IL-4 and IL-12 on IL-10 production and proliferation of human tumour reactive T cells. *Scand J Immunol* **45**, 221-6.
111. Germann, T. & Rude, E. (1995). Interleukin-12. *Int Arch Allergy Immunol* **108**, 103-12.
112. Yoshimoto, T., Wang, C.R., Yoneto, T., Waki, S., Sunaga, S., Komagata, Y., Mitsuyama, M., Miyazaki, J. & Nariuchi, H. (1998). Reduced T helper 1 responses in IL-12 p40 transgenic mice. *J Immunol* **160**, 588-94.
113. Poole, J.A. & Claman, H.N. (2004). Immunology of pregnancy. Implications for the mother. *Clin Rev Allergy Immunol* **26**, 161-70.
114. Hunt, J.S. & Robertson, S.A. (1996). Uterine macrophages and environmental programming for pregnancy success. *J Reprod Immunol* **32**, 1-25.
115. Rukavina, D. & Podack, E.R. (2000). Abundant perforin expression at the maternal-fetal interface: guarding the semiallogeneic transplant? *Immunol Today* **21**, 160-3.
116. Croy, B.A., Luross, J.A., Guimond, M.J. & Hunt, J.S. (1996). Uterine natural killer cells: insights into lineage relationships and functions from studies of pregnancies in mutant and transgenic mice. *Nat Immun* **15**, 22-33.
117. Roth, I., Corry, D.B., Locksley, R.M., Abrams, J.S., Litton, M.J. & Fisher, S.J. (1996). Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *J Exp Med* **184**, 539-48.
118. D'Andrea, A., Aste-Amezaga, M., Valiante, N.M., Ma, X., Kubin, M. & Trinchieri, G. (1993). Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* **178**, 1041-8.
119. Piccinni, M.P., Maggi, E. & Romagnani, S. (2000). Role of hormone-controlled T-cell cytokines in the maintenance of pregnancy. *Biochem Soc Trans* **28**, 212-5.

120. Makhseed, M., Raghupathy, R., Azizieh, F., Omu, A., Al-Shamali, E. & Ashkanani, L. (2001). Th1 and Th2 cytokine profiles in recurrent aborters with successful pregnancy and with subsequent abortions. *Hum Reprod* **16**, 2219-26.
121. Siegrist, C.-A. (2000). Review: Neonatal and early life vaccinology. *Vaccine* **19**, 3331-3346.
122. Riley, R.L. *Neonatal immune response*, 1818-1821 (Academic Press, New York, 1998).
123. Adkins, B., Bu, Y. & Guevara, P. (2001). The generation of Th memory in neonates versus adults: prolonged primary Th2 effector function and impaired development of Th1 memory effector function in murine neonates. *J Immunol* **166**, 918-25.
124. Singh, R.R., Hahn, B.H. & Sercarz, E.E. (1996). Neonatal peptide exposure can prime T cells and, upon subsequent immunization, induce their immune deviation: implications for antibody vs. T cell-mediated autoimmunity. *J Exp Med* **183**, 1613-21.
125. Adkins, B., Ghanei, A. & Hamilton, K. (1993). Developmental regulation of IL-4, IL-2, and IFN-gamma production by murine peripheral T lymphocytes. *J Immunol* **151**, 6617-26.
126. Suzuki, S. & Araki, T. (2003). Feto-maternal interface in T helper 1-type and T helper 2-type immunity in labor. *Arch Gynecol Obstet* **269**, 51-2.
127. Matsuoka, T., Matsubara, T., Katayama, K., Takeda, K., Koga, M. & Furukawa, S. (2001). Increase of cord blood cytokine-producing T cells in intrauterine infection. *Pediatr Int* **43**, 453-7.
128. Yoneyama, Y., Suzuki, S., Sawa, R., Otsubo, Y., Miura, A., Kuwabara, Y., Ishino, H., Kiyokawa, Y., Doi, D., Yoneyama, K. & Araki, T. (2003). Changes in the proportion of T helper 1 and T helper 2 cells in cord blood after premature rupture of membranes. *Arch Gynecol Obstet* **267**, 217-20.
129. Theander, T.G. (1992). Defence mechanisms and immune evasion in the interplay between the humane immune system and Plasmodium falciparum. *Dan Med Bull* **39**, 49-63.
130. Struik, S.S. & Riley, E.M. (2004). Does malaria suffer from lack of memory? *Immunol Rev* **201**, 268-90.
131. Aribot, G., Rogier, C., Sarthou, J.L., Trape, J.F., Balde, A.T., Druilhe, P. & Roussilhon, C. (1996). Pattern of immunoglobulin isotype response to Plasmodium falciparum blood-stage antigens in individuals living in a holoendemic area of Senegal (Dielmo, west Africa). *Am J Trop Med Hyg* **54**, 449-57.
132. Kremsner, P.G., Zotter, G.M., Feldmeier, H., Graninger, W., Rocha, R.M., Jansen-Rosseck, R. & Bienzle, U. (1990). Immune response in patients during and after Plasmodium falciparum infection. *J Infect Dis* **161**, 1025-8.
133. Doolan, D.L. & Hoffman, S.L. (1999). IL-12 and NK cells are required for antigen-specific adaptive immunity against malaria initiated by CD8+ T cells in the Plasmodium yoelii model. *J Immunol* **163**, 884-92.

