

Aus der Klinik der Kinder- und Jugendmedizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. E. Herting

**Charakterisierung der Immunantwort und Infektionsprädisposition von
small-for-gestational-age Frühgeborenen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
aus der Sektion Medizin



Vorgelegt von Thilo Müller
aus Hannover

Lübeck 2015

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Härtel

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Jan Weichert

Tag der mündlichen Prüfung: 04.11.2015

zum Druck genehmigt, Lübeck, den 04.11.2015

Promotionskommission der Sektion Medizin

I Inhaltsverzeichnis

II	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	5
III	TABELLENVERZEICHNIS	6
IV	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1	EINLEITUNG	10
1.1	Definition von IUGR und SGA.....	10
1.2	Das Risikoprofil von SGA-Kindern	10
1.3	Late-Onset-Sepsis.....	12
1.4	Grundlagen des Immunsystems und seine Besonderheiten bei Neu- und Frühgeborenen... 15	
1.4.1	Neutrophile Granulozyten.....	17
1.4.2	Zytokine.....	18
1.4.3	Interleukin 6	20
1.4.4	Interleukin 8 (CXCL8).....	21
1.4.5	Interleukin 10	21
1.4.6	TNF- α	23
1.4.7	sCD14-Rezeptor.....	24
1.4.8	TGF- β	24
2	FRAGESTELLUNG.....	26
3	MATERIAL UND METHODEN	27
3.1	Material	27
3.1.1	Verwendete Reagenzien	27
3.1.2	Verwendete Materialien	27
3.1.3	Verwendete Geräte.....	27
3.1.4	Verwendete Software	28
3.2	Methoden – Einfluss des SGA-Status auf die angeborene Immunantwort.....	28
3.2.1	Studienprotokoll.....	28
3.2.2	Ein- und Ausschlusskriterien	28
3.2.3	Zytokinmessung	29
3.2.3.1	Herstellung der Mediumlösung	29
3.2.3.2	Herstellung der Lipopolysaccharid-Stocklösung	29
3.2.3.3	Vollblutkulturansatz.....	30
3.2.3.4	ELISA-Messung.....	30

3.3 Methoden – Einfluss des SGA-Status auf das Late-Onset-Sepsisrisiko	31
3.3.1 Studienprotokoll.....	31
3.3.2 Einschluss- und Ausschlusskriterien.....	32
3.4 Methoden - Klinische Outcomes	32
3.5 Ethikvotum.....	33
3.6 Statistik	33
4 ERGEBNISSE	34
4.1 Zusammenhang des SGA-Status mit der angeborenen Immunantwort von Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von \leq 32 Wochen	34
4.1.1 Klinische Charakteristika der Kohorte und Outcome	34
4.1.2 Analyse der Differenzialblutbilder.....	37
4.1.3 Zytokinproduktion.....	40
4.2 Zusammenhang des SGA-Status mit dem Risiko für eine Late-Onset-Sepsis VLBW-Frühgeborener	43
4.2.1 Klinische Charakteristika der Kohorte	43
4.2.2 Risiko für Late-Onset-Sepsis	45
4.2.3 Behandlungsmodalitäten	47
4.2.4 Unabhängige Risikofaktoren für eine Late-Onset-Sepsis bei VLBW-Kindern	49
4.2.5 Andere Endpunkte	49
5 DISKUSSION	52
6 ZUSAMMENFASSUNG	62
V LITERATURVERZEICHNIS	64
VI ANHANG.....	90
VII DANKSAGUNG	91
VIII VERÖFFENTLICHUNGEN	92
IX LEBENSLAUF	93

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Leukozytenzahl in Vollblutproben von SGA- und AGA-Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von ≤ 32 Wochen, bei Geburt, am 3. Lebenstag und am 7. Lebenstag.....	37
Abbildung 2: Neutrophilenzahl in Vollblutproben von SGA- und AGA-Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von ≤ 32 Wochen, bei Geburt, am 3. Lebenstag und am 7. Lebenstag.....	38
Abbildung 3: Thrombozytenzahl in Vollblutproben von SGA- und AGA-Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von ≤ 32 Wochen.....	39
Abbildung 4: Normoblastenzahl/100 Leukozyten in Vollblutproben von SGA- und AGA-Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von ≤ 32 Wochen	39
Abbildung 5: Interleukin 6 Expression nach LPS-Stimulation in Vollblutkulturansätzen von SGA- und AGA-Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von ≤ 32 Wochen.....	41
Abbildung 6: Interleukin 10 Expression nach LPS-Stimulation in Vollblutkulturansätzen von SGA- und AGA-Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von ≤ 32 Wochen.....	41
Abbildung 7: Inzidenz von Blutkultur-positiven Late-Onset-Septitiden bei SGA-Kindern verglichen mit AGA-Kindern, stratifiziert nach Gestationsalter.....	46

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Charakteristika, Geburtsmodus und Ursachen der Frühgeburtlichkeit in der Frühgeborenenkohorte mit einem Gestationsalter von ≤ 32 Wochen (n = 144)	35
Tabelle 2: Mortalität und Morbidität der Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von ≤ 32 Wochen, stratifiziert nach Geburtsgewichtspersentilen < 10	36
Tabelle 3: Klinische Charakteristika der VLBW-Kohorte mit einem Gestationsalter von 23+0 bis 31+6 Wochen, stratifiziert nach Geburtsgewichtspersentilen < 10 (n=5886).....	44
Tabelle 4: Erregerspektrum der Late-Onset-Sepsis-Episoden	47
Tabelle 5: Behandlungsmodalitäten der VLBW-Kohorte mit potentiellm Einfluss auf das Sepsisrisiko	48
Tabelle 6: Outcome-Daten der Frühgeborenen mit einem Gestationsalter zwischen 23+0 \leq 26+6 Wochen, stratifiziert nach SGA	50
Tabelle 7: Outcome-Daten der Frühgeborenen mit einem Gestationsalter zwischen 27+0 \leq 31+6 Wochen, stratifiziert nach SGA	50
Tabelle 8: Outcome-Daten der Gesamtkohorte mit einem Gestationsalter zwischen 23+0 \leq 31+6 Wochen, stratifiziert nach SGA	51
Tabelle 9: Definition einer Sepsis bei Früh und Neugeborenen nach dem Surveillance-Protokoll NEO-KISS des NRZ (Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen des Robert Koch Institutes) [195]	90

IV Abkürzungsverzeichnis

AGA	Appropriate for gestational age
AIS	Amnioninfektionssyndrom
ANS	Atemnotsyndrom
APC	Antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen-presenting cell</i>)
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
BPI	Bacterial/Permeability-Increasing Protein
CD	Cluster of differentiation
CR3	Complement receptor 3
CrP	C-reaktives Protein
CTG	Kardiotokografie (<i>Cardiotocography</i>)
CXCL8	CXC-Motiv-Chemokin 8, Interleukin 8
d	Tag
E.coli	Escherichia coli
ELBW	Extremely low birth weight
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EOS	Early-Onset-Sepsis
ESBL	Extended Spectrum β -Lactamase
FIP	Fokale intestinale Perforation
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GNN	German Neonatal Network
h	Stunde
HELLP	Schwangerschaftserkrankung mit den Symptomen Hämolyse (<i>H = Hemolysis</i>), Erhöhung der Leberenzyme (<i>EL = Elevated liver enzymes</i>), Thrombozytopenie (<i>LP = Low Platelet count</i>)
ICH	Intrakranielle Hämorrhagie (<i>Intracerebral Hemorrhage</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-like growth factor
IGFBP	Insulin-like growth factor binding protein
IL	Interleukin
IL-1Ra	Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist

IRAK	Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase
I/T Quotient	Unreife/gesamte Granulozyten Quotient
IUGR	Intrauterine growth retardation
IVH	Intraventrikuläre Hämorrhagie
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KI	Konfidenzintervall
KNS	Koagulase-negative Staphylokokken
LBP	LPS-bindendes Protein
LBW	Low birth weight
LLOS	Late-Late-Onset-Sepsis
LOS	Late-Onset-Sepsis
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
MD2	Myeloider Differenzierungsfaktor 2
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MW	Mittelwert
MyD88	Myeloider Differenzierungsfaktor 88
NEC	Nekrotisierende Enterocolitis
NEO-KISS	German national surveillance system for nosocomial infections
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OR	Odds ratio
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PDA	Persistierender Ductus arteriosus
pg	Pikogramm

PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PRR	Pattern recognition receptor
PVL	Periventrikuläre Hämorrhagie
ROP	Frühgeborenenretinopathie (<i>Retinopathy of prematurity</i>)
RPMI	Zellkulturmedium aus dem <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SGA	Small for gestational age
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SSW	Schwangerschaftswoche
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TGF-β	Transforming growth factor beta
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
VLBW	Very low birth weight
VLOS	Very-Late-Onset-Sepsis

1 Einleitung

1.1 Definition von IUGR und SGA

Bei Kindern, die während der Fetalperiode nicht ihrem genetischen Potential entsprechend wachsen, spricht man von intrauteriner Wachstumsverzögerung (IUGR) [152]. Diese funktionelle Definition dient dazu, Feten mit einem erhöhten Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko zu identifizieren. Postnatal wird das Gewicht eines Neugeborenen mit Hilfe von Gewichtspersentilen in Verhältnis zu der normalen Verteilung des Geburtsgewichts in der Gesamtpopulation mit korrespondierendem Gestationsalter gesetzt. Kinder, die ein Geburtsgewicht unterhalb der zehnten Perzentile aufweisen, werden als „small for gestational age“ (SGA) klassifiziert. Oberhalb dieser Grenze spricht man von „appropriate for gestational age“ (AGA).

IUGR und SGA können dabei nicht gleichgesetzt werden. Nicht alle Kinder, die als SGA eingestuft werden, sind gleichzeitig pathologisch wachstumsverzögert, sondern können auch familiär von kleiner Konstitution sein [112]. Gleichzeitig können auch wachstumsretardierte Kinder intrauterin mit ihrem geschätzten Gewicht oberhalb der 10. Perzentile liegen. Der SGA-Status kann deshalb nur ein Indiz für das Vorliegen einer pathologischen intrauterinen Wachstumsverzögerung sein. Die pränatale Diagnostik muss solche Feten identifizieren, deren geringe Größe keinen Krankheitswert hat und somit von der Definition IUGR ausschließt [194].

1.2 Das Risikoprofil von SGA-Kindern

Frühgeborene sind nach Definition der WHO Kinder, die vor der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche post menstruationem zur Welt kommen. Anhand des Geburtsgewichts wird zudem eine Einteilung in low birth weight (LBW = <2500g), very low birth weight (VLBW = <1500g) und extremely low birth weight (ELBW = <1000g) vorgenommen. Innerhalb der Gruppe der Frühgeborenen stellen SGA-Kinder eine gesonderte Risikogruppe dar.

Dabei ging man vor einigen Jahrzehnten noch davon aus, dass der SGA-Status eine physiologische Anpassungsreaktion des Organismus auf intrauterine Mangelzustände darstellt und für den Fetus so letztendlich von Vorteil ist. In den 1970er und 1980er Jahren

fanden Forscher bei SGA-Kindern ein verringertes Risiko für intrakranielle Hämorrhagien (ICH) [134] und das akute Atemnotsyndrom (ANS). Ursächlich sollte unter anderem eine beschleunigte Lungenreifung in Folge einer intrauterinen Stressreaktion des Feten bei Risikoschwangerschaften sein [28].

Erst später erkannte man, welche perinatalen Faktoren zusätzlich Einfluss auf das Outcome von VLBW-Frühgeborenen haben. So zeigen aktuellere Studien, die für diese Variablen korrigiert wurden, eine entgegengesetzte Tendenz: das Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko für SGA-Frühgeborene scheint im Vergleich zu nicht-wachstumsretardierten Kindern eher erhöht zu sein.

Eine Studie des Vermont Oxford Network zeigte im Jahr 2000 unter VLBW-Frühgeborenen mit IUGR (definiert als Geburtsgewicht <10. Perzentile des entsprechenden Gestationsalters) eine signifikante Erhöhung des Mortalitätsrisikos sowie des Risikos für eine nekrotisierende Enterokolitiden (NEC) und ANS [15].

Zeitlin et al. stratifizierten 2010 die Daten aus ihrer multizentrisch rekrutierten Kohorte von 4525 sehr kleinen Frühgeborenen (Gestationsalter zwischen der 24 und 31 Schwangerschaftswoche) in Gruppen nach Gewichtsperzentilen, um einen geeigneten Cutoff-Wert zur Identifizierung von Risiko-Frühgeborenen zu finden. Sie zeigten, dass bereits für Kinder unterhalb der 25. Gewichtsperzentile ein erhöhtes Mortalitätsrisiko besteht und das Risiko für eine bronchopulmonale Dysplasie (BPD) kontinuierlich mit abnehmendem Geburtsgewicht wächst [193].

Bis heute konnten weitere Studien diese Beobachtungen bestätigen, sodass der SGA-Status mit relativer Sicherheit als Risikofaktor für eine erhöhte Mortalität sowie höhere Raten an BPD, Frühgeborenenretinopathie (ROP) und NEC angesehen werden kann [55, 62, 107, 139, 175, 188].

Widersprüchliche Daten existieren bezüglich des Outcomes einer intraventrikulären Hämorrhagie (IVH) bzw. einer periventrikulären Leukomalazie (PVL), da einige Studien hier ein erhöhtes Risiko unter SGA-Kindern berichteten [15] und andere nicht [48, 193].

Bezüglich eines mit SGA assoziierten erhöhten Sepsisrisikos existieren bislang keine ausreichenden Daten. Mehrere zumeist unizentrische Studien kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Eine multizentrische Studie aus den USA von De Jesus et al. konnte kürzlich in einer großen Kohorte mit einem Gestationsalter von < 27 Wochen keinen Unterschied zwischen SGA- und AGA-Kindern bezüglich des Infektionsrisikos feststellen [36]. Auch eine norwegische unizentrisch rekrutierte Kohorte ELBW-Frühgeborener wies kein

signifikant erhöhtes Sepsisrisiko unter den SGA-Kindern auf [188].

Auf der anderen Seite zeigten Bardin et al. 1997 in einer Kohorte mit einem Gestationsalter < 27 Wochen einen signifikanten Zusammenhang zwischen einem erhöhten Sepsisrisiko und SGA [12]. Gleiches konnten Simchen et al. 2000 bei Kindern mit einem Gestationsalter zwischen der 27. und 35. Woche nachweisen [159]. Eine Studie des German national surveillance system for nosocomial infections (NEO-KISS) stellte ebenfalls ein mit SGA assoziiertes erhöhtes Sepsisrisiko fest, wobei in dieser Studie nur Kinder mit einem Gestationsalter zwischen 24 und 28 Wochen eingeschlossen wurden [13].

Grundsätzlich existieren verschiedene pathogenetische Erklärungsansätze bezüglich des schlechteren klinischen Outcomes von SGA-Frühgeborenen.

Allgemein leiden wachstumsretardierte Kinder häufiger unter chronischer intrauteriner Hypoxie, perinataler Asphyxie, Hypoglykämie und Polyglobulie. Diese Faktoren haben eine schlechtere Sauerstoff- bzw. Energieversorgung der Organsysteme des Kindes zur Folge, was kurz- und langfristig zu einer höheren Komplikationsrate führt. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Azidose und Hypoxie die Surfactantproduktion bzw. -freisetzung beeinträchtigen [124]. Auch der mütterliche Lebensstil während der Schwangerschaft hat einen großen Einfluss auf die Entwicklung des Fetus, sodass z.B. eine mangelhafte Ernährung Auswirkungen auf die Lungenentwicklung des Kindes im Sinne einer veränderten Zusammensetzung der extrazellulären pulmonalen Matrix haben kann. Dies kann bei IUGR-Kindern das pulmonale Langzeit-Outcome verschlechtern [77, 143].

Zudem ist bekannt, dass fetales Wachstum zu großen Anteilen durch das Insulin-like growth factor (IGF) -System beeinflusst wird [38, 109] und dabei IGF-II und der Typ I IGF-Rezeptor eine besonders wichtige Rolle spielen [10, 105]. IGF-II hat einen positiven Effekt auf Geburtsgewicht und Körperlänge, während sich ein hoher Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) -Spiegel negativ auf diese Parameter auswirkt. Smerieri et al. konnten zeigen, dass bei SGA-Kindern bei Geburt die IGF-II-Konzentration im Nabelschnurblut erniedrigt und die IGFBP-2-Konzentration erhöht ist [160].

1.3 Late-Onset-Sepsis

Bei einer Sepsis kommt es durch das Eindringen von Pathogenen in die Blutbahn zu einer systemischen Entzündungsreaktion. Eine Neugeborenensepsis ist definiert als das

Auftreten einer solchen generalisierten Infektion innerhalb der ersten 28 Lebenstage. Infektionswege und Erregerspektrum des Krankheitsbildes unterscheiden sich abhängig von dem zeitlichen Abstand der Infektion zur Geburt, weshalb zwischen einer „Early-Onset-Sepsis“ (EOS) innerhalb der ersten 72 Lebensstunden und einer „Late-Onset-Sepsis“ (LOS), die im Zeitraum zwischen der 72. Lebensstunde und dem Ende des postnatalen Klinikaufenthaltes auftritt, unterschieden wird. Gerade bei sehr kleinen Frühgeborenen kann sich dieser Zeitraum über mehrere Monate erstrecken [47], sodass zusätzlich eine Very-Late-Onset-Sepsis (VLOS) mit einem Auftreten nach dem 60. Lebenstag sowie eine Late-Late-Onset-Sepsis (LLOS), die nach dem 90. Lebenstag auftritt, unterschieden werden [82].

Bei der Early-Onset-Sepsis erfolgt die Infektion des Kindes intrauterin bzw. peripartal, meist im Rahmen eines Amnioninfektionssyndromes der Mutter [163]. Streptokokken der Gruppe B und E.coli stellen die häufigsten Erreger dieser frühen Form der Sepsis dar [87]. In dieser Arbeit soll das Krankheitsbild der Late-Onset-Sepsis bei SGA-Kindern im Zusammenhang mit Risikofaktoren und Immunmechanismen im Fokus der Betrachtungen stehen.

Unter Frühgeborenen steigt das Risiko einer bakteriellen Infektion aufgrund der fehlenden Immunkompetenz im Vergleich zu reifgeborenen Kindern stark an. Unter VLBW-Frühgeborenen liegt die Inzidenz der Late-Onset-Sepsis je nach Studienzentrum zwischen 10% und 30% [110, 168]. Die Mortalität beträgt zwischen 5 und 21% [46, 111].

Die Übertragung nosokomialer Erreger auf das Neugeborene erfolgt häufig postnatal im Rahmen des Aufenthaltes auf einer neonatologischen Intensivstation. Auch die perinatale Besiedlung und spätere Infektion mit mütterlichen Keimen spielt eine Rolle.

Studien unterschiedlicher Zentren haben gezeigt, dass Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) mit etwa 50% die häufigsten Erreger Blutkultur-positiver Late-Onset-Septitiden sind [111, 168]. Dabei sind die Sepsisepisoden, die durch KNS hervorgerufen werden, nur mit einer vergleichsweise geringen Akutmortalität verbunden [111, 167]. Hingegen sind solche mit Nachweis gramnegativer Erreger, wie Pseudomonas oder Klebsiella Spezies, mit einer sehr hohen Mortalität vergesellschaftet [80, 97, 111, 168]. Als Erregerreservoir für die gramnegativen Keime ist der Gastrointestinaltrakt von großer Bedeutung [63].

Neben der Pathogenität der Erreger wurden viele weitere Faktoren diskutiert, die einen Einfluss auf die Mortalität oder auch das allgemeine Risiko einer Sepsis unter VLBW-Frühgeborenen haben könnten. Von herausragender Bedeutung sind dabei Geburtsgewicht

und Gestationsalter, die in vielen Studien eine deutliche negative Korrelation im Bezug auf das Sepsisrisiko bzw. die -mortalität zeigten [47, 52, 111, 168].

Weniger eindeutige Daten existieren bezüglich des Zusammenhangs zwischen Late-Onset-Sepsisrisiko und einem für das Gestationsalter zu geringen Geburtsgewicht (SGA). Eine Zusammenfassung des derzeitigen Forschungsstandes diesbezüglich findet sich in Abschnitt 1.2.

Zusätzlich zu diesen angeborenen, endogenen (patienteneigenen) Faktoren beeinflussen auch behandlungsassoziierte Parameter das Risiko für LOS. So sind sowohl eine invasive Beatmung als auch eine steigende Beatmungsdauer mit einem erhöhten Sepsisrisiko vergesellschaftet [110, 168]. Auch die Verweildauer von venösen und arteriellen Nabelschnurkathetern bzw. zentralvenösen Kathetern [140, 162, 168] und die Länge des stationären Aufenthaltes [30, 52, 168] gelten als unabhängige Prädiktoren.

Außerdem hat der Ernährungsaufbau während der Neonatalperiode Auswirkungen auf das Sepsisrisiko: Je früher mit dem enteralen Ernährungsaufbau begonnen wird bzw. je schneller dieser abgeschlossen ist, desto geringer ist das Risiko einer LOS [46, 52, 68, 95, 162].

Bis heute existieren keine verlässlichen Laborparameter, die eine Sepsis ohne klinischen Verdacht mit hoher Sicherheit im Frühstadium detektieren können. Auch gibt es keinen Index, anhand dessen sich das individuelle Sepsisrisiko eines Neugeborenen ableiten lässt. Dies bedingt, dass weiterhin klinische Sepsiszeichen entscheidend für die (Verdachts-) diagnose bleiben. Hierzu zählen unter anderem Lethargie, eine verminderte periphere Kapillardurchblutung, ein erhöhter Sauerstoffbedarf sowie arterielle Hypotension oder reduzierte Nahrungsverträglichkeit [46]. Da diese Symptome allesamt eher unspezifisch sind, haben Laborparameter wie CrP, IL-6, Leukozytenzahl oder der I/T-Quotient im Blutbild ebenfalls entscheidenden Anteil an der Diagnosefindung [47].

Eine weitere Schwierigkeit ist die Tatsache, dass trotz bestehenden Infektionsverdachts Blutkulturen häufig negativ sind, was unter anderem an falsch negativen Ergebnissen oder abakteriellen Entzündungen liegen kann. Auch geringe Blutvolumina bei der Blutentnahme sowie vorangegangene antibiotische Therapien von Mutter oder Kind können die Aussagekraft der Blutkultur einschränken [47, 85].

Das oben angesprochene NEO-KISS versucht in seiner Definition der Früh- und Neugeborenen-sepsis diese verschiedenen Diagnosebausteine und ihre Besonderheiten zu berücksichtigen, indem es zwischen einer klinischen und einer mikrobiologisch bestätigten

Form der Sepsis unterscheidet. Zusätzlich müssen Septitiden durch KNS und solche durch andere Erreger unterschiedliche Diagnosekriterien erfüllen. Hiermit versucht man der Tatsache Rechnung zu tragen, dass bei KNS-positiven Blutkulturen häufig nicht sicher eine Kontamination ausgeschlossen werden kann (siehe Tabelle 9 im Anhang).

1.4 Grundlagen des Immunsystems und seine Besonderheiten bei Neu- und Frühgeborenen

Die Geburt bedeutet eine dramatische Veränderung der Anforderungen an das frühkindliche Immunsystem. Der Übergang vom sterilen intrauterinen Umfeld in eine Außenwelt, die das Neugeborene stetig mit Pathogenen und anderen körperfremden Antigenen konfrontiert, setzt einen komplexen Adaptationsvorgang voraus. Dieser muss eine effiziente Abwehr und Eliminierung schädlicher Pathogene gewährleisten und gleichzeitig die primäre Besiedlung der Haut und des Gastrointestinaltraktes tolerieren.

Innerhalb des Immunsystems unterscheidet man zwischen einer angeborenen unspezifischen Immunität und einer adaptiven spezifischen Immunität. Beide Systeme sind funktionell eng miteinander verbunden und kommunizieren über ein komplexes System humoraler und zellulärer Faktoren. Der angeborene Teil des Immunsystems ist verantwortlich für die initiale Abwehr von Mikroorganismen und setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen.

Granulozyten, Makrophagen, Monozyten und Killerzellen stellen die zelluläre Komponente der angeborenen Immunität dar. Ihre Funktion besteht in der Phagozytose von körperfremden Antigenen, aber auch in der Antigenpräsentation sowie der Produktion von Zytokinen. Damit spielen diese Zellen neben der Eliminierung schädlicher Erreger auch eine wichtige Rolle als Schnittstelle zum adaptiven Immunsystem. Näheres zur Funktion der Leukozyten findet sich in Abschnitt 1.4.1.

Das Komplementsystem, Akute-Phase-Proteine, Anti-Mikrobielle-Peptide sowie die von den zellulären Bestandteilen gebildeten Zytokine bilden die humorale Komponente.

Das Komplementsystem besteht aus etwa 40 Faktoren, die zum Teil eine zytolytische Aktivität zeigen, aber auch für die Oponierung von Bakterien und die Aktivierung der adaptiven Immunantwort zuständig sind. Die Proteine besitzen katalytische Aktivität und sind in Form einer Kaskade hintereinandergeschaltet, sodass ein Faktor den nächsten aktiviert. Man unterscheidet einen klassischen Weg der Aktivierung über spezifische, an ein Antigen gebundene Antikörper und einen alternativen Weg, der über den spontanen

Zerfall von Komplementfaktor C3 ausgelöst wird. Letzterer spielt besonders bei Frühgeborenen eine Rolle, da bei dieser Gruppe ein Defizit sowohl an eigenen als auch an mütterlichen Antikörpern vorliegt.

Als weiterer Teil des angeborenen Immunsystems seien die physiko-chemischen Haut- und Schleimhaut-Barrieren erwähnt.

T- und B-Zellen sind die Effektorzellen des adaptiven Immunsystems. Die Immunantwort dieser Zellen wird auch als spezifisch bezeichnet, da sie in der Lage sind, eine nahezu unbegrenzte Vielzahl von Antigenepitopen zu erkennen und nach erfolgtem Antigenkontakt durch klonale Selektion ein immunologisches Gedächtnis zu bilden. Dieses gewährleistet bei erneuter Infektion eine schnellere und zielgerichtete Immunreaktion. B-Zellen sind in der Lage, nach Aktivierung Immunglobuline der Klassen IgA, IgG, IgD, und IgM zu produzieren und diese entweder als Antigenrezeptoren auf der Zelloberfläche zu exprimieren oder in Form von Plasmazellen in den Extrazellularraum zu sezernieren, wo sie vorwiegend extrazelluläre Antigene binden. T-Zellen binden Antigene über ihren T-Zell-Rezeptor, der jedoch nur bereits prozessierte Antigene erkennt, die ihm von antigenpräsentierenden Zellen (Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, B-Zellen) präsentiert werden. Abhängig von dem Major Histocompatibility Complex Molekül (MHC), das die antigenpräsentierende Zelle zusammen mit dem Antigen auf ihrer Oberfläche exprimiert, werden entweder CD4-positive T-Helferzellen (MHC II) oder CD8-positive zytotoxische T-Zellen (MHC I) aktiviert. Dieses Aktivierungsmuster prädestiniert T-Zellen für die Bekämpfung intrazellulärer Erreger. CD4-positive T-Zellen können sich nach ihrer Aktivierung zu zwei Arten von T-Effektorzellen ausdifferenzieren, die man als TH1- bzw. TH2-Zellen bezeichnet. TH1-Zellen sind durch die Produktion proinflammatorischer Zytokine (IFN- γ , TNF- α , IL-2) sowie durch ihre eigene Zytotoxizität wichtig für die zellvermittelte Immunität. TH2-Zellen hingegen spielen über die Produktion der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 eine große Rolle bei der Stimulierung der humoralen Immunabwehr.

Sowohl der Fetus als auch das Neugeborene zeigen in der Funktionsweise des Immunsystems Besonderheiten. Grundlegend dominiert die TH2-Immunantwort bei einer erhöhten CD4/CD8-Ratio [58, 101]. Das damit einhergehende TH2-wendige antiinflammatorische Zytokinmuster verhindert eine alloimmune Reaktion der Mutter gegen den Fetus, die sonst durch eine überschießende proinflammatorische TH1-Reaktion drohen würde. Diese physiologische Unterdrückung der zellvermittelten angeborenen

Immunität gewährleistet den Schutz des Kindes während der Schwangerschaft und ermöglicht die postnatale Besiedlung von Haut und Schleimhäuten. Andererseits geht mit der TH2-Polarisierung auch ein erhöhtes Infektionsrisiko sowie eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber den meisten Impfstoffen einher [101].

Sowohl das adaptive als auch das angeborene Immunsystem sind zum Zeitpunkt der Geburt noch nicht voll ausgereift bzw. unterliegen ontogenetischen Besonderheiten, die eine fetomaternale Toleranz ermöglichen. Dies erklärt die erhöhte infektiöse Morbidität und Mortalität unter Neu- und Frühgeborenen im Vergleich zu älteren Kindern und Erwachsenen. Insbesondere die Funktion des adaptiven Immunsystems, dessen Effektorzellen mangels intrauterinem Antigenkontakt noch kein immunologisches Gedächtnis besitzen und eine verringerte Antikörperproduktion zeigen, ist postnatal noch sehr eingeschränkt [2, 166]. Kann dieser Mangel bei reifgeborenen Kindern noch durch die diaplazentare Übertragung mütterlicher spezifischer IgG-Antikörper teilweise kompensiert werden, besteht bei Frühgeborenen häufig zusätzlich ein Mangel an diesen passiv gewonnen Antikörpern, da der Großteil der Übertragung erst nach der 32. Schwangerschaftswoche erfolgt [178].

Auch das angeborene Immunsystem zeigt in der Postnatalperiode eine im Vergleich zum Erwachsenenalter veränderte Immunkompetenz. In Kombination mit der Unreife der spezifischen Immunantwort kommt ihm eine kritische Bedeutung zu, da es nicht nur für den Schutz des frühkindlichen Organismus, sondern auch für die Ausbildung des adaptiven Immunsystems verantwortlich ist [78].

1.4.1 Neutrophile Granulozyten

Viele Studien beschäftigen sich mit der quantitativen und qualitativen Unreife der leukozytären Zellreihe, ihrem Zusammenhang mit prä- und perinatalen Komplikationen sowie ihrer Auswirkung auf das Outcome von Frühgeborenen bzw. SGA-Kindern.

Neugeborene besitzen eine verringerte Reserve an inaktiven granulozytären und monozytären Progenitorzellen, was in Stresssituationen, wie etwa im Rahmen einer Sepsis, zu einem quantitativen Defizit führen kann [101].

Die qualitative Unreife manifestiert sich in einer gestörten Chemotaxis, Adhäsion, Transmigration und Lamellipodienausbildung neonataler neutrophiler Zellen [26, 74, 177]. Verglichen mit Erwachsenen weisen Neugeborene im peripheren Blut einen größeren Anteil unreifer neutrophiler Zellen auf. Diese zeigen eine verminderte Expression des

Komplementrezeptors CR3, bestehend aus den Integrinen CD11b und CD18 [142]. Er ist als pattern recognition receptor (PRR) verantwortlich für die Erkennung von Strukturen auf der Oberfläche von Bakterien oder von Komplementfaktor iC3b, wenn dieser an ein Pathogen gebunden hat. Bindung an den Rezeptor führt in beiden Fällen zur Phagozytose und Destruktion des Erregers. McEvoy et al. konnten zeigen, dass diese Unreife der Chemotaxis neutrophiler Zellen bei Frühgeborenen im Vergleich zu Reifgeborenen noch deutlicher ausgeprägt ist und die Menge des von den Zellen exprimierten CR3 mit steigendem Gestationsalter zunimmt [122].

Neonatale neutrophile Granulozyten zeigen auch Defekte im Bereich mikrobizider Mechanismen. Eine wichtige Rolle spielt dabei das Bacterial/Permeability-Increasing Protein (BPI), welches eine Bindung mit der Lipid-A-Region in der Lipopolysaccharid-Zellmembran gram-negativer Bakterien eingeht. Es wirkt bakterizid über Porenbildung in der äußeren Membran der Bakterien und spielt außerdem eine Rolle bei der Opsonierung von Bakterien sowie der Neutralisierung von proinflammatorischen LPS. BPI wird von neonatalen Granulozyten vermindert exprimiert, was in Stimulationsversuchen mit einer herabgesetzten Potenz neutrophiler Extrakte gegen gramnegative Erreger einherging [100]. Ebenso wurde eine reduzierte Expression des antimikrobiell wirksamen Proteins Lactoferrin in neonatalen Neutrophilen nachgewiesen [4, 54], während Defensine bei Neonaten und Erwachsenen in vergleichbarer Menge produziert werden [100].

Bei Frühgeborenen konnte zudem eine verringerte Oxidase-Aktivität unter Stimulation mit Staphylokokken nachgewiesen werden [17].

Auch das Priming des für die Pathogenerkennung wichtigen CD14-Rezeptors, der neben den Neutrophilen vor allem auf Monozyten exprimiert wird, ist bei Neugeborenen weniger ausgeprägt. Normalerweise führt ein wiederholter LPS-Stimulus über eine Hochregulation der CD14-Expression zu einer verstärkten Oxidase-Aktivität der Neutrophilen. Eine geringere Produktion von CD14 oder die Unfähigkeit der Hochregulation der CD14-Expression nach LPS-Kontakt sind bei Neugeborenen folglich die Ursache der Unreife dieses Priming-Mechanismus [138].

1.4.2 Zytokine

Zytokine sind kleine Signalproteine mit einem Molekulargewicht zwischen 8 und 40 kDa. Abhängig von ihrer molekularen Struktur lassen sich innerhalb der Gruppe der Zytokine verschiedene Subgruppen abgrenzen. Dazu zählen Interferone, Interleukine, Chemokine,

Wachstumsfaktoren und die TNF-Gruppe.

Sie werden als Reaktion auf einen spezifischen Reiz von einer Vielzahl verschiedener Zellen sezerniert und entfalten ihre Wirkung über Bindung an spezifische Zytokin-Rezeptoren. Diese Bindung setzt eine Signaltransduktionskette in Gang, bei der zunächst sogenannte Janus-Kinasen aktiviert werden, die wiederum STAT-Proteine aktivieren. Letztere fungieren als Transkriptionsfaktoren von Genen, die das Wachstum, die funktionelle Differenzierung sowie die Aktivität ihrer Zelle beeinflussen [98, 99].

Zytokine besitzen ein großes biologisches Wirkungsspektrum und sind bei einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse beteiligt. In dieser Arbeit wird vor allem ihre Bedeutung im Zusammenhang mit der Entstehung der neonatalen Sepsis untersucht.

Im Falle einer Infektion des Organismus kommt es zur Expression eines Netzwerkes verschiedener Zytokine, das sowohl pro- als auch antiinflammatorische Mediatoren beinhaltet [44].

Bei der Erkennung eines Erregers spielen Rezeptoren eine Rolle, die bestimmte molekulare Muster in Bestandteilen von pathogenen Mikroorganismen erkennen. Diese Rezeptoren werden als Pattern Recognition Receptors (PRRs) bezeichnet. Zu den wichtigsten PRRs zählt die Familie der Toll-like-Rezeptoren (TLR), aus der einige als Zelloberflächenrezeptoren auf immunkompetenten Zellen sitzen. Einer der am besten erforschten Stimuli für TLRs ist Lipopolysaccharid (LPS), ein Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien, der über die Bindung an TLR-4 die Bildung verschiedener Zytokine induziert [76]. LPS bildet dazu zunächst einen Komplex mit LPS-bindendem Protein (LBP), der anschließend mit einem Co-Rezeptor von TLR-4, dem CD14-Rezeptor, interagiert. Dieser bindet schließlich den TLR-4-MD-2-Rezeptorkomplex. Nur durch Vermittlung von LBP, CD14 und dem myeloiden Differenzierungsfaktor 2 (MD-2) ist TLR-4 in der Lage, LPS zu binden [156, 171]. Nach Aktivierung durch LPS bindet TLR-4 den myeloiden Differenzierungsfaktor 88 (MyD88), ein Adapterprotein, welches anschließend verschiedene Serin-Threonin-Kinasen, sogenannte IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinasen (IRAKs) aktiviert. Diese vermitteln über weitere Zwischenschritte schlussendlich die Aktivierung von NF- κ B [73]. Nach Translokation in den Zellkern induziert dieser Transkriptionsfaktor schließlich die Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α [18]. Die Aktivierung von NF- κ B kann auch durch TLR-2 vermittelt werden, welcher durch Lipoteichonsäure (LTA) grampositiver Bakterien bzw. Proteoglykane aktiviert wird

[171]. Seit Entdeckung der TLRs werden fortwährend neue Liganden entdeckt, sodass die hier genannten Beispiele nur einen Teil des Spektrums zeigen, welches auch Viren, Pilze und verschiedene Protozoen umfasst [176]. Alle diese pathogenen Mikroorganismen können über die Bindung an TLRs die Produktion von Zytokinen induzieren, die in der Folge eine Entzündungsreaktion koordinieren, die die Abtötung des Erregers zum Ziel hat. Im Folgenden soll näher auf die Funktion einzelner Zytokine eingegangen werden, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.