134. Langhorne, J., Albano, F.R., Hensmann, M., Sanni, L., Cadman, E., Voisine, C. & Sponaas, A.M. (2004). Dendritic cells, pro-inflammatory responses, and antigen presentation in a rodent malaria infection. *Immunol Rev* **201**, 35-47.
135. Stevenson, M.M. & Riley, E.M. (2004). Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol* **4**, 169-80.
136. Day, N.P., Hien, T.T., Schollaardt, T., Loc, P.P., Chuong, L.V., Chau, T.T., Mai, N.T., Phu, N.H., Sinh, D.X., White, N.J. & Ho, M. (1999). The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. *J Infect Dis* **180**, 1288-97.
137. Luty, A.J., Lell, B., Schmidt-Ott, R., Lehman, L.G., Luckner, D., Greve, B., Matousek, P., Herbich, K., Schmid, D., Ulbert, S., Migot-Nabias, F., Dubois, B., Deloron, P. & Kremsner, P.G. (1998). Parasite antigen-specific interleukin-10 and antibody responses predict accelerated parasite clearance in Plasmodium falciparum malaria. *Eur Cytokine Netw* **9**, 639-46.
138. Druilhe, P. & Perignon, J.L. (1997). A hypothesis about the chronicity of malaria infection. *Parasitol Today* **13**, 353-7.
139. Bruce-Chwatt, L.J. (1963). A Longitudinal Survey Of Natural Malaria Infection In A Group Of West African Adults. *West Afr Med J* **12**, 199-217.
140. Gupta, S., Snow, R.W., Donnelly, C.A., Marsh, K. & Newbold, C. (1999). Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nat Med* **5**, 340-3.
141. Fievet, N., Cot, M., Ringwald, P., Bickii, J., Dubois, B., Le Hesran, J.Y., Migot, F. & Deloron, P. (1997). Immune response to Plasmodium falciparum antigens in Cameroonian primigravidae: evolution after delivery and during second pregnancy. *Clin Exp Immunol* **107**, 462-7.
142. Wegmann, T.G., Lin, H., Guilbert, L. & Mosmann, T.R. (1993). Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* **14**, 353-6.
143. Fried, M., Muga, R.O., Misore, A.O. & Duffy, P.E. (1998). Malaria elicits type 1 cytokines in the human placenta: IFN-gamma and TNF-alpha associated with pregnancy outcomes. *J Immunol* **160**, 2523-30.
144. Ordi, J., Menendez, C., Ismail, M.R., Ventura, P.J., Palacin, A., Kahigwa, E., Ferrer, B., Cardesa, A. & Alonso, P.L. (2001). Placental malaria is associated with cell-mediated inflammatory responses with selective absence of natural killer cells. *J Infect Dis* **183**, 1100-7.
145. Bouyou-Akotet, M.K., Issifou, S., Meye, J.F., Kombila, M., Ngou-Milama, E., Luty, A.J., Kremsner, P.G. & Mavoungou, E. (2004). Depressed natural killer cell cytotoxicity against Plasmodium falciparum-infected erythrocytes during first pregnancies. *Clin Infect Dis* **38**, 342-7.
146. Moore, J.M., Nahlen, B.L., Misore, A., Lal, A.A. & Udhayakumar, V. (1999). Immunity to placental malaria. I. Elevated production of interferon-gamma by placental blood mononuclear cells is associated with protection in an area with high transmission of malaria. *J Infect Dis* **179**, 1218-25.