1.4.3 Interleukin 6

Interleukin 6 wird unter anderem von T- und B-Lymphozyten sowie einer Vielzahl nicht-lymphozytärer Zellen wie Monozyten und Makrophagen, aber auch Endothel- und Epithelzellen freigesetzt. Es hat sowohl eine pro- als auch antiinflammatorische Komponente und spielt als Lymphozyten-stimulierender Faktor eine wichtige Rolle beim Übergang von der unspezifischen zur spezifischen Immunantwort. IL-6 regt zudem die hepatische Produktion von Akute-Phase-Proteinen wie CrP und LPB an und beeinflusst die Hämatopoese [5, 21]. Als Pyrogen besitzt es die Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, um dort die Produktion von Prostaglandin E₂ im Hypothalamus anzuregen, was zu einer Erhöhung der Körpertemperatur führt [11, 43]. Zudem aktiviert IL-6 unter Endotoxinwirkung das Koagulationssystem [180].

In der Entzündungskaskade ist es der Wirkung von TNF- α nachgeschaltet. So wird der maximale IL-6 Spiegel im Blut nach Endotoxin-Applikation erst mit einer Latenz von 3-4 Stunden erreicht [32, 91]. IL-6 und die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 beeinflussen dabei gegenseitig ihre Expression: Während IL-6 die Produktion von TNF- α und IL-1 supprimiert, verstärken diese ihrerseits diese Expression von IL-6 [1, 147, 154]. Trotz des Wissens um diese Effekte ist die genaue Rolle von IL-6 in der Pathophysiologie der Sepsis weiterhin unklar. Experimentelle Studien, in denen Antikörper gegen IL-6 oder den IL-6 Rezeptor eingesetzt wurden, zeigten keinen protektiven Effekt, der nicht durch eine Erhöhung der TNF- α Dosen aufgehoben werden konnte [103].

Besondere Bedeutung kommt IL-6 in seiner Funktion als Indikator für die Schwere einer Sepsis und deren Outcome zu. Besser als bei anderen Zytokinen korreliert die Serumkonzentration von IL-6 mit dem Aktivierungsgrad der Zytokinkaskade und damit mit der Schwere einer Infektion [18, 66].

Bei Früh- und Neugeborenen wird es in Kombination mit anderen Laborparametern (CrP)

als diagnostischer Biomarker für eine bakterielle Infektion eingesetzt.

1.4.4 Interleukin 8 (CXCL8)

Interleukin 8 gehört zu der Familie der Chemokine und wird nach der neueren Nomenklatur auch als CXCL8 (für CXC-Motiv-Chemokin 8) bezeichnet [9]. Sowohl Monozyten, neutrophile Granulozyten, Endothelzellen als auch Epithelzellen besitzen die Fähigkeit zur Produktion von IL-8. Zu seiner Freisetzung kommt es unter anderem durch die Wirkung von Endotoxin, aber auch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF- α erhöhen die IL-8 Konzentration im Blut. IL-8 selbst erhöht dabei nicht die Produktion von IL-1, TNF- α oder IL-6 [181]. Die Kinetik von IL-8 ähnelt der von IL-6; der maximale IL-8-Spiegel nach Endotoxin-Injektion wird mit einer Latenz von 2,5-3 Stunden erreicht [91, 181].

Interleukin 8 besitzt zwei Hauptfunktionen: Es dient der chemotaktischen Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten hin zum Ort der Inflammation und stimuliert zusätzlich die Phagozytoseaktivität dieser Zellen. Damit spielt es eine wichtige Rolle für die frühe Phase der angeborenen Immunantwort. Hinzu kommt seine Funktion als Angiogenesefaktor an Endothelzellen, was wiederum Wundheilung und Menstruation, aber auch ein potentielles Tumorwachstum beeinflusst [88, 187].

Sepsispatienten zeigen erhöhte IL-8-Spiegel und ähnlich wie bei IL-6 korreliert auch hier die Serumkonzentration mit der Mortalitätsrate [66, 119]. Auch IL-8 ist als früher Infektionsmarker in der Diagnostik etabliert.

1.4.5 Interleukin 10

Zusammen mit TGF- β stellt Interleukin 10 den antiinflammatorisch wirksamen Teil des Zytokinsystems dar. Es ist von großer Bedeutung für die Begrenzung von inflammatorischen Prozessen und damit für die Verhinderung einer überschießenden Immunantwort. Außerdem spielt es eine Rolle bei der Regulation autoimmuner Prozesse.

Erste experimentelle Studien zeigten, dass TH2-Lymphozyten IL-10 produzieren und damit die Funktion von TH1-Zellen supprimieren [49]. Erst später kam die Erkenntnis hinzu, dass auch die TH2-vermittelte Immunantwort durch IL-10 unterdrückt werden kann [40]. Mittlerweile ist bekannt, dass Interleukin 10 von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems produziert wird,

darunter verschiedene T-Zell-Subpopulationen, B-Zellen, Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Mastzellen und natürliche Killerzellen [130].

Die Unterdrückung der T-Zell-Aktivierung durch IL-10 wird vor allem indirekt über eine Inhibition antigenpräsentierender Zellen (APCs) vermittelt [51]. Durch IL-10 wird die Aktivierung von Makrophagen und Monozyten über die Erkennung von PAMPs herunterreguliert [19, 37]. In der Folge werden weniger proinflammatorische Mediatoren wie IL-1, TNF- α , IL-6 und IL-8 produziert [50]. Das gilt auch für die Zytokine IL-12 und IL-18, welche normalerweise die TH1-Immunantwort stimulieren [65, 113].

Die Funktion der APCs wird dabei jedoch nicht global unterdrückt; einzelne Funktionen werden unter Endotoxinstimulation durch IL-10 auch verstärkt. So stimuliert das Zytokin parallel zur Suppression von IL-1 auch die Induktion des IL-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1Ra) [79].

Auch die Phagozytosefähigkeit von Monozyten wird unter IL-10-Wirkung hochreguliert [25, 165]. Gleichzeitig wird jedoch die Antigenpräsentation eingeschränkt, indem antigenbeladene MHC II-Moleküle in intrazellulären Endosomen zurückgehalten werden [90].

Außerdem wird die Expression der ko-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 herabreguliert [189]. Die beiden letztgenannten Effekte führen dazu, dass die erhöhte Phagozytoseaktivität nicht zu einer konsekutiven Stimulation der Immunantwort über Antigenpräsentation führt, sondern eher eine Entfernung des Antigens vom Ort der Inflammation zur Folge hat. Passend dazu fördert IL-10 die Differenzierung von Monozyten zu einem Typ von Makrophagen, der vor allem auf die Beseitigung von Debris spezialisiert ist, aber kaum Zytokine produziert [65].

Zusätzlich zur Modulation der APCs und der T-Zell-Antwort beeinflusst IL-10 noch weitere Immunfunktionen: Es induziert die Proliferation von Mastzellen, wobei es gleichzeitig die Zytokinproduktion dieser Zellpopulation als Reaktion auf IgE-cross-linking supprimiert, die Histaminfreisetzung dabei aber nicht beeinflusst [7, 118, 173]. Außerdem fördert IL-10 die Proliferation von B-Zellen und deren Differenzierung zu Plasmazellen [39, 60, 146].

Bei der Vermeidung autoimmuner Prozesse spielt IL-10 eine Rolle im Rahmen der Modulierung der Funktion regulatorischer T-Zellen [65].

1.4.6 TNF- α

TNF- α stellt zusammen mit Interleukin-1 β eines der zentralen proinflammatorischen Zytokine dar und ist von essentieller Bedeutung für eine effiziente Immunantwort. TNF- α defiziente Mäuse zeigten beispielsweise eine schlechtere Immunantwort auf *Listeria Monozytogenes* [69, 81, 128].

Studien zur Kinetik von TNF- α konnten zeigen, dass die maximale Serumkonzentration nach Endotoxininjektion bereits nach 60-90 Minuten erreicht wird, was verdeutlicht, dass das Zytokin eine wichtige Rolle bei der initialen Aktivierung der Zytokinkaskade spielt [24, 75, 169]. TNF- α induziert die Produktion weiterer proinflammatorischer Mediatoren wie IL-1 β , IL-6 und IL-8.

Es wird von einer Reihe immunkompetenter Zellen sezerniert, Hauptproduzent sind jedoch Makrophagen. Neben der Induktion der Zytokinantwort hat TNF- α viele weitere biologische Effekte: Es aktiviert phagozytierende Zellen wie etwa Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten, induziert Fieber und die Produktion von Akute-Phase-Proteinen in der Leber. Diese große immunologische Potenz erklärt, warum eine unkontrollierte TNF-Antwort schnell zur Gefahr für das Organsystem des Körpers werden kann. So kann im Rahmen systemischer Infektionen die massive Freisetzung von TNF- α die Entstehung eines Systemic Inflammatory Response Syndromes (SIRS) befördern, was bis zum septischen Schock mit Kreislaufversagen führen kann. Viele der dem SIRS zugrunde liegenden inflammatorischen Effekte von TNF- α können durch seine Wirkung am Gefäßendothel erklärt werden. Über eine Induktion der Expression von Cyclo-Oxygenase 2 kommt es zu einer verstärkten Produktion von vasodilatatorischem Prostaglandin I₂ (PGI₂), was zu einem gesteigerten Blutfluss im Entzündungsgebiet führt [116]. Außerdem erhöht es die Kapillarpermeabilität und Koagulabilität des Blutes [16]. Eigentlich dienen alle diese Mechanismen zusammen mit einer Stimulation der Expression von Adhäsionsmolekülen der Bekämpfung der Infektion durch eine Verbesserung der Migrationsbedingungen für die Effektorzellen des Immunsystems. Bei einer überschießenden proinflammatorischen Reaktion kann es aber auch schnell zu schweren Organschäden mit hämodynamischer Dekompensation, Leukozytopenie, erhöhten Leberenzymen und Koagulopathie kommen [153, 155, 179].

Paviane, die mit anti-TNF-Antikörpern passiv immunisiert wurden, zeigten nach Injektion letaler Dosen Endotoxins eine geringere Morbidität und Mortalität [174].

1.4.7 sCD14-Rezeptor

Wie bereits erwähnt, spielt der CD14-Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Erkennung von bakteriellem LPS. Neben einer membranständigen Form (mCD14) existiert auch eine lösliche Form (sCD14). Diese entsteht entweder durch Abtrennung eines membranständigen CD14-Rezeptors oder wird direkt aus intrazellulären Vesikeln freigesetzt [86]. Studien haben gezeigt, dass insbesondere Hepatozyten die Fähigkeit zur Sekretion von sCD14 besitzen und diese durch IL-6 stimuliert werden kann [14, 106, 131]. Diese Attribute sind charakteristisch für die Gruppe der Akute-Phase-Proteine, was zu der Annahme führte, dass es sich bei sCD14 ebenfalls um ein solches Protein handelt [14]. Passend dazu zeigen auch Patienten im septischen Schock signifikant erhöhte Plasmakonzentrationen von sCD14 [170].

Die eigentliche Bedeutung von sCD14 für physiologische oder pathologische Prozesse ist nicht ausreichend geklärt. Einige Studien zeigten, dass der lösliche Rezeptor mit mCD14 um freies LPS konkurriert und auf diese Weise einen protektiven Effekt durch Inhibition LPS-induzierter Ereignisse hat [70, 71, 149, 150]. Weitere Studien zeigten, dass sCD14 die LPS-induzierte Aktivierung von Zellen vermittelt, die selbst keine CD14-Rezeptoren besitzen [53, 72, 108, 136, 141]. Neben seiner Funktion als Mediator LPS-induzierter Ereignisse beeinflusst sCD14 auch direkt die B- und T-Zell-Aktivität [6, 144].

1.4.8 TGF- β

Von den drei existierenden Isoformen von Transforming growth factor (TGF) beta (beta1, beta2 und beta3) besitzt insbesondere TGF- β 1 eine große Bedeutung für die Regulation immunologischer Prozesse. Die biologische Wirkung der drei Isoformen wird über die Rezeptoren TGF- β Typ 1 und Typ 2 vermittelt. Nahezu alle Zellen des Körpers produzieren und reagieren auf TGF- β ; als Mediator spielt er bei einer Vielzahl verschiedener Prozesse eine wichtige Rolle und beeinflusst Zellproliferation, -differenzierung und -migration [120, 145]. Er ist an der Regulation inflammatorischer Prozesse beteiligt, fördert die Wundheilung und spielt eine Rolle bei der Verhinderung autoimmuner Prozesse [29, 186].

TGF- β wirkt dabei vor allem antiinflammatorisch auf das angeborene Immunsystem. So entwickelten TGF- β 1 Knockout-Mäuse eine multifokale inflammatorische Reaktion mit vermehrter proinflammatorischer Zytokinproduktion und früher Sterblichkeit [92, 157].

Seine antiinflammatorische Wirkung wird zu einem großen Teil über eine Regulation der T-Zell-Antwort vermittelt. Demnach hat TGF- β eine antiproliferative Wirkung auf T-Zellen über eine Unterdrückung der Produktion von IL-2 [84]. Außerdem inhibiert er die Differenzierung aktivierter T-Zellen in Th1- und Th2-Effektorzellen [61]. Neben CD4-positiven T-Zellen beeinflusst TGF- β auch CD8-positiv T-Zellen durch Unterdrückung der Expression von proinflammatorischen Effektormolekülen wie INF-gamma oder Perforin [3, 20, 161].

Neben diesen und vielen weiteren antiinflammatorischen Effekten sorgt TGF- β jedoch unter bestimmten Umständen auch für eine Aktivierung des Immunsystems. So konnte in Studien gezeigt werden, dass CD8-positiv T-Zellen unter bestimmten Bedingungen durch TGF- β zur Proliferation angeregt werden und die TNF- α -Sekretion sowohl in CD4- als auch in CD8-positiven Zellen stimuliert wird [64, 96].

2 Fragestellung

Infektiöse Komplikationen sind im Frühgeborenenalter und in besonderem Maße unter VLBW-Frühgeborenen eine der Hauptursachen für Langzeitmorbidity und Mortalität. Insbesondere die Late-Onset-Sepsis ist trotz vieler Fortschritte in der Supportivtherapie weiterhin ein gefürchtetes Krankheitsbild in der Neonatologie. Die Herausforderung zukünftiger Forschungsansätze besteht darin, die zugrundeliegenden Pathomechanismen zu untersuchen und aus den gewonnenen Erkenntnissen prädiktive Marker und Risikoprofile für dieses Krankheitsbild abzuleiten.

Diese Arbeit widmet sich der Frage, auf welche Weise sich der SGA-Status auf das Risikoprofil Frühgeborener auswirkt, zum einen auf der Ebene der quantitativen Immunantwort, zum anderen hinsichtlich des klinischen Risikos für eine Late-Onset-Sepsis.

Vor diesem Hintergrund wurden folgende Arbeitshypothesen formuliert:

1. SGA-Kinder zeigen im Vergleich mit AGA-Kindern eine temporäre quantitative Defizienz der Immunzellen.

Zur Überprüfung dieser Hypothese soll die Auswertung von Blutbildern einer unizentrisch rekrutierten Kohorte von Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von ≤ 32 Wochen jeweils zum Geburtszeitpunkt sowie am 3. und 7. Lebenstag erfolgen.

2. SGA-Kinder weisen im Vergleich mit AGA-Kindern eine funktionelle Immundefizienz im Sinne eingeschränkter Zytokinexpression als Reaktion auf infektiöse Stimuli auf.

Mit Hilfe eines in-vitro-Modells soll die Zytokinexpression der Kinder aus der o.g. Kohorte verglichen werden. Hierzu werden Vollblutproben mit LPS stimuliert und anschließend per ELISA die Produktion verschiedener pro- und antiinflammatorischer Zytokine gemessen.

3. Kinder mit SGA-Status besitzen ein höheres Risiko als AGA-Kinder an einer Late-Onset-Sepsis zu erkranken.

Diese Hypothese soll anhand der klinischen Daten einer im Rahmen des German Neonatal Network (GNN) rekrutierten großen multizentrischen Kohorte überprüft werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Reagenzien

- Human IL 6, Human CXCL8/IL8 , Human IL 10, Human TNF- α , Human TGF- β 1, Human sCD14, ELISA Kit, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
- Lipopolysaccharid von E. coli, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
- RPMI 1640 mit 2,0 g/L NaHCO₃ ohne L-Glutamin mit Phenolrot, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
- Penicillin/Streptomycin, 10.000 E/10.000 μ g/ML, Biochrom AG, Berlin
- N-Acetyl-L-Alanin-L-Glutamin, 200 mmol/L, Biochrom AG, Berlin
- Nicht-essentielle Aminosäuren, Biochrom AG, Berlin
- Natrium-Pyruvat, 100 mmol/L, Biochrom AG, Berlin
- PBS pH 7,2, Invitrogen, Auckland, New Zealand

3.1.2 Verwendete Materialien

- 6 Well-Platte, Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
- Blutentnahmeröhrchen, S-Monovette[®], SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
- Standard Reaktionsgefäß 1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg
- Standard Reaktionsgefäß 2 ml, Eppendorf AG, Hamburg
- Biosphere Filter Tips, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
- Serologische Pipette 5ml, 25ml, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
- Combitips plus 2,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg

3.1.3 Verwendete Geräte

- Analysegerät ABX Micros 60, Axon Lab AG, Stuttgart
- Sterilbank mit Abzug, Heraeus, Hanau
- Begasungsbrutschrank 6000, Heraeus, Hanau
- Sunrise Absorbance Reader, Tecan, Männedorf, Schweiz
- Minishaker MS 2 IKA[®], IKA- Werke GmbH & Co. KG, Staufen

- Centrifuge 5415 C, Eppendorf AG, Hamburg
- Pipetten Multipette[®] Plus, Eppendorf AG, Hamburg
- Pipetting Aid, Gilson, Middleton, USA

3.1.4 Verwendete Software

- Magellan[™], V5.03, Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
- SPSS[®] 20.0, IBM, München
- Excel[®] Version 14.3.4, Microsoft, Seattle, USA
- Sigma Plot 2000[®] Version 6.0, Graphik Software (SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.)

3.2. Methoden – Einfluss des SGA-Status auf die angeborene Immunantwort

3.2.1 Studienprotokoll

Blutbilder und Zytokinproduktion wurden im Rahmen einer prospektiven Studie anhand einer unizentrisch rekrutierten Kohorte von 149 Frühgeborenen untersucht. Diese kamen im Zeitraum zwischen Januar 2006 und September 2011 in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck zur Welt. Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht < 10. Perzentile wurden als SGA-Frühgeborene definiert.

Die Blutproben für die Blutbilder der Frühgeborenen wurden durch venöse Punktion in der ersten Stunde nach der Geburt sowie am 3. bzw. 7. Tag postnatal jeweils im Rahmen von Routineblutentnahmen gewonnen. Die Differenzierung zwischen Leukozyten und kernhaltigen roten Blutzellen (Normoblasten) wurde mikroskopisch durchgeführt und als Verhältnis Normoblasten/100 Leukozyten sowie in absoluten Zahlen/ μ l angegeben.

Für die Zytokinbestimmung wurde den Frühgeborenen direkt nach Geburt Blut aus der Nabelschnurvene entnommen. Das Blut wurde in Lithium-Heparin-Röhrchen bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von 24 Stunden weiterverarbeitet.

3.2.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Eingeschlossen wurden Frühgeborene mit einem Gestationsalter zwischen 24+0 und \leq 32+0 Wochen. Ausgeschlossen wurden Kinder, bei denen ein Amnioninfektionssyndrom (AIS) Ursache der Frühgeburtlichkeit war.

Als Zeichen für ein AIS wurden eine mütterliche oder fetale Tachykardie, ein schmerzhafter Uterus, übelriechende Amnionflüssigkeit, eine mütterliche Leukozytose bzw. erhöhtes C-reaktives Protein oder eine histologisch gesicherte Chorioamnionitis gewertet.

Auch eine Early-Onset-Sepsis oder letale Fehlbildungen waren Ausschlusskriterien.

Eine Early-Onset-Sepsis wurde dann beim Kind diagnostiziert, wenn zwei Infektionszeichen (erhöhtes C-reaktives Protein, metabolische Azidose, Hyperglykämie, Fieber oder Temperaturinstabilität, Tachy- oder Bradykardie, beeinträchtigte Mikrozirkulation, erhöhte Apnoerate, erhöhter Sauerstoffbedarf) sowie zusätzlich eine positive Blutkultur aus den ersten 72 Lebensstunden vorlagen. Bei fehlender Blutkultur oder negativer Blutkultur wurde eine Early-Onset-Sepsis diagnostiziert, wenn kein anderer Infektionsfokus gefunden wurde und neben dem Vorliegen von zwei der o.a. Infektionszeichen eine mindestens fünftägige Antibiotikatherapie durchgeführt wurde (Definition der klinischen Sepsis nach den NEO-KISS-Kriterien) [59, 195].

3.2.3 Zytokinmessung

3.2.3.1 Herstellung der Mediumlösung

Für die Zytokinmessung wurde RPMI 1640 Medium ohne Glutamin verwendet. Dieses wurde zu gleichen Teilen mit den Zusätzen Penicillin/Streptomycin, N-Acetyl-L-Glutamin, nicht-essentiellen Aminosäuren und Natriumpyruvat versetzt.

Zur Herstellung wurden bei Bedarf 4 ml einer Mischung dieser Zusatzstoffe, die bei -20°C gelagert wurden, zu 96 ml RPMI 1640 in eine sterile Flasche überführt und gemischt. Dieses Medium wurde bei 4°C gelagert und solange verwendet, bis der enthaltene Indikator Phenolrot einen Umschlag in den sauren pH-Bereich anzeigte.

3.2.3.2 Herstellung der Lipopolysaccharid-Stocklösung

Zur Herstellung einer LPS-Lösung, die im Folgenden als Stimulanz diente, wurde zunächst eine LPS-Stocklösung hergestellt. Dazu wurden 10 mg LPS in 10 ml PBS gegeben. 100 µl Aliquots dieser Lösung wurden bei -20°C aufbewahrt und bei Bedarf bei Raumtemperatur aufgetaut. Zur Verwendung als Stimulanz wurden 2 µl dieser Lösung zu 1998 µl des Mediums (siehe Abschnitt 2.1.2) pipettiert und gemischt. Die LPS-Konzentration in dieser Lösung betrug 0,1 µg/ml oder 0,1%.

3.2.3.3 Vollblutkulturansatz

Das den Frühgeborenen im Kreißsaal entnommene Nabelschnurblut wurde unter Raumtemperatur in Lithium-Heparin-Röhrchen aufbewahrt und innerhalb von 24 Stunden weiterverarbeitet.

Mit einem vollautomatischen ABX Micros 60 wurde zunächst die Leukozytenzahl in den Vollblutproben maschinell bestimmt.

Anschließend wurde das Blut zu Volumina in 6-Well-Platten eingesetzt, die jeweils 5×10^6 Leukozyten enthielten. Das Blut wurde in dem unter 3.2.3.1 beschriebenen Medium suspendiert und anschließend mit 167 μl der in 3.2.3.2 beschriebenen LPS-Stocklösung beimpft. Dabei wurde so viel Medium eingesetzt, dass das Endvolumen 5 ml pro Well betrug. Die LPS-Konzentration in der Suspension betrug schließlich 30 ng/ml. Für alle Probanden wurde zusätzlich eine Negativkontrolle angesetzt, die kein Stimulanz, aber ersatzweise ein entsprechendes Volumen an Medium enthielt; auch hier betrug das Endvolumen 5 ml pro Well. Alle Ansätze wurden anschließend bei 37°C und 5% CO₂-Konzentration für 24 Stunden in einem Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden 2 ml des entstandenen Überstandes in ein Eppendorfgefäß überführt und bei -20°C für die spätere Bestimmung der Zytokinkonzentration eingefroren.

3.2.3.4 ELISA-Messung

Zur Messung der Zytokinkonzentrationen in den Überständen der Vollblutansätze wurden diese nach dem Auftauen zunächst kurz zentrifugiert. Anschließend wurden die Zytokine IL-6, IL-8, IL-10 sowie TNF- α , TGF- β und sCD14 mittels kommerzieller ELISA-Kits nach Herstellerprotokoll bestimmt. Die optische Dichte wurde photometrisch mit Hilfe des ELISA reader Spectra Classic bei 450 nm bestimmt. Diese wurde gegen eine Standardkurve aufgetragen.

Für die Messung von IL-6 wurden die unstimulierten Proben unverdünnt eingesetzt. Die LPS-stimulierten Proben wurden mit RPMI-Medium im Verhältnis von 1/100 vorverdünnt, da die mit dem Quantikine ELISA Kit maximal detektierbare Dosis von 300 pg/ml sonst überschritten worden wäre.

Auch IL-8 wurde in den unstimulierten Ansätzen im unverdünntem Zustand gemessen und für die Proben nach Stimulation mit LPS in einem Verhältnis von 1/10 mit Kalibrator Diluent verdünnt; hier betrug die maximal messbare Dosis 2000 pg/ml.

IL-10 (maximal messbare Dosis 500 pg/ml) sowie TGF- β (maximal messbare Dosis 2000

pg/ml) wurden sowohl in den unstimulierten als auch in den mit LPS stimulierten Proben unverdünnt bestimmt.

Zur Bestimmung von TNF- α wurden die Proben unverdünnt gemessen, nach der LPS-Stimulation aber in einer Lösung mit Kalibrator Diluent im Verhältnis 1/10 verdünnt, da die maximal messbare Dosis 1000 pg/ ml betrug.

Die Messung von sCD14 erfolgte in den unstimulierten Ansätzen unverdünnt, die Ansätze mit LPS-Zusatz wurden mit Kalibrator-Diluent im Verhältnis 1/10 vorverdünnt, da die maximal messbare Dosis 16000 pg/ml betrug.

3.3 Methoden – Einfluss des SGA-Status auf das Late-Onset-Sepsisrisiko

3.3.1 Studienprotokoll

Zur Untersuchung der Auswirkungen des SGA-Status auf das Risikoprofil Frühgeborener mit dem Schwerpunkt der Late-Onset-Sepsis wurde eine prospektive, multizentrische Studie im Rahmen des German Neonatal Network (GNN) durchgeführt.

Dieses ist ein gut etabliertes Studiennetzwerk, bestehend aus 50 deutschen neonatologischen Intensivstationen. Das Netzwerk ermöglicht es, Unterschiede in den Behandlungsmodalitäten einzelner Studienzentren zu vergleichen, Interventionsstudien mit großen Kohorten durchzuführen und genetische sowie klinische Risikoprofile von VLBW-Frühgeborenen zu analysieren. Nach Einwilligung der Patienteltern wird für jedes Kind ein festgelegtes Set aus 220 Parametern mit Hilfe eines klinischen Protokolls erfasst. Die Datenqualität wird durch jährliches Monitoring vor Ort durch einen ausgebildeten Neonatologen sichergestellt.

Nach Entlassung der Kinder werden die Protokolle der teilnehmenden Kliniken an das Büro des GNN-Studienzentrums in Lübeck gesandt. Dort werden sie in eine Access-Datenbank eingegeben. Es erfolgt eine Pseudonymisierung der Daten.

Die Outcomes wurden zwischen VLBW-Frühgeborenen mit SGA-Status und solchen mit einem ihrem Gestationsalter entsprechenden Geburtsgewicht (appropriate for gestational age, AGA) verglichen. SGA wurde definiert als ein Geburtsgewicht, das unter der 10. Perzentile für das entsprechende Gestationsalter liegt, gemessen an den geschlechtsspezifischen Standards für das Geburtsgewicht in Deutschland [182]. Das Gestationsalter wurde abhängig vom Auftreten der letzten Menstruationsblutung bestimmt (gynäkologische Einschätzung).

3.3.2 Einschluss- und Ausschlusskriterien

Die Einschlusskriterien des GNN sind: Ein Geburtsgewicht $< 1500\text{g}$ und ein Gestationsalter von $\leq 36+6$ Wochen. Um den statistischen Fehler zu minimieren, der durch Überrepräsentation von SGA-Kindern unter älteren VLBW-Kindern entsteht, führten wir für diese Studie Grenzen für das Gestationsalter ein: Eingeschlossen wurden nur Kinder mit einem Gestationsalter zwischen der 23+0 Woche und $< 32+0$ Woche. Außerdem erstreckte sich die Analyse nur auf Kinder, die zwischen 2003 und 2011 geboren wurden und von denen komplette Datensets bezüglich Sepsis inklusive Erregerspektrum vorlagen. Kinder, die mit letalen Fehlbildungen zur Welt kamen sowie solche mit Early-Onset-Sepsis, wurden in dieser Studie nicht berücksichtigt.

3.4 Methoden - Klinische Outcomes

In beiden Studienteilen dieser Arbeit (siehe 3.2. und 3.3) wurden die klinischen Outcomes unter Verwendung der gleichen Definitionen analysiert.

Die Mortalität wurde definiert als Tod, der nach der Aufnahme auf die neonatologische Intensivstation und vor Entlassung in das häusliche Umfeld eingetreten ist. BPD war definiert als Notwendigkeit einer Sauerstoffsubstitution oder einer assistierten Ventilation zum Zeitpunkt eines post-menstrualen Alters von 36 Wochen. Intraventrikuläre Hämorrhagien (IVH) wurden entsprechend den Ultraschallkriterien von Papile (Studienteil: Einfluss des SGA-Status auf die angeborene Immunantwort) [132] bzw. Volpe (Studienteil: Einfluss des SGA-Status auf das Late-Onset-Sepsisrisiko) [183] diagnostiziert, und eine zystische periventrikuläre Leukomalazie (PVL) entsprach einer periventrikulären Läsion. Zur Diagnose einer nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) musste die Notwendigkeit einer chirurgischen Intervention bestehen [185]. Eine höhergradige Retinopathia praematurorum wurde dann diagnostiziert, wenn eine Behandlung erforderlich wurde [57].

Die Diagnose einer Blutkultur-positiven klinischen Late-Onset-Sepsis bzw. die Diagnose einer Blutkultur-positiven KNS-Sepsis wurde anhand der NEO-KISS-Kriterien gestellt (siehe Tabelle 9 im Anhang) [59, 151].

Als Ursachen der Frühgeburtlichkeit wurden eine vorzeitige Wehentätigkeit, Präeklampsie, ein pathologischer Doppler- oder CTG-Befund, vorzeitige Plazentalösung und andere registriert. Präeklampsie wurde bei schwangeren Frauen mit einem Blutdruck von \geq

140/90 mmHg nach der 20. SSW. und einer signifikanten Proteinurie von ≥ 300 mg/24h diagnostiziert [23].

Außerdem wurde in der großen multizentrischen Kohorte (siehe 3.3) die Zeit, die ein Kind für die vollständige Umstellung auf eine enterale Ernährung (150ml/kg/d) benötigt, erhoben und der Gebrauch von antenatalen Steroiden notiert.

3.5 Ethikvotum

Die Ethikkommission Lübeck äußerte keine Einwände gegen die für diese Arbeit durchgeführten Versuche (08-022; 13-073), die Ethikkommissionen der Studienzentren hatten ebenfalls keine Bedenken gegen die Teilnahme an der multizentrischen Studie. Nach Aufklärung der Eltern gaben diese im Namen ihrer Kinder ihre schriftliche Zustimmung zur Partizipation an der Studie ab.

3.6 Statistik

Für die Datenauswertung wurde das Programm SPSS 20.0 verwendet. Der χ^2 -Test, der exakte Test nach Fisher bzw. der Mann-Whitney U Test wurden zur statistischen Analyse von Unterschieden zwischen Gruppen verwendet. Für die Analyse von Korrelationen in dem Teil der Arbeit, der die Blutbilder bzw. die Zytokinproduktion untersucht, wurde der Spearman-Rho-Test benutzt. Zur Untersuchung von Effekten des SGA-Status, die unabhängig vom Gestationsalter und anderen Confounding-Variablen sind (inklusive Geschlecht, Lungenreifebehandlung, Mehrlingsstatus, Herkunft, Geburt in Perinatalzentrum („Inborn“), Kaiserschnittentbindung, Ursache der Frühgeburtlichkeit, stationäre Aufenthaltsdauer, Dauer der parenteralen Ernährung, Dauer der invasiven Beatmung und prophylaktische Behandlung mit Glycopeptid-Antibiotika), wurde eine multivariable logistische Regressionsanalyse mit schrittweiser konditionaler Exklusion von nichtsignifikanten Parametern durchgeführt. Das Signifikanzlevel wurde mit $P < 0,05$ für einzelne Vergleiche definiert. Das Hosmer-Lemeshow-Modell wurde benutzt, um zu beweisen, dass das Modell für die Daten adäquat ist. Kinder mit unvollständigen Datensätzen wurden von der Regressionsanalyse ausgeschlossen.

4 Ergebnisse

4.1 Zusammenhang des SGA-Status mit der angeborenen Immunantwort von Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von ≤ 32 Wochen

4.1.1 Klinische Charakteristika der Kohorte und Outcome

Von ursprünglich 149 Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von ≤ 32 Wochen, deren Eltern die Einwilligung unterschrieben, wurden 144 in die Studie eingeschlossen. Fünf Patienten wurden ausgeschlossen, davon zwei Kinder aufgrund eines Amnioninfektionssyndroms (AIS, n=2) und drei Kinder wegen einer Early-Onset-Sepsis (EOS, n=3). Die Charakteristika der Studienkohorte sind in Tabelle 1 zusammengefasst. 20 Kinder lagen mit ihrem Geburtsgewicht unterhalb der 10. Perzentile und erfüllten damit das Kriterium für die Definition SGA.

Die Abstammung der Mütter der Studienpatienten setzte sich folgendermaßen zusammen: 131 Kinder hatten Mütter mit europäischer Herkunft, darunter 123 Kinder von Müttern deutscher Herkunft. Die Mütter von zwölf Kindern wurden in der Türkei bzw. dem mittleren Osten geboren, eine Mutter stammte aus Afrika.

SGA- und AGA-Kinder unterschieden sich weder in der Geschlechtsverteilung noch in der Anzahl der Mehrlingsschwangerschaften. Auch der Anteil der Kinder, die per Kaiserschnitt zur Welt kamen sowie der pH-Wert des aus der Nabelschnurarterie entnommenen Blutes unterschieden sich nicht signifikant. Blutproben, die den Probanden während der ersten Lebensstunde entnommen wurden, zeigten keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen bezüglich des Blutglucose- oder CrP-Wertes.

Unterschiede zeigten sich sowohl in Bezug auf Gestationsalter als auch auf Ursachen der Frühgeburtlichkeit: SGA-Kinder hatten ein signifikant geringeres Gestationsalter und kamen häufiger in Folge eines pathologischen Doppler- bzw. CTG-Befundes auf die Welt, während bei AGA-Frühgeborenen meist eine unhemmbare Wehentätigkeit ursächlich war.

Tabelle 1: Klinische Charakteristika, Geburtsmodus und Ursachen der Frühgeburtlichkeit in der Frühgeborenenkohorte mit einem Gestationsalter von ≤ 32 Wochen (n = 144)

	Voigt Perzentile Geburtsgewicht		
	P < 10	P \geq 10	p#
Anzahl Kinder	20	124	
Gestationsalter (MW/Median, SD)	26,9/26,0 +/- 2,8	28,6/29,0 +/-2,3	0,004 *
Geburtsgewicht (MW/median, SD)	625/525 +/- 249	1212/1155 +/- 380	<0,001 *
Geschlecht (männlich, %)	55,0	52,4	0,99
Mehrlinge (%)	10,0	24,2	0,25
Geburt per Kaiserschnitt (%)	100	86,1	0,13
Ursachen der Frühgeburtlichkeit (%)			<0,001
Unhemmbare Wehentätigkeit	20,0	56,4	
Präeklampsie	20,0	4,8	
Pathologisches CTG/Doppler	55,0	12,1	
Plazentalösung	0	2,4	
Andere	5,0	24,2	
Nabelschurblut-pH (MW/median, SD)	7,25/7,23 +/- 0,12	7,18/7,20 +/- 0,08	0,28 *
C-reaktives Protein (MW/median mg/l, SD)	0,2/0,1 +/- 0,2	0,8/0,1 +/- 3,4	0,69 *
Blutzucker-Level 1. Stunde (MW/median mg/dl, SD)	64,5/60 +/- 25,6	76,7/68 +/- 33,8	0,28 *
P-Werte wurden mit dem exakten Test nach Fisher bestimmt wenn nicht anders angezeigt * Mann-Whitney U Test MW = Mittelwert SD = Standardabweichung			

In Tabelle 2 ist die Häufigkeit des Auftretens der zuvor definierten Endpunkte aufgelistet. In der univariaten Analyse schützte Normalgewichtigkeit im Vergleich zu SGA vor Mortalität, BPD, Mortalität oder BPD oder NEC. In der multivariablen Analyse einschließlich Gestationsalter als Risikofaktor bestätigte sich eine unabhängige Empfindlichkeit von SGA-Kindern gegenüber dem kombinierten Endpunkt Mortalität oder BPD.