147. O'Neil-Dunne, I., Achur, R.N., Agbor-Enoh, S.T., Valiyaveetil, M., Naik, R.S., Ockenhouse, C.F., Zhou, A., Megnekou, R., Leke, R., Taylor, D.W. & Gowda, D.C. (2001). Gravidity-dependent production of antibodies that inhibit binding of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to placental chondroitin sulfate proteoglycan during pregnancy. *Infect Immun* **69**, 7487-7492.
148. Staalsoe, T., Megnekou, R., Fievet, N., Ricke, C.H., Zornig, H.D., Leke, R., Taylor, D.W., Deloron, P. & Hviid, L. (2001). Acquisition and decay of antibodies to pregnancy-associated variant antigens on the surface of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes that protect against placental parasitemia. *J Infect Dis* **184**, 618-26.
149. Kitua, A.Y., Smith, T., Alonso, P.L., Masanja, H., Urassa, H., Menendez, C., Kimario, J. & Tanner, M. (1996). Plasmodium falciparum malaria in the first year of life in an area of intense and perennial transmission. *Trop Med Int Health* **1**, 475-84.
150. Brabin, B. (1990). An analysis of malaria parasite rates in infants: 40 years after MacDonal. *Trop Dis Bull* **87**, R1-R21.
151. Carnevale, P., Frezil, J.L., Besseno, M.F., Le Pont, F. & Lancien, J. (1978). Etude de l'agressivite de An. gambiae en fonction de l'age et du sexe des sujets humains. *Bull Wrld Hlth Org* **56**, 147-54.
152. Sylla, A., Lamah, O.O., Camin, A.M., Diallo, P., Keita, N., Barry, I., Conde, N.M., Diallo, P.M., Guiguen, C. & Senecal, J. (1998). [Malaria in the infant in a rural area of maritime Guinea (Guinea Conakry). I. Immune and parasitic status of the mother and the newborn]. *Bull Soc Pathol Exot* **91**, 287-90.
153. Wagner, G., Koram, K., McGuinness, D., Bennett, S., Nkrumah, F. & Riley, E. (1998). High incidence of asymptomatic malara infections in a birth cohort of children less than one year of age in Ghana, detected by multicopy gene polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* **59**, 115-23.
154. Deloron, P., Dubois, B., Le Hesran, J.Y., Riche, D., Fievet, N., Cornet, M., Ringwald, P. & Cot, M. (1997). Isotypic analysis of maternally transmitted Plasmodium falciparum-specific antibodies in Cameroon, and relationship with risk of P. falciparum infection. *Clin Exp Immunol* **110**, 212-8.
155. Branch, O.H., Oloo, A.J., Nahlen, B.L., Kaslow, D. & Lal, A.A. (2000). Anti-merozoite surface protein-1 19-kDa IgG in mother-infant pairs naturally exposed to Plasmodium falciparum: subclass analysis with age, exposure to asexual parasitemia, and protection against malaria. V. The Asembo Bay Cohort Project. *J Infect Dis* **181**, 1746-52.
156. Fievet, N., Ringwald, P., Bickii, J., Dubois, B., Maubert, B., Le Hesran, J.Y., Cot, M. & Deloron, P. (1996). Malaria cellular immune responses in neonates from Cameroon. *Parasite Immunol* **18**, 483-90.
157. Carlier, Y. & Truyens, C. (1995). Influence of maternal infection on offspring resistance towards parasites. *Parasitol Today* **11**, 94-9.
158. Brustoski, K., Moller, U., Kramer, M., Petelski, A., Brenner, S., Palmer, D.R., Bongartz, M., Kremsner, P.G., Luty, A.J. & Krzych, U. (2005). IFN- $\gamma$  and IL-10 Mediate Parasite-Specific Immune Responses of Cord Blood Cells Induced

by Pregnancy-Associated Plasmodium falciparum Malaria. *J Immunol* **174**, 1738-45.