Tabelle 2: Mortalität und Morbidität der Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von ≤ 32 Wochen, stratifiziert nach Geburtsgewichtspersentilen < 10

	Voigt Perzentile Geburtsgewicht			
	P < 10	P \geq 10	p#	p* / OR (95% CI)
Mortalität (%)	25,0	4,3	0,006	0,26 / 0,4 (0,1-2,0)
BPD (%)	40,0	11,9	0,005	0,1 / 0,4 (0,1-1,2)
Mortalität oder BPD (%)	55,0	14,5	<0,001	0,01 / 0,2 (0,1-0,7)
IVH Grad I-II (%)	15,0	12,8	0,73	0,4 / 1,8 (0,4-7,8)
IVH Grad III-IV (%)	15,0	7,6	0,38	0,7 / 1,3 (0,3 -6,7)
IVH Grad III-IV / PVL (%)	25,0	11,1	0,14	0,8 / 0,8 (0,2 - 3)
NEC mit notwendiger OP (%)	20,0	3,4	0,016	0,15 / 0,3 (0,1 - 1,5)
ROP, therapiebedürftig (%)	10,0	3,4	0,21	0,8 / 0,8 (0,1 - 5,3)
# P-Werte wurden mit dem exakten Test nach Fisher bestimmt				
* P-Werte nach Regressionsanalyse mit Einschluss des Gestationsalters als Kovariate				

4.1.2 Analyse der Differenzialblutbilder

Für die Analyse des Blutbildes wurde den Probanden in der ersten Stunde postnatal sowie am 3. und am 7. Lebenstag Blut abgenommen. Da die Blutentnahmen nur im Rahmen von Routinekontrollen erfolgten, konnte nicht allen Kindern zu jedem vorgesehenen Zeitpunkt Blut entnommen werden.

Sowohl Leukozyten- als auch Neutrophilenzahlen waren zum Zeitpunkt der Geburt, an Tag 3 und an Tag 7 bei SGA-Kindern signifikant niedriger als bei AGA-Kindern (Abbildung 1, 2). Dieses Ergebnis konnte auch in der Subgruppe derjenigen Kinder, deren Mütter keine Präeklampsie hatten, bestätigt werden.

Der SGA-Status beeinflusste Leukozyten- und Neutrophilenzahlen unabhängig vom Gestationsalter bezüglich Tag 1 (Leukozyten: $p < 0,001$, Neutrophile: $p = 0,001$) und Tag 3 (Leukozyten: $p = 0,002$, Neutrophile: $p < 0,001$). Dies galt nicht für Tag 7 (Leukozyten: $p = 0,06$, Neutrophile: $p = 0,05$).

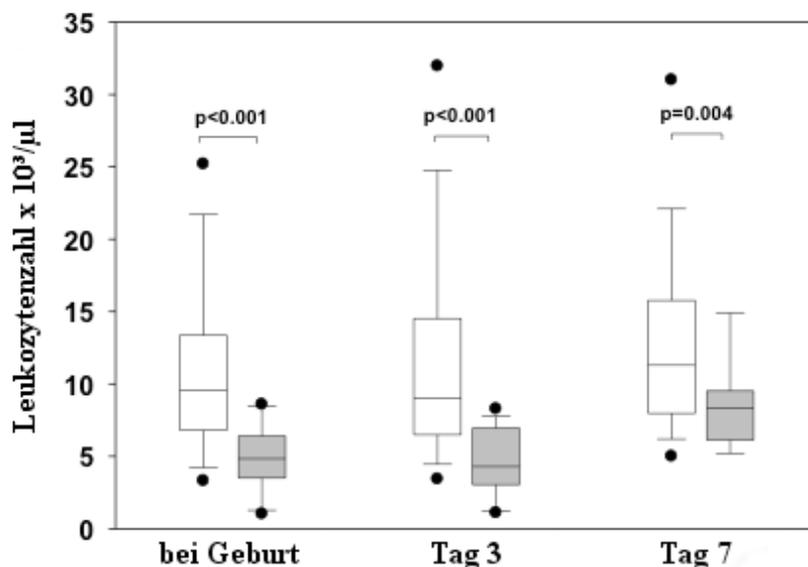


Abbildung 1: Leukozytenzahl in Vollblutproben von SGA- und AGA-Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von ≤ 32 Wochen, bei Geburt, am 3. Lebenstag und am 7. Lebenstag

SGA-Frühgeborene mit einem Gestationsalter von ≤ 32 Wochen (graue Kästen) hatten signifikant niedrigere Leukozytenzahlen bei Geburt, am 3. Lebenstag und am 7. Lebenstag, verglichen mit AGA-Frühgeborenen (weiße Kästen). Daten aus Blutbildern lagen für Tag 1 und Tag 3 von 20 SGA- und 115 AGA-Kindern vor; für Tag 7 von 15 SGA- und 94 AGA-Kindern. Die Daten sind in Form eines Box-Plot-Diagramms dargestellt. Dieses zeigt den Median, Quartilenabstände, das 95%-Konfidenzintervall und „Ausreißer“ als Punkte an. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant gewertet.

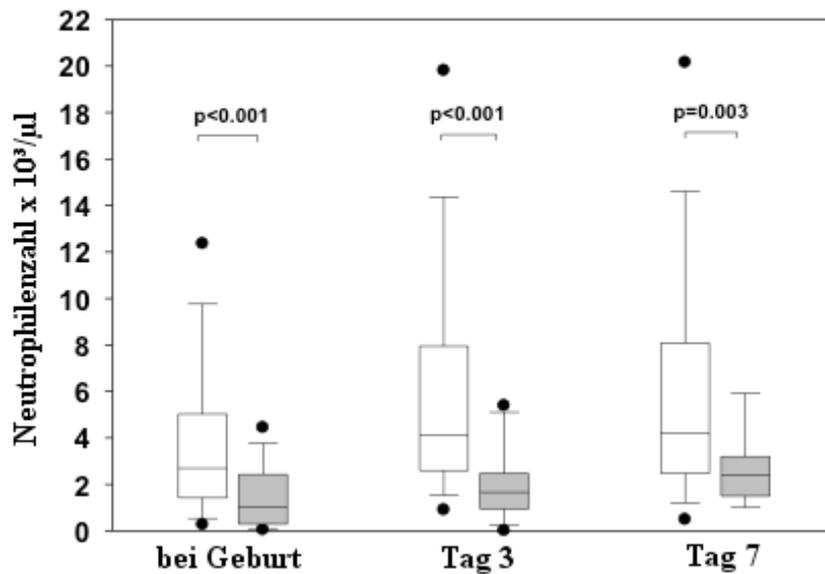


Abbildung 2: Neutrophilenzahl in Vollblutproben von SGA- und AGA-Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von ≤ 32 Wochen, bei Geburt, am 3. Lebenstag und am 7. Lebenstag

SGA-Frühgeborene mit einem Gestationsalter von ≤ 32 Wochen (graue Kästen) hatten signifikant niedrigere Neutrophilenzahlen bei Geburt, am 3. Lebenstag und am 7. Lebenstag, verglichen mit AGA-Frühgeborenen (weiße Kästen). Daten aus Blutbildern lagen für Tag 1 und Tag 3 von 20 SGA- und 115 AGA-Kindern vor; für Tag 7 von 15 SGA- und 94 AGA-Kindern. Die Daten sind in Form eines Box-Plot-Diagramms dargestellt. Dieses zeigt den Median, Quartilenabstände, das 95%-Konfidenzintervall und „Ausreißer“ als Punkte an. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant gewertet.

Während die Thrombozytenzahlen bei SGA-Kindern signifikant erniedrigt waren, zeigte sich bei den Normoblasten bei einer Zählweise von Normoblasten/100 Leukozyten eine signifikante Erhöhung (Abbildung 3 und 4). Nicht-signifikant war hingegen der Unterschied bezüglich der absoluten Zahlen an Normoblasten zwischen beiden Gruppen; hier zeigte sich lediglich ein entsprechender Trend (Normoblasten: SGA $n=20$, Median $4,8/\mu\text{l}$, $\text{SEM} \pm 3,0/\mu\text{l}$, 95% KI: $2,4-15,1/\mu\text{l}$ vs. AGA $n=92$, Median $3,3/\mu\text{l}$, $\text{SEM} \pm 0,7/\mu\text{l}$, 95% KI: $4,3-7,0/\mu\text{l}$; $p=0,1$). Hämoglobinkonzentration und Erythrozytenzahlen unterschieden sich nicht.

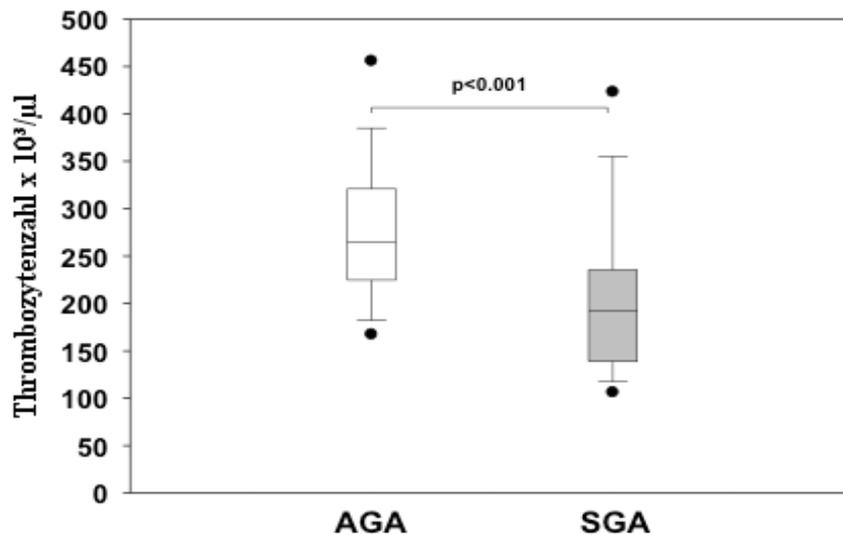


Abbildung 3: Thrombozytenzahl in Vollblutproben von SGA- und AGA-Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von ≤ 32 Wochen

Die Thrombozytenzahl bei Geburt war signifikant niedriger bei SGA-Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von ≤ 32 Wochen (graue Kästen) als bei AGA-Frühgeborenen (weiße Kästen). Daten aus Blutbildern lagen von 20 SGA- und 121 AGA-Kindern vor. Die Daten sind in Form eines Box-Plot-Diagramms dargestellt. Dieses zeigt den Median, Quartilenabstände, das 95%-Konfidenzintervall und „Ausreißer“ als Punkte an. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Ein p-Wert von < 0.05 wurde als signifikant gewertet.

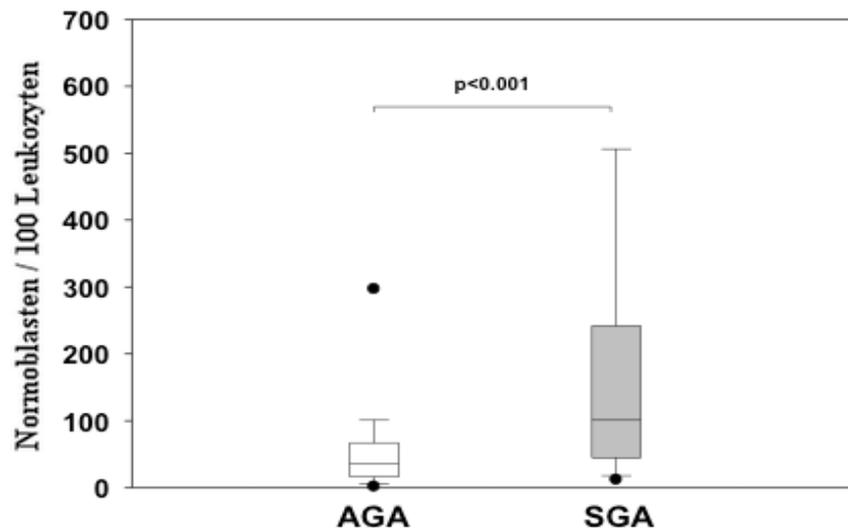


Abbildung 4: Normoblastenzahl/100 Leukozyten in Vollblutproben von SGA- und AGA-Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von ≤ 32 Wochen

Die Normoblastenzahl (Anzahl Normoblasten/100 Leukozyten) bei Geburt war signifikant höher bei SGA-Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von ≤ 32 Wochen (graue Kästen) als bei AGA-Frühgeborenen (weiße Kästen). Daten aus Blutbildern lagen von 20 SGA- und 91 AGA-Kindern vor. Die Daten sind in Form eines Box-Plot-Diagramms dargestellt. Dieses zeigt den Median, Quartilenabstände, das 95%-Konfidenzintervall und „Ausreißer“ als Punkte an. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Ein p-Wert von < 0.05 wurde als signifikant gewertet.

4.1.3 Zytokinproduktion

Zur Messung der Zytokinkonzentration im Nabelschnurblut von Frühgeborenen mit $\leq 32+0$ Wochen wurden Blutvolumina mit einer Leukozytenzahl von 5×10^6 in RPMI-Medium suspendiert, anschließend mit LPS stimuliert und für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 -Konzentration inkubiert. Die Überstände wurden abpipettiert und mittels kommerzieller ELISA-Kits die Konzentrationen von IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , TGF- β und löslichem CD14 gegen eine Standardkurve gemessen. Als Kontrolle lief für jeden Probanden eine unstimulierte Probe mit. Wie in den entsprechenden Grafiken vermerkt, war nicht von allen Probanden eine ausreichende Menge Nabelschnurblut für die Stimulation vorhanden. In den unstimulierten Proben zeigte sich kein Unterschied in der Zytokinproduktion zwischen SGA- und AGA-Kindern.

Dagegen ließ sich bei den SGA-Kindern im Vergleich mit den AGA-Kindern nach Stimulation mit LPS eine signifikant geringere Expression sowohl proinflammatorischer als auch anti-inflammatorischer Zytokine nachweisen.

Auf der Seite der proinflammatorischen Zytokine galt dies für IL-6, wie in Abbildung 5 veranschaulicht, und IL-8 (SGA $n=6$, Median 3749 pg/ml, SE ± 1608 pg/ml vs. AGA $n=60$, Median 16196 pg/ml, SE ± 3669 pg/ml; $p=0,005$).

Bei den antiinflammatorischen Zytokinen fand sich eine verringerte Expression für IL-10, wie in Abbildung 6 veranschaulicht, bzw. TGF- β (SGA $n=6$, Median 164,5 pg/ml, SE $\pm 246,5$ pg/ml vs. AGA $n=60$, Median 998 pg/ml, SE $\pm 152,9$ pg/ml).

Bezüglich TNF- α und sCD14 fand sich kein Unterschied zwischen beiden Gruppen.

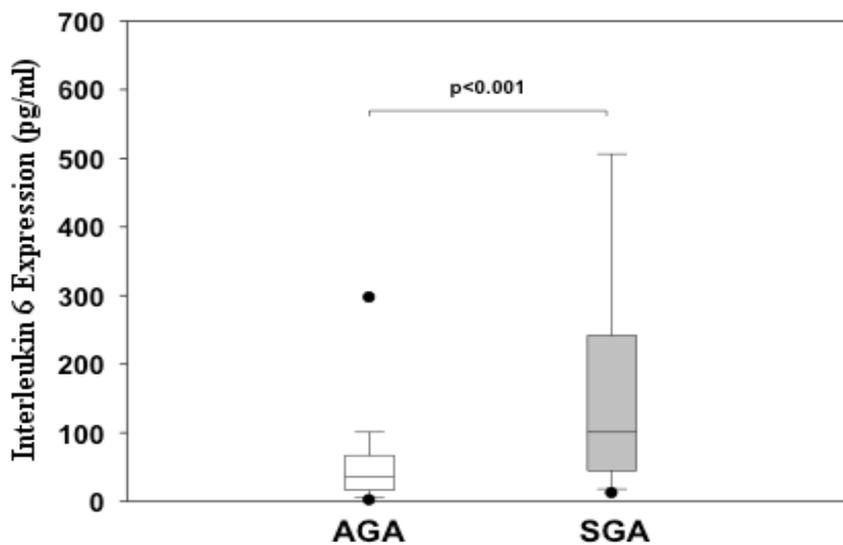


Abbildung 5: Interleukin 6 Expression nach LPS-Stimulation in Vollblutkulturansätzen von SGA- und AGA-Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von ≤ 32 Wochen

Die Interleukin 6 Expression nach LPS-Stimulation wurde mit Hilfe des ELISA-Verfahrens in Vollblutproben gemessen. SGA-Frühgeborene mit einem Gestationsalter von ≤ 32 Wochen (graue Kästen) zeigten eine signifikant niedrigere IL-6 Expression als AGA-Frühgeborene (weiße Kästen). Es lagen Datensätze von 10 SGA- und 100 AGA-Frühgeborenen vor. Die Daten sind in Form eines Box-Plot-Diagramms dargestellt. Dieses zeigt den Median, Quartilenabstände, das 95%-Konfidenzintervall und „Ausreißer“ als Punkte an. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Ein p-Wert von < 0.05 wurde als signifikant gewertet.

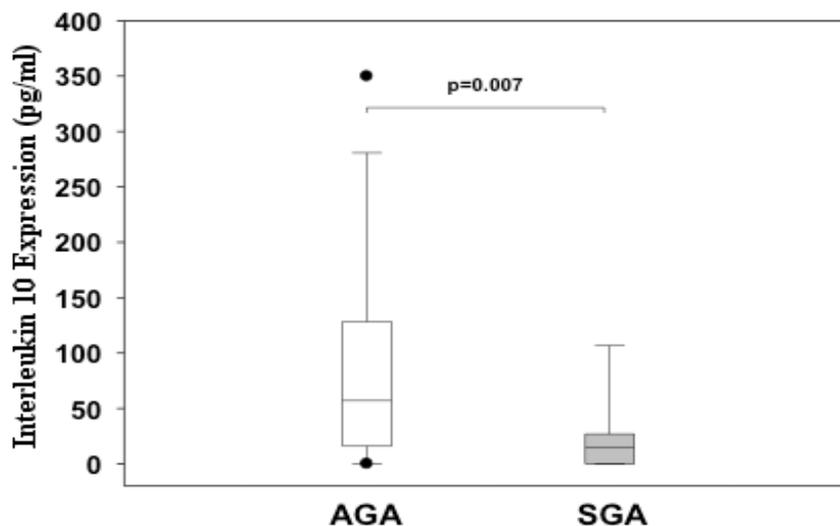


Abbildung 6: Interleukin 10 Expression nach LPS-Stimulation in Vollblutkulturansätzen von SGA- und AGA-Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von ≤ 32 Wochen

Die Interleukin 10 Expression nach LPS-Stimulation wurde mit Hilfe des ELISA-Verfahrens in Vollblutproben gemessen. SGA-Frühgeborene mit einem Gestationsalter von ≤ 32 Wochen (graue Kästen) zeigten eine signifikant niedrigere IL-10 Expression als AGA-Frühgeborene (weiße Kästen). Es lagen Datensätze von 10 SGA- und 94 AGA-Frühgeborenen vor. Die Daten sind in Form eines Box-Plot-Diagramms dargestellt. Dieses zeigt den Median, Quartilenabstände, das 95%-Konfidenzintervall und „Ausreißer“ als Punkte an. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Ein p-Wert von < 0.05 wurde als signifikant gewertet.

Für die Expression von IL-6, IL-10 und TGF- β unter LPS-Stimulation fand sich zudem eine positive Korrelation mit dem Gestationsalter (IL-6: $R=0,32$, $p<0,001$; IL-10: $R=0,37$, $p<0,001$; TGF- β : $R=0,46$, $p<0,001$). Per Regressionsanalyse wurde deshalb überprüft, ob der Einfluss von SGA auf die Zytokinexpression auch ohne den Effekt des Gestationsalters Bestand hat. Dazu wurde der Median der Zytokinkonzentration der SGA-Kinder als Cut-Off für die Kategorische Stratifizierung benutzt. Dabei zeigte sich, dass das Gestationsalter unabhängig mit der Expression von IL-6 (OR: 1,3, 95% KI: 1,1-1,7, $p=0,007$) und IL-10 (OR: 1,5, 95% KI: 1,2-1,8, $p<0,001$) assoziiert war. Dies galt nicht für TGF- β und IL-8. Passend dazu beeinflusste der SGA-Status unabhängig die IL-6- (OR: 5,3, 95% KI: 1,3-20,8, $p=0,02$) und IL-10-Expression (OR: 5,4, 95% KI: 1,2-24, $p=0,03$). Dies galt hier ebenfalls nicht für TGF- β und IL-8.

4.2 Zusammenhang des SGA-Status mit dem Risiko für eine Late-Onset-Sepsis VLBW-Frühgeborener

4.2.1 Klinische Charakteristika der Kohorte

Insgesamt kamen zwischen Januar 2003 und Dezember 2011 8504 VLBW-Kinder für die Studienteilnahme in Frage. Bei 1747 Kindern wurde den Eltern keine Teilnahme an der Studie angeboten. In den meisten dieser Fälle hatte der behandelnde Arzt die Studieneignung nicht in Erwägung gezogen oder vergessen, die Eltern zu fragen. Außerdem kam es in vielen Fällen durch frühes Versterben der Kinder zur Nichtteilnahme. In 90 Fällen lehnten die Eltern die Studienteilnahme ab und in 44 Fällen konnte durch substantielle Verständigungsprobleme mit den Eltern keine Aufklärung erfolgen. Bei 674 Kindern liegen keine Informationen darüber vor, warum sie nicht in die Studie eingeschlossen wurden. Schlussendlich wurden 63 Kinder nicht eingeschlossen, da keine Informationen bezüglich des Sepsis-Outcomes oder den Ergebnissen von Blutkulturen dokumentiert waren.

So konnten 5886 Kinder (69%) der ursprünglich in Frage kommenden VLBW-Frühgeborenen für GNN rekrutiert werden. Davon erfüllten 692 Kinder die Kriterien für SGA, während 5194 Kinder nach der verwendeten Definition als AGA galten. Die klinischen Charakteristika der Kohorte sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Die SGA-Gruppe hatte ein signifikant geringeres Geburtsgewicht und Gestationsalter. SGA-Kinder kamen signifikant häufiger per Kaiserschnitt zur Welt und die zur Geburt führenden Schwangerschaftskomplikationen waren signifikant unterschiedlich verteilt: Während in der SGA-Gruppe häufiger ein pathologischer CTG- bzw. Dopplerbefund die frühzeitige Geburt bedingte, war bei AGA-Probanden meist eine unhemmbare Wehentätigkeit bzw. ein AIS ursächlich. Zusätzlich wies die SGA-Gruppe eine geringere Wahrscheinlichkeit für Mehrlingsschwangerschaften auf und zeigte einen leicht erniedrigten Nabelschnurblut-pH mit entsprechend negativerem Base Excess. Die Apgar-Werte nach 5 bzw. 10 Minuten unterschieden sich nicht.

Tabelle 3: Klinische Charakteristika der VLBW-Kohorte mit einem Gestationsalter von 23+0 bis 31+6 Wochen, stratifiziert nach Geburtsgewichtsperszentilen < 10 (n=5886)

	Voigt Perzentile Geburtsgewicht		
	P < 10	P ≥ 10	p#
Anzahl Kinder	692	5194	
Gestationsalter (Wochen) * (MW/Median, SD)	27,7/27,7 +/- 2,6	28,2/28,3 +/- 2,6	<0,001
Geburtsgewicht (g) * (MW/Median, SD)	647/590 +/- 215	1073/1090 +/- 266	<0,001
Geschlecht (männlich, %)	52,0	52,1	0,97
Mehrlinge (%)	19,1	34,4	<0,001
Mütterliche Herkunft			0,6
Deutschland (%)	72,6	73,6	
Europa/Russland (%)	11,1	10,3	
Mittlerer Osten/ Türkei (%)	10,5	10,6	
Asien (%)	2,5	1,7	
Afrika (%)	2,3	2,5	
Geburt per Kaiserschnitt (%)	91,3	81,0	<0,001
Inborn (%)	97,5	95,3	0,006
Ursachen der Frühgeburtlichkeit (%) #			
Unhemmbare Wehentätigkeit	10,4	40,1	<0,001
Präeklampsie	11,3	7,9	0,002
HELLP	16,3	7,2	<0,001
Pathologisches CTG	38,5	18,5	<0,001
Pathologischer Doppler	65,4	12,3	<0,001
Plazentalösung	4,3	7,7	0,002
AIS	7,4	26,7	<0,001
P-Werte wurden mit dem χ^2 -Test bestimmt wenn nicht anders angezeigt * Mann-Whitney U Test # mehr als eine Ursache für die Frühgeburtlichkeit möglich MW = Mittelwert SD = Standardabweichung			

4.2.2 Risiko für Late-Onset-Sepsis

Sowohl für die Late-Onset-Sepsis als auch für alle anderen Outcomes wurde eine Stratifizierung durch Aufteilung der Kohorte in Gruppen nach Gestationsalter durchgeführt (siehe Abbildung 7 bzw. Tabellen 6-8). SGA-Kinder zeigten ein signifikant höheres Risiko für eine Blutkultur-positive Late-Onset-Sepsis als AGA-Kinder (20,1% vs. 14,3%, $p < 0,001$). In der Folge wurde der Anteil verschiedener Erregergruppen als Verursacher dieser Septitiden untersucht (siehe Tabelle 4). Es zeigte sich, dass das vermehrte Auftreten vor allem durch eine höhere Inzidenz von Sepsis-Episoden mit gram-positiven Erregern bedingt war (16,2% vs. 11,4%, $p < 0,001$), während sich bei den gram-negativen Bakterien kein Unterschied zwischen SGA- und AGA-Kindern finden ließ (4,0% vs. 3,7%, $p = 0,66$). Unter den gram-positiven Bakterien waren vor allem Koagulase-negative Staphylokokken für die signifikant unterschiedlich verteilten Häufigkeiten zwischen SGA- und AGA-Kindern verantwortlich (12,8% vs. 8,3%).

Unterschied sich das Sepsisrisiko in der gesamten Kohorte signifikant, so ließ sich dieser Effekt in den für das Gestationsalter stratifizierten Gruppen nur im Bereich eines Gestationsalters von 29 bis < 32 Wochen feststellen.

Zusätzlich wurden die Daten einer Subgruppe der Studienkohorte analysiert, die 5561 VLBW-Frühgeborene mit vollständigen Datensätzen bezüglich multipler Sepsisepisoden (bis zu einem Maximum von drei Episoden) umfasste. Es zeigte sich, dass bei 6 von 633 SGA-Frühgeborenen (0,9%) eine zweite mit positiver Blutkultur bestätigte Sepsisepisode auftrat, während dies in der AGA-Gruppe auf 37 von 4928 Kindern (0,8%) zutraf. Drei Episoden wurden für 4 von 633 Kindern (0,4%) in der SGA- und 15 von 4928 (0,3%) in der AGA-Gruppe dokumentiert.

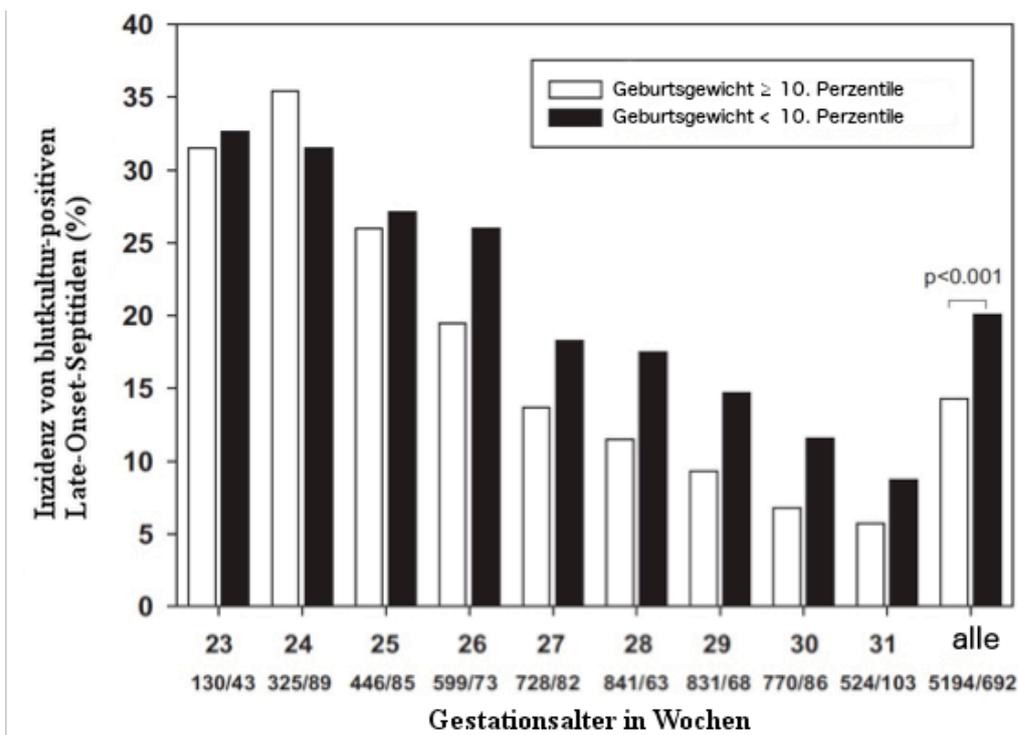


Abbildung 7: Inzidenz von Blutkultur-positiven Late-Onset-Septitiden bei SGA-Kindern verglichen mit AGA-Kindern, stratifiziert nach Gestationsalter

Tabelle 4: Erregerspektrum der Late-Onset-Sepsis-Episoden

	Voigt Perzentile Geburtsgewicht		
	P < 10	P ≥ 10	p#
Anzahl Kinder	692	5194	
Pathogen in Blutkultur [Zahl der Episoden, (%)]			
KNS	89 (12,8)	426 (8,3)	<0,001
Gruppe B Streptokokken	4 (0,6)	28 (0,5)	0,78
Staphylokokkus aureus	17 (2,5)	104 (2,0)	0,39
Enterokokken species	9 (1,3)	59 (1,1)	0,70
Andere Streptokokken	1 (0,1)	9 (0,2)	>0,99
Pneumokokken	1 (0,1)	0	0,12
Escherichia coli	6 (0,9)	71 (1,4)	0,37
Klebsiella species	11 (1,6)	57 (1,1)	0,25
Enterobacter cloacae	10 (1,4)	45 (0,9)	0,14
Serratia	1 (0,1)	6 (0,1)	0,58
Proteus mirabilis	0	3 (0,1)	>0,99
Pseudomonas aeruginosa	0	13 (0,3)	0,39
Listeria monocytogenes	0	3 (0,1)	>0,99
Candida	9 (1,3)	32 (0,6)	0,05
ESBL E.coli	0	3 (0,1)	>0,99
Andere	25 (3,6)	87 (1,7)	0,002
P-Werte wurden mit dem exakten Test nach Fisher bestimmt			

4.2.3 Behandlungsmodalitäten

Um eine Aussage über mögliche behandlungsassoziierte Risikofaktoren treffen zu können, wurden verschiedene klinische Parameter erfasst. Die Daten hierzu sind in Tabelle 5 zusammengefasst. SGA-Kinder waren vergleichsweise signifikant länger hospitalisiert und invasiv beatmet. Sie benötigten beim enteralen Nahrungsaufbau mehr Zeit; eine vollständige enterale Nahrungsaufnahme galt ab einer Menge von 150ml/kg/d als erreicht.

Frühgeborene mit NEC/FIP wurden für die Analyse dieses Parameters ausgeschlossen. Des Weiteren wurden in der SGA-Gruppe häufiger zentralvenöse Katheter verwendet als in der AGA-Gruppe. Eine antimikrobielle Prophylaxe mit Fluconazol bzw. mit Vancomycin oder Teicoplanin wurde häufiger in der SGA-Gruppe verabreicht. Auch bekamen sie öfter Reserveantibiotika, wie z.B. Carbapeneme.

Zudem wurden Daten von den VLBW-Frühgeborenen analysiert, die Glykopeptid-Antibiotika zur Prophylaxe Katheter-assoziiertes Sepsisrisiko verabreicht bekamen (n=523). In dieser Subgruppe zeigte sich kein Unterschied bezüglich des Late-Onset-Sepsisrisikos von SGA- (17/100, 17%) im Vergleich zu AGA-Frühgeborenen (60/423, 14,2%; p=0,48).

Tabelle 5: Behandlungsmodalitäten der VLBW-Kohorte mit potentiellm Einfluss auf das Sepsisrisiko

	Voigt Perzentile Geburtsgewicht		
	P < 10	P ≥ 10	p#
Anzahl Kinder	692	5194	
Dauer der Hospitalisierung (d) (MW/Median/SD)	95,8/89/51,8	72,3/66/34,8	<0,001
Dauer der parenteralen Ernährung (d) (MW/Median/SD)	22/17/18 20/16/13 *	17/14/14 16/13/12 *	<0,001 <0,001
Dauer der invasiven Beatmung (d) (MW/Median/SD)	17,5/4/33,5 27,7/13/38,6 #	7,1/1/16,5 14,2/6/21 #	<0,001 <0,001
Zentralvenöse Katheter (%)	72,7	53,6	<0,001
Einsatz von Reserve-Antibiotika (%)	34,0	17,2	0,012
Prophylaxe mit Fluconazol (%)	19,0	8,4	<0,001
Prophylaxe mit Vancomycin oder Teicoplanin (%)	14,5	8,2	<0,001
P-Werte mit dem exakten Test nach Fisher bzw. dem Mann-Whitney U Test bestimmt * 568 vs. 4634 Kinder, VLBW-Kinder mit NEC/FIP ausgeschlossen # 426 vs. 2628 Kinder, VLBW-Kinder ohne tracheale Beatmung ausgeschlossen MW = Mittelwert SD = Standardabweichung			

4.2.4 Unabhängige Risikofaktoren für eine Late-Onset-Sepsis bei VLBW-Kindern

In einem weiteren Schritt wurden per Regressionsanalyse potentielle Faktoren analysiert, die einen Einfluss auf das Late-Onset-Sepsisrisiko gehabt haben könnten, darunter Gestationsalter, SGA, Geschlecht, Herkunft, antenatale Steroidgabe, Mehrlingsschwangerschaften, Geburt im Perinatalzentrum („inborn“), Geburt per Kaiserschnitt, Ursachen der Frühgeburtlichkeit, prophylaktische Gabe von Glykopeptidantibiotika oder Fluconazol bzw. Dauer der parenteralen Ernährung. Der Hosmer-Lemeshow P-Wert für diesen Test betrug 0,58. Dabei zeigte sich, dass ein höheres Gestationsalter (pro Woche; OR: 0,75, 95% KI: 0,72-0,78, $p < 0,0001$), eine pränatale Behandlung mit Steroiden (OR: 0,7, 95% KI: 0,53-0,92, $p = 0,01$), eine deutsche Herkunft (OR: 0,76, 95% KI: 0,63-0,91, $p = 0,003$) und die prophylaktische Behandlung mit Glykopeptidantibiotika (OR: 0,64, 95% KI: 0,47-0,87, $p = 0,005$) jeweils unabhängig voneinander einen protektiven Effekt auf das Sepsisrisiko hatten.

Zusätzlich zu einer längeren Dauer parenteraler Ernährung (pro Tag; OR: 1,016, 95% KI: 1,011-1,021, $p < 0,0001$) blieb auch der SGA-Status nach dem Ausschluss anderer Einflussfaktoren als unabhängiger Risikofaktor bestehen (OR: 1,31, 95% KI: 1,02-1,68, $p = 0,03$).

4.2.5 Andere Endpunkte

In der gesamten Kohorte trugen SGA-Kinder auch für andere Outcomes als die Late-Onset-Sepsis ein höheres Risiko. Dies galt für Mortalität, BPD, NEC, PDA und ROP, wie in den Tabellen 6-8 dargestellt. Nach Stratifizierung in Gruppen nach Gestationsalter zeigte sich, dass SGA in allen Gruppen ein erhöhtes Mortalitätsrisiko bzw. ein erhöhtes Risiko für eine BPD nach sich zog. Bei der ROP galt dies nur für die Gruppen mit einem Gestationsalter < 29 Wochen. Bei den Endpunkten IVH Grad III + IV zeigten dagegen AGA-Kinder mit einem Gestationsalter von < 27 Wochen ein höheres Risiko; Dies galt außerdem für das Risiko einer PVL in der AGA-Gruppe mit einem Gestationsalter zwischen 23+0 und 24+6 Wochen (siehe Tabelle 6).