159. WHO. Gabon. in *Malaria Country Profiles* (ed. WHO) 54-56 (2002).
160. WHO. Gabon. (2005).
161. Department of Reproductive Health and Research (RHR), W.H.O. Maternal and Newborn Health - Covering maternity care, a listing of available information. (WHO RHR).
162. Sylla, E.H., Kun, J.F. & Kremsner, P.G. (2000). Mosquito distribution and entomological inoculation rates in three malaria-endemic areas in Gabon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **94**, 652-6.
163. Wildling, E., Winkler, S., Kremsner, P.G., Brandts, C., Jenne, L. & Wernsdorfer, W.H. (1995). Malaria epidemiology in the province of Moyen Ogoov, Gabon. *Trop Med Parasitol* **46**, 77-82.
164. Hviid, L., Theander, T.G., Abdulhadi, N.H., Abu-Zeid, Y.A., Bayoumi, R.A. & Jensen, J.B. (1991). Transient depletion of T cells with high LFA-1 expression from peripheral circulation during acute Plasmodium falciparum malaria. *Eur J Immunol* **21**, 1249-53.
165. Hviid, L., Theander, T.G., Abu-Zeid, Y.A., Abdulhadi, N.H., Jakobsen, P.H., Saeed, B.O., Jepsen, S., Bayoumi, R.A. & Jensen, J.B. (1991). Loss of cellular immune reactivity during acute Plasmodium falciparum malaria. *FEMS Microbiol Immunol* **3**, 219-27.
166. Rautava, S., Ruuskanen, O., Ouwehand, A., Salminen, S. & Isolauri, E. (2004). The hygiene hypothesis of atopic disease--an extended version. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **38**, 378-88.
167. Marks, G.B., Ng, K., Zhou, J., Toelle, B.G., Xuan, W., Belousova, E.G. & Britton, W.J. (2003). The effect of neonatal BCG vaccination on atopy and asthma at age 7 to 14 years: an historical cohort study in a community with a very low prevalence of tuberculosis infection and a high prevalence of atopic disease. *J Allergy Clin Immunol* **111**, 541-9.
168. Prescott, S.L., Macaubas, C., Holt, B.J., Smallacombe, T.B., Loh, R., Sly, P.D. & Holt, P.G. (1998). Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J Immunol* **160**, 4730-7.
169. Bouyou-Akotet, M.K., Ionete-Collard, D.E., Mabika-Manfoumbi, M., Kendjo, E., Matsiegui, P.B., Mavoungou, E. & Kombila, M. (2003). Prevalence of Plasmodium falciparum infection in pregnant women in Gabon. *Malar J* **2**, 18.
170. Walter, P., Garin, J.F., Blot, P. & Philippe, E. (1981). [The placenta and malaria. A morphologic, parasitologic and clinical study (author's transl)]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* **10**, 535-42.
171. Adkins, B. (1999). T-cell function in newborn mice and humans. *Immunol Today* **20**, 330-5.

172. Waterfall, M., Black, A. & Riley, E. (1998). Gammadelta+ T cells preferentially respond to live rather than killed malaria parasites. *Infect Immun* **66**, 2393-8.
173. Trivedi, H.N., HayGlass, K.T., Gangur, V., Allardice, J.G., Embree, J.E. & Plummer, F.A. (1997). Analysis of neonatal T cell and antigen presenting cell functions. *Hum Immunol* **57**, 69-79.
174. Othieno, C., Hirsch, C.S., Hamilton, B.D., Wilkinson, K., Ellner, J.J. & Toossi, Z. (1999). Interaction of Mycobacterium tuberculosis-induced transforming growth factor beta1 and interleukin-10. *Infect Immun* **67**, 5730-5.
175. Ho, M., Webster, H.K., Looareesuwan, S., Supanaranond, W., Phillips, R.E., Chanthavanich, P. & Warrell, D.A. (1986). Antigen-specific immunosuppression in human malaria due to Plasmodium falciparum. *J Infect Dis* **153**, 763-71.
176. Riley, E.M., Andersson, G., Otoo, L.N., Jepsen, S. & Greenwood, B.M. (1988). Cellular immune responses to Plasmodium falciparum antigens in Gambian children during and after an acute attack of falciparum malaria. *Clin Exp Immunol* **73**, 17-22.
177. Theander, T.G., Bygbjerg, I.C., Jepsen, S., Svenson, M., Kharazmi, A., Larsen, P.B. & Bendtzen, K. (1986). Proliferation induced by Plasmodium falciparum antigen and interleukin-2 production by lymphocytes isolated from malaria-immune individuals. *Infect Immun* **53**, 221-5.
178. Lewis, D.B., Yu, C.C., Meyer, J., English, B.K., Kahn, S.J. & Wilson, C.B. (1991). Cellular and molecular mechanisms for reduced interleukin 4 and interferon-gamma production by neonatal T cells. *J Clin Invest* **87**, 194-202.
179. Peakman, M., Buggins, A.G., Nicolaides, K.H., Layton, D.M. & Vergani, D. (1992). Analysis of lymphocyte phenotypes in cord blood from early gestation fetuses. *Clin Exp Immunol* **90**, 345-50.
180. Malhotra, I., Mungai, P., Wamachi, A., Kioko, J., Ouma, J.H., Kazura, J.W. & King, C.L. (1999). Helminth- and Bacillus Calmette-Guerin-induced immunity in children sensitized in utero to filariasis and schistosomiasis. *J Immunol* **162**, 6843-8.
181. Ismaili, J., van der Sande, M., Holland, M.J., Sambou, I., Keita, S., Allsopp, C., Ota, M.O., McAdam, K.P. & Pinder, M. (2003). Plasmodium falciparum infection of the placenta affects newborn immune responses. *Clin Exp Immunol* **133**, 414-21.
182. Krampera, M., Vinante, F., Tavecchia, L., Morosato, L., Chilosi, M., Romagnani, S., Zanolini, M.E. & Pizzolo, G. (1999). Progressive polarization towards a T helper/cytotoxic type-1 cytokine pattern during age-dependent maturation of the immune response inversely correlates with CD30 cell expression and serum concentration. *Clin Exp Immunol* **117**, 291-7.
183. Chipeta, J., Komada, Y., Zhang, X.L., Azuma, E., Yamamoto, H. & Sakurai, M. (2000). Neonatal (cord blood) T cells can competently raise type 1 and 2 immune responses upon polyclonal activation. *Cell Immunol* **205**, 110-9.
184. Kirch, A.K., Agossou, A., Banla, M., Hoffmann, W.H., Schulz-Key, H. & Soboslay, P.T. (2004). Parasite-specific antibody and cytokine profiles in newborns from Plasmodium falciparum and Entamoeba histolytica/dispar-infected mothers. *Pediatr Allergy Immunol* **15**, 133-41.

185. Su, Z. & Stevenson, M.M. (2000). Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *Infect Immun* **68**, 4399-406.
186. Pearlman, E., Kazura, J.W., Hazlett, F.E., Jr. & Boom, W.H. (1993). Modulation of murine cytokine responses to mycobacterial antigens by helminth-induced T helper 2 cell responses. *J Immunol* **151**, 4857-64.
187. Malhotra, I., Ouma, J., Wamachi, A., Kioko, J., Mungai, P., Omollo, A., Elson, L., Koech, D., Kazura, J.W. & King, C.L. (1997). In utero exposure to helminth and mycobacterial antigens generates cytokine responses similar to that observed in adults. *J Clin Invest* **99**, 1759-66.
188. Skoberne, M., Malovrh, T., Skralovnik-Stern, A. & Kotnik, V. (2000). Human peripheral blood lymphocytes sensitised to PPD respond to in vitro stimulation with increased expression of CD69 and CD134 activation antigens and production of Th-1 type cytokines. *Pflugers Arch* **440**, R58-60.
189. Blanco-Quiros, A., Gonzalez, H., Arranz, E. & Lapena, S. (1999). Decreased interleukin-12 levels in umbilical cord blood in children who developed acute bronchiolitis. *Pediatr Pulmonol* **28**, 175-80.
190. McBride, J.M., Jung, T., de Vries, J.E. & Aversa, G. (2002). IL-10 alters DC function via modulation of cell surface molecules resulting in impaired T-cell responses. *Cell Immunol* **215**, 162-72.
191. Wensch, C., Parschalk, B., Narzt, E., Looareesuwan, S. & Graninger, W. (1995). Elevated serum levels of IL-10 and IFN-gamma in patients with acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Immunol Immunopathol* **74**, 115-7.
192. Malhotra, I., Mungai, P., Muchiri, E., Ouma, J., Sharma, S., Kazura, J.W. & King, C.L. (2005). Distinct Th1- and Th2-Type Prenatal Cytokine Responses to *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Invasion Ligands. *Infect Immun* **73**, 3462-70.
193. Rhee, M.S., Akanmori, B.D., Waterfall, M. & Riley, E.M. (2001). Changes in cytokine production associated with acquired immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Exp Immunol* **126**, 503-10.
194. Chougnat, C., Kovacs, A., Baker, R., Mueller, B.U., Luban, N.L., Liewehr, D.J., Steinberg, S.M., Thomas, E.K. & Shearer, G.M. (2000). Influence of human immunodeficiency virus-infected maternal environment on development of infant interleukin-12 production. *J Infect Dis* **181**, 1590-7.
195. Pohl, D., Bockelmann, C., Forster, K., Rieger, C.H. & Schauer, U. (1997). Neonates at risk of atopy show impaired production of interferon-gamma after stimulation with bacterial products (LPS and SEE). *Allergy* **52**, 732-8.
196. Mosmann, T.R. & Sad, S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* **17**, 138-46.
197. Tan, R.S., Kara, A.U., Feng, C., Asano, Y. & Sinniah, R. (2000). Differential interleukin-10 expression in interferon regulatory factor-1 deficient mice during *Plasmodium berghei* blood-stage infection. *Parasite Immunol* **22**, 425-35.