In einer Subgruppe der Studienkohorte, welche 117 zwischen 2010 und 2011 verstorbene Kinder umfasst, zeigten die Daten, dass unter den SGA-Kindern 8 von 41 (19,5%) und in der AGA-Gruppe 17 von 76 (22,4%) an einer Sepsis verstarben. Unter diesen insgesamt 25 Sepsis-bedingten Todesfällen wurde in 14 Fällen eine positive Blutkultur dokumentiert.

Tabelle 6: Outcome-Daten der Frühgeborenen mit einem Gestationsalter zwischen 23+0 ≤ 26+6 Wochen, stratifiziert nach SGA

	23 + 0 bis 24 + 6 Wochen			25 + 0 bis 26 + 6 Wochen		
	Ja (n=132)	Nein (n=455)	p#	Ja (n=158)	Nein (n=1045)	p#
Outcome SGA (Perzentile < 10)						
Late-Onset-Sepsis (%)	31,8	34,3	0,59	26,6	22,3	0,23
Mortalität (%)	26,2	11,3	<0,001	11,4	5,1	<0,002
BPD (%)	47,3	39,8	0,13	58,0	27,1	<0,001
Mortalität oder BPD (%)	66,7	49,3	<0,001	65,0	31,2	<0,001
IVH Grad III-IV (%)	9,2	16,3	0,04	6,4	14,9	0,005
PVL (%)	3,1	8,6	0,03	3,2	5,6	0,22
Notwendige OP (%)						
PDA	16,7	20,6	0,31	12,0	9,3	0,29
NEC/FIP	18,6	14,9	0,31	12,0	9,3	0,29
ROP	25,0	16,0	0,02	15,9	5,8	<0,001

Tabelle 7: Outcome-Daten der Frühgeborenen mit einem Gestationsalter zwischen 27+0 ≤ 31+6 Wochen, stratifiziert nach SGA

	27 + 0 bis 28 + 6 Wochen			29 + 0 bis 31 + 6 Wochen		
	Ja (n=145)	Nein (n=1569)	p#	Ja (n=257)	Nein (n=2125)	p#
Outcome SGA (Perzentile < 10)						
Late-Onset-Sepsis (%)	17,9	12,6	0,06	11,3	7,3	0,02
Mortalität (%)	10,3	1,4	<0,001	1,2	0,3	0,05
BPD (%)	41,4	11,3	<0,001	15,3	4,7	<0,001
Mortalität oder BPD (%)	48,3	12,5	<0,001	16,5	5,0	<0,001
IVH Grad III-IV (%)	4,2	6,0	0,46	2,3	1,6	0,30
PVL (%)	2,8	4,1	0,45	0,8	2,3	0,12
Notwendige OP (%)						
PDA	4,2	3,3	0,55	2,7	0,3	<0,001
NEC/FIP	4,9	3,6	0,46	1,9	1,2	0,33
ROP	6,2	1,1	<0,001	0,8	0,2	0,13

Tabelle 8: Outcome-Daten der Gesamtkohorte mit einem Gestationsalter zwischen 23+0 ≤ 31+6 Wochen, stratifiziert nach SGA

	Alle Kinder 23 + 0 bis 31 + 6 Wochen		
	Ja (n=692)	Nein (n=5194)	p#
Outcome SGA (Perzentile < 10)			
Late-Onset-Sepsis (%)	20,1	14,3	<0,001
Mortalität (%)	10,1	2,6	<0,001
BPD (%)	36,6	14,3	<0,001
Mortalität oder BPD (%)	43,7	16,4	<0,001
IVH Grad III-IV (%)	4,9	6,8	0,07
PVL (%)	2,2	4,0	0,01
Notwendige OP (%)			
PDA	7,8	4,8	0,001
NEC/FIP	8,1	4,8	<0,001
ROP	9,9	3,0	0,001
P-Werte wurden mit dem exakten Test nach Fischer bestimmt			

5 Diskussion

Die Forschung im Bereich der Neonatologie konnte im Verlauf der letzten Jahrzehnte zahlreiche Faktoren identifizieren, die einen Einfluss auf das Outcome von Frühgeborenen haben. Infektiöse Komplikationen zählen in dieser Patientengruppe zu den Hauptursachen für die perinatale Morbidität und Mortalität. Das Verständnis, auf welche Weise immunologische Prozesse eine systemische Inflammation eindämmen oder verstärken können, ist daher essentiell, um zukünftig neue Konzepte zur Prävention und Therapie infektiologischer Komplikationen entwickeln zu können.

Einige Risikofaktoren der neonatalen Sepsis, wie etwa ein geringes Gestationsalter oder ein niedriges Geburtsgewicht, konnten bereits Anfang der neunziger Jahre sicher identifiziert werden. Der SGA-Status galt dagegen noch in den siebziger und achtziger Jahren als protektiver Faktor für das Outcome von Frühgeborenen. Erst seit einigen Jahren mehrten sich die Anzeichen, dass SGA-Kinder ein höheres Mortalitäts- und Morbiditätsrisiko aufweisen als Kinder mit einem ihrem Gestationsalter entsprechenden Geburtsgewicht. Bezüglich der Late-Onset-Sepsis fehlen jedoch große multizentrische Studien, um einen Zusammenhang zwischen SGA-Status und dem Risiko infektiologischer Komplikationen aufzuzeigen.

Diese Arbeit beschäftigte sich in zwei Teilabschnitten zunächst mit der quantitativen Immunantwort SGA-Frühgeborener (unizentrische Lübecker Kohorte), um anschließend anhand der Daten eines großen multizentrischen Kollektivs von VLBW-Frühgeborenen eine Aussage über das SGA-assoziierte Sepsisrisiko zu treffen.

SGA-Status und Leukozytenzahlen im postnatalen Verlauf

Ausgangspunkt zum ersten Teilaspekt der Arbeit bildete die Hypothese, dass SGA-Frühgeborene im Vergleich zu AGA-Frühgeborenen ein quantitatives Defizit im Bereich der angeborenen zellulären Immunantwort zeigen. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde bei einer Kohorte von 144 Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von ≤ 32 Wochen jeweils nach Geburt am 3. sowie am 7. Lebenstag Blut abgenommen und anschließend die Leukozyten- und Neutrophilenzahl sowie die Thrombozyten- und Normoblastenzahlen bestimmt.

Eine quantitative Defizienz bei den Leukozytenzahlen SGA-Frühgeborener wurde bereits

2010 in einer Studie nachgewiesen [190], allerdings erfolgten die Blutentnahmen hier nur in den ersten zwei Stunden postnatal. In der vorliegenden Arbeit konnte für jeden der o.g. Untersuchungszeitpunkte bei den SGA-Kindern eine quantitative Defizienz sowohl für die Gesamtzahl an Leukozyten als auch isoliert für die neutrophilen Zellen nachgewiesen werden.

Dies zeigt, dass die im Vergleich zu AGA-Kindern geringeren Zellzahlen keineswegs nur ein akutes Phänomen sind, welches nur direkt nach der Geburt auftritt, sondern dass sie über mehrere Tage des postnatalen Verlaufs nachweisbar bleiben. Einschränkend sei erwähnt, dass nach der Korrektur der Ergebnisse für das Gestationsalter dieser Unterschied nur noch für den 3. postnatalen Tag und nicht mehr für den 7. Tag nachweisbar war.

Neben dem SGA-Status ist eine postnatale Leukopenie häufig auch mit einer mütterlichen Präeklampsie assoziiert [127]. Procianoy et al. zeigten 2010, dass der SGA-Status, unabhängig von einer parallel vorliegenden Präeklampsie, mit niedrigen Neutrophilenzahlen assoziiert ist [135]. Auch die Ergebnisse dieser Arbeit stützen diese Erkenntnis.

Weiterhin unklar bleibt die Bedeutung niedriger postnataler Leukozytenzahlen für das Outcome von Frühgeborenen. Einige Studien postulierten einen Zusammenhang zwischen einem frühen quantitativen Defizit an Neutrophilen und einem erhöhten Sepsisrisiko [45, 89], andere kamen zu einem gegenteiligen Ergebnis [172]. Es scheint also, dass ein quantitatives Defizit an Leukozyten nicht sicher ein funktionelles Defizit der angeborenen Immunantwort nach sich zieht. Dafür spricht auch die Tatsache, dass man inzwischen, anders als ursprünglich angenommen, davon ausgeht, dass eine Substitution von granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) bei Frühgeborenen mit hohem Risiko für eine Neutropenie keinen Nutzen hinsichtlich der Reduktion des Risikos postnataler Infektionen zeigt. So konnte anhand einer Kohorte Frühgeborener mit einem Gestationsalter ≤ 32 Wochen und SGA-Status gezeigt werden, dass sowohl das short-term Outcome [27], als auch das Outcome nach zwei Jahren [117] durch die Applikation von GM-CSF nicht verbessert werden konnten.

Hinsichtlich Thrombozyten- und Normoblastenzahlen bestätigten die Ergebnisse der vorliegenden Studie die Beobachtungen früherer Arbeiten. So waren die Thrombozytenzahlen in der SGA-Gruppe signifikant niedriger als in der AGA-Gruppe, was Ausdruck einer defizienten Megakaryopoese infolge einer Hypoxie-bedingten Knochenmarkssuppression bei SGA-Frühgeborenen sein könnte [33]. Die

Normoblastenzahlen zeigten sich bei einer Zählweise von Normoblasten/100 Leukozyten in der SGA-Gruppe signifikant erhöht, was als Kompensationsversuch der chronischen Hypoxie bei hypotrophen Frühgeborenen gedeutet wurde [8, 133].

Unser Studiendesign unterliegt bestimmten Einschränkungen, die nachfolgend diskutiert werden. Aufgrund des unvorhersehbaren Geburtstermins (z.B. am Wochenende) lagen nicht von allen Frühgeborenen Differenzialblutbilder an allen Zeitpunkten vor. Zudem kam in der AGA-Gruppe ein signifikanter Teil der Kinder nach vorzeitiger Wehentätigkeit zur Welt, was eine vorzeitige Stimulation der angeborenen Immunantwort zur Folge gehabt und somit die Daten beeinflusst haben könnte. Außerdem könnten die verringerten Leukozytenzahlen in der SGA-Gruppe auch Ausdruck einer vermehrten Migration in Gefäßwände oder extravasales Gewebe sein. In diesem Fall befände sich das Immunsystem zwar in einem aktivierten Zustand, allerdings auf eine Weise, die sich intravasal nicht quantifizieren ließe.

SGA-Status und Zytokinexpressionsmuster

Zusätzlich zu der quantitativen Untersuchung der adaptiven Immunantwort widmete sich diese Arbeit der Charakterisierung des Zytokinexpressionsmuster SGA-Frühgeborener, also der Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort. Ausgangspunkt war die Hypothese, dass in diesem Bereich eine funktionelle Defizienz im Vergleich mit AGA-Frühgeborenen vorliegt.

Zur Messung der Zytokinexpression verwendeten wir Vollblutkulturansätze mit normierten Leukozytenzahlen aus Nabelschnurblut von 144 Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von ≤ 32 Wochen. Diese wurden mit LPS stimuliert und inkubiert, woraufhin per ELISA die Konzentrationen von IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , TGF- β und löslichem CD14 gemessen wurden.

Der Vorteil dieses in-vitro Verfahrens besteht darin, dass die Zellen während der Inkubationszeit in ihrem natürlichen Gefüge verbleiben und so die Wechselwirkungen zwischen aktivierenden und hemmenden Akteuren des Immunsystems annähernd dem Zustand in-vivo entsprechen. Außerdem ermöglicht das Verfahren die Messung auch bei sehr kleinen Probenvolumina.

Trotz dieser Vorteile bleibt das in-vitro Verfahren letztendlich nur ein Modell, um Ansätze für zukünftige in in-vivo Studien zu erarbeiten. Ein Nachteil der ELISA-Messung ist, dass

hier nur die plasmaassoziierten Zytokine erfasst werden, die zuvor von den Zellen im Ansatz sezerniert wurden. So lässt sich weder eine Aussage über die zellassoziierten Zytokine, noch über ihren Produktionsort treffen.

Die Tatsache, dass Zytokine in ihrer Funktion als inflammatorische Mediatoren eine zentrale Rolle bei der Entstehung vieler verschiedener die Neonatalperiode betreffender Komplikationen spielen, wurde bereits in zahlreichen Studien gezeigt [35, 164, 192].

Die Frage, wie sich der SGA-Status zusätzlich zum niedrigen Gestationsalter als unabhängiger Faktor auf das Zytokinexpressionsmuster auswirkt, ist dagegen noch nicht abschließend geklärt.

Interessanterweise waren in der SGA-Gruppe dieser Arbeit die Spiegel sowohl eher proinflammatorisch wirksamer Zytokine (IL-6 und IL-8) als auch eher antiinflammatorisch wirksamer Zytokine (IL-10 und TGF- β) im Vergleich zur AGA-Gruppe erniedrigt. Für TNF- α und sCD14 fanden sich dagegen keine Unterschiede.

Proinflammatorisch wirksame Zytokine sind für die Koordination der Immunabwehr essentiell. So spielt z.B. IL-8 eine zentrale Rolle bei der chemotaktischen Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und der Regulierung der Phagozytoseaktivität im Rahmen der angeborenen Immunabwehr. In vielen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das Gestationsalter in positiver Korrelation mit der Produktion proinflammatorischer Zytokine steht [34, 41]. Darin könnte ein Erklärungsansatz für die erhöhte sepsisbezogene Mortalität und Morbidität Frühgeborener liegen. Die in der vorliegenden Arbeit bei SGA-Frühgeborenen beobachteten erniedrigten IL-6 und IL-8-Spiegel könnten demnach in Analogie zu den o.g. Ergebnissen ein Indiz für eine defiziente zytokinvermittelte Immunantwort SGA-Frühgeborener im Vergleich zu AGA-Frühgeborenen sein. Dazu passen auch die Beobachtungen von Jinrong Li et al.: Sie untersuchten die NK-Zell-vermittelte Immunantwort auf einen viralen Stimulus mit Influenza Typ A bei SGA-Kindern im Vergleich zu AGA-Kindern bzw. Erwachsenen und konnten zeigen, dass die NK-Zellen von SGA-Neugeborenen signifikant weniger antivirale Zytokine wie Perforin, Interferon- γ und TNF- α sezernieren [102]. Lindner et al. verglichen in ihrer Arbeit Zytokinkonzentrationen im Nabelschnurblut von SGA- und AGA-Frühgeborenen und untersuchten dabei ein ähnliches Spektrum wie in der vorliegenden Arbeit. Ihre Einschlusskriterien unterschieden sich jedoch insofern von dieser Studie, als dass Kinder bis zu einem Gestationsalter von ≤ 37 Wochen eingeschlossen wurden. Das führte in

beiden Gruppen zu einem deutlich höheren durchschnittlichen Gestationsalter als in dieser Arbeit. Die Autoren beobachteten bezüglich IL-8 signifikante Unterschiede, nicht jedoch hinsichtlich IL-6 und IL-10 [104].

Wie eingangs beschrieben, ergibt sich der Aktivierungsgrad des Zytokinsystems aus dem Zusammenspiel von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen. Folglich kann ein Mangel an antiinflammatorischen Zytokinen im Falle einer Infektion ein Überschießen der proinflammatorischen Immunantwort und somit das Entstehen von Sepsis und inflammatorisch-bedingten Folgeerkrankungen begünstigen. IL-10 zum Beispiel supprimiert unter natürlichen Bedingungen die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, TNF- α , IL-6 und IL-8. Die in dieser Studie beobachteten verringerten IL-10- und TGF- β -Konzentrationen bei SGA-Frühgeborenen könnten folglich einen Hinweis auf ein erhöhtes Sepsisrisiko infolge einer insuffizienten antiinflammatorischen Gegenregulation geben. Schultz et al. zeigten, dass bei Früh- und Neugeborenen im Vergleich zu erwachsenen Probanden nicht nur die IL-10-Produktion vermindert ist, sondern auch die inhibitorische Wirkung von IL-10 auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine geringer ausfällt [148].

Letztendlich bieten die Ergebnisse dieser Arbeit zwei Deutungsansätze, die eine erhöhte Vulnerabilität SGA-Frühgeborener begründen könnten: Auf der einen Seite die Möglichkeit einer ineffizienten Immunantwort durch eine fehlende proinflammatorische Abwehrreaktion auf pathogene Erreger. Auf der anderen Seite eine defiziente antiinflammatorische Immunantwort, die mit einem erhöhten Risiko einer systemischen überschießenden Inflammation bei hypotrophen Neugeborenen vergesellschaftet wäre. Auf jeden Fall bleibt festzuhalten, dass bei SGA-Frühgeborenen eine Imbalance der Zytokinantwort vorliegt, die als Teil einer komplex regulierten und hoch konservierten Immunreaktion ein funktionelles Defizit darstellt.

Auch bei diesem Teil der Arbeit wies das Studiendesign einige Einschränkungen auf: Zwar wurden Kinder mit Amnioninfektionssyndrom oder Early-Onset-Sepsis ausgeschlossen, es besteht jedoch auch hier die Möglichkeit, dass die Unterschiede bezüglich der Ursachen der Frühgeburtlichkeit zwischen beiden Gruppen einen Einfluss auf das Ergebnis hatten. Auch antenatal verabreichte Antibiotika könnten sich (durch das Wechselspiel zwischen Mikrobiom und Immunsystem) auf die Beobachtungen ausgewirkt haben [42, 93, 137].

Schlussendlich konnte nicht von allen rekrutierten Probanden ausreichend Probenmaterial gewonnen werden, um jedes der zu bestimmenden Zytokine zu testen.

Damit postnatale Leukozytenzahlen und Zytokinkonzentrationen Teil eines Systems von Parametern zur Einschätzung des individuellen Risikoprofils von Frühgeborenen und solchen mit SGA-Status werden können, bedarf es weiter Forschung in Form von großen multizentrischen Studien. Nur so können zukünftig z.B. Antibiotikaregime hinsichtlich Wirkstoffkombination und Behandlungsdauer bedarfsgerechter kalkuliert werden, um so das Outcome von hypotrophen Frühgeborenen zu verbessern, aber auch, um therapiebedingte Folgeschäden und Resistenzen zu vermeiden.