198. Roussilhon, C., Agrapart, M., Behr, C., Dubois, P. & Ballet, J.J. (1989). Interactions of CD4+ and CD8+ human T lymphocytes from malaria-unprimed donors with Plasmodium falciparum schizont stage. *J Clin Microbiol* **27**, 2544-51.
199. Gabrielsson, S., Soderlund, A., Nilsson, C., Lilja, G., Nordlund, M. & Troye-Blomberg, M. (2001). Influence of atopic heredity on IL-4-, IL-12- and IFN-gamma-producing cells in in vitro activated cord blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol* **126**, 390-6.
200. Brown, M.A., Rad, P.Y. & Halonen, M.J. (2003). Method of birth alters interferon-gamma and interleukin-12 production by cord blood mononuclear cells. *Pediatr Allergy Immunol* **14**, 106-11.
201. Mohan, K., Moulin, P. & Stevenson, M.M. (1997). Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage Plasmodium chabaudi AS infection. *J Immunol* **159**, 4990-8.
202. Yoshimoto, T., Yoneto, T., Waki, S. & Nariuchi, H. (1998). Interleukin-12-dependent mechanisms in the clearance of blood-stage murine malaria parasite Plasmodium berghei XAT, an attenuated variant of P. berghei NK65. *J Infect Dis* **177**, 1674-81.
203. Ramharter, M., Willheim, M., Winkler, H., Wahl, K., Lagler, H., Graninger, W. & Winkler, S. (2003). Cytokine profile of Plasmodium falciparum-specific T cells in non-immune malaria patients. *Parasite Immunol* **25**, 211-9.
204. Tripp, C.S., Wolf, S.F. & Unanue, E.R. (1993). Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3725-9.
205. Scharon-Kersten, T., Afonso, L.C., Wysocka, M., Trinchieri, G. & Scott, P. (1995). IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *J Immunol* **154**, 5320-30.
206. Yoshimoto, T., Takahama, Y., Wang, C.R., Yoneto, T., Waki, S. & Nariuchi, H. (1998). A pathogenic role of IL-12 in blood-stage murine malaria lethal strain Plasmodium berghei NK65 infection. *J Immunol* **160**, 5500-5.
207. Doodoo, D., Omer, F.M., Todd, J., Akanmori, B.D., Koram, K.A. & Riley, E.M. (2002). Absolute levels and ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to Plasmodium falciparum malaria. *J Infect Dis* **185**, 971-9.
208. Luty, A.J., Perkins, D.J., Lell, B., Schmidt-Ott, R., Lehman, L.G., Luckner, D., Greve, B., Matousek, P., Herbich, K., Schmid, D., Weinberg, J.B. & Kremsner, P.G. (2000). Low interleukin-12 activity in severe Plasmodium falciparum malaria. *Infect Immun* **68**, 3909-15.
209. Li, C., Corraliza, I. & Langhorne, J. (1999). A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in Plasmodium chabaudi chabaudi infection in mice. *Infect Immun* **67**, 4435-42.
210. Torre, D., Speranza, F., Giola, M., Matteelli, A., Tambini, R. & Biondi, G. (2002). Role of Th1 and Th2 cytokines in immune response to uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. *Clin Diagn Lab Immunol* **9**, 348-51.

211. Hermsen, C.C., Konijnenberg, Y., Mulder, L., Loe, C., van Deuren, M., van der Meer, J.W., van Mierlo, G.J., Eling, W.M., Hack, C.E. & Sauerwein, R.W. (2003). Circulating concentrations of soluble granzyme A and B increase during natural and experimental *Plasmodium falciparum* infections. *Clin Exp Immunol* **132**, 467-72.
212. Xu, X., Sumita, K., Feng, C., Xiong, X., Shen, H., Maruyama, S., Kanoh, M. & Asano, Y. (2001). Down-regulation of IL-12 p40 gene in *Plasmodium berghei*-infected mice. *J Immunol* **167**, 235-41.
213. Perkins, D.J., Weinberg, J.B. & Kremsner, P.G. (2000). Reduced interleukin-12 and transforming growth factor-beta1 in severe childhood malaria: relationship of cytokine balance with disease severity. *J Infect Dis* **182**, 988-92.
214. Baptista, J.L., Vanham, G., Wery, M. & Van Marck, E. (1997). Cytokine levels during mild and cerebral *falciparum* malaria in children living in a mesoendemic area. *Trop Med Int Health* **2**, 673-9.
215. Blanco-Quiros, A., Arranz, E., Solis, G., Villar, A., Ramos, A. & Coto, D. (2000). Cord blood interleukin-10 levels are increased in preterm newborns. *Eur J Pediatr* **159**, 420-3.



## **8. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. Peter G. Kremsner für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas und seine erfahrene Betreuung.

Ebenfalls besonderen Dank an Dr. Adrian J.F. Luty für seine Betreuung und Unterstützung während des Aufenthalts in Gabun, sowie in der Zeit danach bei der Auswertung der Daten in Tübingen.

Ich danke allen Mitarbeitern und Kollegen des Forschungslabors in Lambaréné für die freundschaftliche Zusammenarbeit. Besonderer Dank hierbei an Annika Petelski für ihre unkomplizierte und motivierte Art bei der gemeinsamen Durchführung der Studie und Datenerhebung.

Herzlichen Dank allen Müttern, sowie deren Kindern, die sich bereit erklärten, an dieser Studie teilzunehmen. Besonderer Dank gilt hierbei auch den Mitarbeiterinnen der Maternité des Albert-Schweitzer-Hospitals für ihre Kooperationsbereitschaft bei der Durchführung der Probenkollektion.

Ich danke meinen Eltern, Gabriele und Albrecht Brenner, für die stets verlässliche Unterstützung während der Erstellung der Doktorarbeit und während der gesamten Studienzeit.



## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Stephan Brenner  
Geburtstag: 05. Januar 1976  
Geburtsort: Nürtingen  
Familienstand: ledig

### Schulbildung:

1982-1986: Grundschule Kaisersbach  
1986-1995: Limes-Gymnasium Welzheim  
Juni 1995: Abitur

### Hochschulbildung:

1996-1998: Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Sept. 1998: Ärztliche Vorprüfung  
1998-2004: Klinisches Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
Sept. 1999: Erstes Staatsexamen  
2000-2001: mehrmonatige Mitarbeit in der Shekhinah-Clinic, Tamale/Ghana  
2001: Beginn der Mitarbeit in der Sektion Humanparasitologie des Instituts für Tropenmedizin an der Universität Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. P.G. Kremsner  
2001-2002: einjähriger Forschungsaufenthalt im Laboratoire de Recherche des Hôpital Albert Schweitzer, Lambaréné/Gabun  
Sept. 2003: Zweites Staatsexamen  
2003-2004: Praktisches Jahr: Teil 1 Universitätsklinikum Tübingen,  
Teil 2 Yale University, New Haven/USA  
Teil 3 New York University, New York City/USA.  
23.Nov. 2004: Drittes Staatsexamen

Seit Sept. 2005 Studium an der Harvard School of Public Health, Boston/USA zur Erlangung des *Master of Public Health (MPH)* mit Schwerpunkt *International Health*.