SGA-Status und Late-Onset-Sepsisrisiko

Anknüpfend an die obigen Ergebnisse beschäftigt sich der dritte Teil dieser Arbeit mit der Hypothese, dass SGA-Frühgeborene ein höheres Late-Onset-Sepsisrisiko zeigen als Kinder mit einem ihrem Gestationsalter entsprechenden Geburtsgewicht. Zur Überprüfung wurden die Daten einer großen Kohorte von 5886 multizentrisch rekrutierten VLBW-Frühgeborenen mit einem Gestationsalter zwischen 23+0 und $\leq 31+6$ Wochen ausgewertet. Die Ergebnisse zeigen, dass der SGA-Status tatsächlich mit einer höheren sepsisbezogenen Vulnerabilität Frühgeborener assoziiert ist. Diese Beobachtung gilt für die Gesamtkohorte und insbesondere für die Gruppe mit einem Alter zwischen 29+0 und 31+6 Wochen. Die Daten zum Keimspektrum, das den beobachteten Sepsisepisoden zugrunde lag, zeigen, dass dieser Unterschied vor allem durch Koagulase-negative Staphylokokken bedingt ist. Insgesamt wurden in der Gesamtkohorte bei 15% der Kinder Blutkultur-positive Late-Onset-Septitiden beobachtet. Diese Beobachtung bestätigt ähnliche Ergebnisse von Stoll et al., die in ihrer großen multizentrischen Untersuchung VLBW-Frühgeborener eine Rate von 21% registrierten [168].

Insgesamt existieren wenig vergleichbare Daten bezüglich des SGA-assoziierten Sepsisrisikos. Eine der wenigen multizentrischen Studien des deutschen Nationalen Referenzzentrums für Surveillance von nosokomialen Infektionen unter VLBW-Frühgeborenen (NEO-KISS) fand signifikant unterschiedliche Sepsisraten von 42% unter SGA- und 31% unter AGA-Kindern. Allerdings ist die Aussagekraft dieses Ergebnisses dadurch limitiert, dass nur Kinder mit einem Gestationsalter zwischen 24 und 28 Wochen eingeschlossen wurden. Zudem wurden die Probanden nur bis zum Erreichen eines Gewichtes von 1800 g überwacht. Etwaige Outcome-assoziierte Ereignisse im weiteren klinischen Verlauf wurden somit eventuell nicht erfasst. Weiterhin wurden bei der NEO-

KISS Studie auch klinisch diagnostizierte Septitiden berücksichtigt, während in dieser Studie lediglich Blutkultur-positive Episoden Eingang fanden [13].

Anders als NEO-KISS schloss diese Studie Kinder mit einem Alter von 23+0 bis 31+6 Wochen ein. Dieser Bereich wurde gewählt, da er einerseits einen größeren Teil der betroffenen Patientengruppe abbildet, und andererseits den Fehler, der durch Überrepräsentation SGA-Frühgeborener oberhalb der 32. Woche entsteht, minimiert. Trotz der Anwendung spezifischer Perzentilen für Geschlecht und Gestationsalter war die Rate an SGA-Frühgeborenen mit 11,6% leicht höher als die erwarteten 10%. Die Definition von SGA erlaubt es nicht, zwischen einem konstitutionell bedingten niedrigen Geburtsgewicht und einer fehlenden Ausschöpfung des Wachstumspotentials zu unterscheiden. Es fehlt nach wie vor eine Methode, die diese Unterscheidung möglich macht. Folglich kann auch in dieser Arbeit nicht mit Sicherheit gesagt werden, in wie vielen Fällen der SGA-Status tatsächlich eine pathologische Hypotrophie des Neugeborenen darstellt.

Da die SGA-Gruppe ein signifikant niedrigeres Geburtsalter aufwies, wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt, nach welcher der SGA-Status als unabhängiger Risikofaktor für die Late-Onset-Sepsis bestehen blieb.

Durch die Stratifizierung nach Gestationsalter konnte gezeigt werden, dass bei Kindern mit einem Gestationsalter < 27 Wochen kein Unterschied mehr bezüglich des Sepsisrisikos bestand. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass in dieser Gruppe Frühgeborener die extreme Unreife den Effekt, den der SGA-Status auf das Outcome hat, kompensiert. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Westby et al., die in einer Kohorte norwegischer ELBW-Frühgeborener ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen SGA und dem sepsisassoziierten Outcome feststellen konnten [188]. Auch de Jesus et al. kamen in ihrer Untersuchung einer Kohorte von 385 SGA- und 2586 AGA-Kindern mit einem Gestationsalter < 27 Wochen zu diesem Ergebnis [36].

Das höhere Sepsisrisiko in der SGA-Gruppe mit einem Gestationsalter von > 27 Wochen könnte Folge veränderter Anforderungen an die Behandlungsmodalitäten SGA-Frühgeborener sein. Es zeigte sich, dass in dieser Gruppe häufiger zentralvenöse Katheter bzw. Reserveantibiotika zum Einsatz kamen, aber auch mehr Zeit zum Erreichen einer vollständig enteralen Ernährung benötigt wurde. Passend dazu war das höhere Sepsisrisiko hauptsächlich auf vermehrte Infektionen mit Koagulase-negativen Staphylokokken zurückzuführen, eine Erregergruppe, die durch ihre Fähigkeit zur Biofilmbildung und andere Virulenzfaktoren zu den wichtigsten Erregern fremdkörperassoziiierter Infektionen

zählt [184]. Weiterhin wurden Kinder der SGA-Gruppe häufiger invasiv beatmet, benötigten längere Beatmungszeiten und wiesen längere Aufenthaltsdauern auf. Nach Integration dieser behandlungsassoziierten Parameter durch multivariate Regressionsanalyse erwies sich der SGA-Status nicht mehr als unabhängiger Risikofaktor für die Late-Onset-Sepsis. Dabei ist es jedoch wichtig, dass sowohl die Behandlungsmodalitäten einen Einfluss auf das Sepsisrisiko haben können, als auch eine hohe Sepsisinzidenz zu längeren Beatmungszeiten und Krankenhausaufenthalten führt. Um aus diesen Erkenntnissen zukünftig individualisierte Therapiekonzepte für die vulnerable Gruppe der SGA-Frühgeborenen ableiten zu können, ist es wichtig, zunächst die Pathophysiologie behandlungsassoziiertes Risikofaktoren besser zu verstehen. Gleichzeitig müssen eventuelle Änderungen von Behandlungsleitlinien stets sorgsam abgewogen werden, da z.B. Pläne zur Vermeidung von zentralvenösen Kathetern oder parenteraler Ernährung Neonatologen vor die große Herausforderung einer ausreichenden Nahrungsversorgung stellen würden.

Ein weiterer häufig diskutierter Faktor mit Einfluss auf das Sepsisrisiko ist der Gebrauch von Glykopeptidantibiotika zur Prophylaxe von septischen Komplikationen bei Frühgeborenen mit peripheren oder zentralvenösen Zugängen. In der vorliegenden Studie fand sich kein Unterschied zwischen der SGA- und AGA-Gruppe; eine Aussage, die allerdings durch geringe Fallzahl in dieser Subgruppe und mangelnde Kohortengröße in diesem Punkt eingeschränkt ist. Andere Studien sahen dagegen einen Nutzen in dem prophylaktischen Gebrauch von Glykopeptidantibiotika [31, 56, 125, 126]. Dabei gilt es jedoch zu beachten, dass diese Studien einige methodische Schwachstellen aufweisen, da z.B. Blutkulturen, die aus zentralvenösen Kathetern entnommen wurden, eventuell Antibiotikarückstände enthalten haben und somit falsch negative Blutkulturen einen Einfluss auf die beobachteten Sepsisraten hatten. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die ungeschützten Placebo-Manipulationen an den Kathetern in der Kontrollgruppe höhere Sepsisraten zur Folge hatten. Weiterhin würde eine zunehmende Verbreitung von prophylaktischen Antibiotikagaben zur Sepsisprophylaxe zunehmende Resistenzen sowie ototoxische und renale Nebenwirkungen mit sich bringen.

Nach dieser Darstellung des bedeutenden Einflusses der Behandlungsmodalitäten auf das Sepsisrisiko SGA-Frühgeborener bleibt die Frage nach Einflussgrößen, die im Organismus des Kindes selbst, bzw. in dem seiner Mutter, zu finden sind. Die Ergebnisse, die im o.a. Teil dieser Arbeit ausgeführt sind, bieten Erklärungsansätze, die qualitative und

funktionelle Defizite im Bereich der angeborenen Immunantwort betreffen.

Einen anderen Ansatzpunkt bietet die Tatsache, dass eine fetale Wachstumsretardierung häufig bei Müttern mit hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen auftritt [158] und ein pathophysiologischer Zusammenhang im Sinne einer unzureichenden Plazentation hinter dieser Beobachtung vermutet wird [83, 129]. Es konnte gezeigt werden, dass plazentare Invasion und Entwicklung von stark regulierten inflammatorischen Prozessen abhängen [22, 129]. Harmon et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen Polymorphismen von inflammatorischen Genen wie IL6 und KLRD1 und dem SGA-Status und fanden signifikante Assoziationen [67]. Fehlregulationen dieser Gene während der Schwangerschaft könnten Ursache einer mangelhaften plazentaren Implantation und damit einer Wachstumsretardierung sein. Gleichzeitig bieten sie einen Ansatz für zukünftige Studien in Form der Frage, ob solche, das mütterliche Immunsystem betreffende Veränderungen, einen Einfluss auf das kindliche Sepsisrisiko haben. Gleiches gilt für die Beobachtung, dass Schwangere mit Präeklampsie in der Frühschwangerschaft eine stärkere Expression von TLR-2 und TLR-4 auf der Oberfläche und des Cryopyrin-Inflammasoms im Cytoplasma von Neutrophilen zeigen [191].

SGA und andere Endpunkte

Parallel zu den Erkenntnissen bezüglich des Late-Onset-Sepsisrisikos von SGA-Kindern lassen sich anhand der Daten der multizentrisch rekrutierten Kohorte VLBW-Frühgeborener auch Aussagen bezüglich anderer Endpunkte treffen. Die Hypothese bestand auch hier in einem Zusammenhang von SGA-Status und einem, verglichen mit normotrophen Kindern, veränderten Outcome hinsichtlich BPD, IVH, PVL und Tod.

Dabei bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit andere Studien in der Beobachtung, dass die Kinder der SGA-Gruppe häufiger verstarben und signifikant häufiger eine BPD entwickelten. Frühere Arbeiten zeigten, dass Kinder mit einem für ihr Gestationsalter hohen Geburtsgewicht geringere BPD-Raten aufweisen [94], und einen ansteigenden Trend mit abnehmendem Gestationsalter [123]. Einen Erklärungsansatz für diese lineare Assoziation bieten Modelle, die Wachstum in Abhängigkeit von der Alveolarisierung der Lunge untersuchen. Eine Studie, welche am Schafmodell eine intrauterine Wachstumsverzögerung simulierte, indem über umbiliko-plazentare Embolisation eine plazentare Insuffizienz erzeugt wurde, konnte zeigen, dass diese mit einer verminderten

Alveolenzahl einhergeht. Letztere ist ein wesentliches Merkmal der BPD und noch ausgeprägter acht Wochen postnatal zu beobachten [114]. Sie war auch zwei Jahre nach Geburt noch nachweisbar [115]. In einer anderen Studie konnte außerdem eine Assoziation zwischen Wachstumsverzögerung und verminderter Alveolarisierung bei mangelernährten Rattenjungen gezeigt werden [121].

Interessanterweise zeigten in der vorliegenden Studie die Kinder der AGA-Gruppe mit einem Gestationsalter < 27 Wochen ein höheres Risiko für Hirnblutungen im Sinne einer IVH III° bzw. IV° und in der Gruppe mit einem Gestationsalter < 25 Wochen auch für periventriculäre Leukomalazien. Frühere Studien lieferten dazu widersprüchliche Ergebnisse [15, 48, 193].

6 Zusammenfassung

Infektiologische Komplikationen sind eine der Hauptursachen für die perinatale Morbidität und Mortalität Frühgeborener. Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen des SGA-Status Frühgeborener auf das individuelle Risikoprofil dieser vulnerablen Patientengruppe zu erforschen. Vor diesem Hintergrund sollten Besonderheiten in der angeborenen Immunantwort SGA-Frühgeborener innerhalb einer unizentrischen Lübecker Kohorte untersucht werden. In einem zweiten Teilschritt sollte die Infektionsprädisposition hinsichtlich Blutkultur-positiver Late-Onset-Septitiden (LOS) anhand der Daten einer großen multizentrischen Kohorte analysiert werden.

Die Untersuchung quantitativer Aspekte der Immunantwort SGA-Frühgeborener erfolgte einerseits auf zellulärer Ebene mittels der Auswertung von Differenzialblutbildern jeweils nach Geburt sowie am 3. und 7. Lebenstag sowie auf funktioneller Ebene durch die Analyse von Zytokinexpressionsmustern. Hierzu wurden Vollblutkulturansätze mit normierten Leukozytenzahlen aus Nabelschnurblut von 144 Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von ≤ 32 Wochen verwendet. Diese wurden mit LPS stimuliert und anschließend per ELISA die Konzentrationen von IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , TGF- β und löslichem CD14 gemessen. SGA-Frühgeborene zeigten ein quantitatives Defizit im Bereich der postnatalen Leukozytenzahlen im Vergleich zu AGA-Kindern, welches auch mehrere Tage nach Geburt noch nachweisbar war. Ob dieses quantitative Defizit gleichzeitig ein funktionelles Defizit darstellt, muss nachgehend geprüft werden. Die Analyse der Zytokinexpressionsmuster zeigte, dass bei SGA-Frühgeborenen sowohl ein quantitatives Defizit im Bereich proinflammatorischer Zytokine (IL-6 und IL-8) als auch antiinflammatorischer Zytokine (IL-10 und TGF- β) vorliegt. Aus diesen Erkenntnissen lassen sich zwei Deutungsansätze für eine erhöhte Vulnerabilität SGA-Frühgeborener ableiten: Einerseits könnte eine fehlende proinflammatorische Abwehrreaktion auf pathogene Erreger eine erhöhte Rate infektiologischer Komplikationen bedingen, andererseits würde ein Defizit an antiinflammatorischen Zytokinen bei hypotrophen Neugeborenen das Risiko einer überschießenden, unbalancierten inflammatorischen Reaktion erhöhen, was in der Pathogenese zahlreicher Langzeitkomplikationen (BPD, ROP, NEC) eine Rolle spielt.

Die Untersuchung des Late-Onset-Sepsisrisikos SGA-Frühgeborener erfolgte anhand der

Daten einer großen im Rahmen des German Neonatal Network (GNN) rekrutierten mutizentrischen Kohorte VLBW-Frühgeborener mit einem Gestationsalter zwischen 23+0 und $\leq 31+6$ Wochen. Es zeigte sich, dass SGA-Kinder ein höheres LOS-Risiko aufweisen als normotrophe Kinder. Dieser Unterschied konnte neben der Gesamtkohorte vor allem in der Subgruppe mit einem Alter zwischen 29+0 und 31+6 Wochen beobachtet werden. Das Ergebnis leistet einen wichtigen Beitrag zur Erforschung des Risikoprofils Frühgeborener, da zum jetzigen Zeitpunkt nur wenige Studien mit ähnlich großen Kohorten bzw. vergleichbarem Studiendesign existieren. Wie bereits in früheren Studien zeigte sich, dass die Unterschiede bezüglich der Anzahl der Sepsisepisoden vor allem durch Infektionen mit Koagulase-negativen Staphylokokken bedingt waren. Einschränkend sei erwähnt, dass SGA-Kinder sich auch hinsichtlich der Behandlungsmodalitäten von AGA-Kindern unterschieden (höhere Rate an invasiver Therapie), so dass der SGA-Status in der Regressionsanalyse als unabhängiger Risikofaktor nicht mehr nachvollziehbar war.

Abschließend sei erwähnt, dass die vorliegenden Ergebnisse bezüglich anderer Outcome-Parameter frühere Studienergebnisse bestätigen. So zeigten auch in dieser Arbeit SGA-Frühgeborene eine höhere Inzidenz hinsichtlich Mortalität und BPD verglichen mit normotrophen Frühgeborenen. Interessanterweise waren dagegen die Raten von IVH und PVL in der SGA-Gruppe geringer.

V Literaturverzeichnis

- [1] Aderka D, Le JM und Vilcek J (1989). IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 143, 3517-3523.
- [2] Adkins B, Leclerc C und Marshall-Clarke S (2004). Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nature reviews Immunology* 4, 553-564.
- [3] Ahmadzadeh M und Rosenberg SA (2005). TGF-beta 1 attenuates the acquisition and expression of effector function by tumor antigen-specific human memory CD8 T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 174, 5215-5223.
- [4] Ambruso DR, Bentwood B, Henson PM und Johnston RB, Jr. (1984). Oxidative metabolism of cord blood neutrophils: relationship to content and degranulation of cytoplasmic granules. *Pediatric research* 18, 1148-1153.
- [5] Angelone DF, Wessels MR, Coughlin M, Suter EE, Valentini P, Kalish LA und Levy O (2006). Innate immunity of the human newborn is polarized toward a high ratio of IL-6/TNF-alpha production in vitro and in vivo. *Pediatric research* 60, 205-209.
- [6] Arias MA, Rey Nores JE, Vita N, Stelter F, Borysiewicz LK, Ferrara P und Labeta MO (2000). Cutting edge: human B cell function is regulated by interaction with soluble CD14: opposite effects on IgG1 and IgE production. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 164, 3480-3486.
- [7] Arock M, Zuany-Amorim C, Singer M, Benhamou M und Pretolani M (1996). Interleukin-10 inhibits cytokine generation from mast cells. *European journal of immunology* 26, 166-170.
- [8] Axt-Fliedner R, Hendrik HJ, Wrobel M, Friedrich M und Schmidt W (2002). Significance of high and normal neonatal nucleated red blood cell count in small-

for-gestational-age newborns. *Clinical and experimental obstetrics & gynecology* 29, 49-53.

- [9] Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H, Horuk R, Lindley I, Mantovani A, Maysushima K, Murphy P, Nomiya H, Oppenheim J, Rot A, Schall T, Tsang M, Thorpe R, Van Damme J, Wadhwa M, Yoshie O, Zlotnik A und Zoon K (2002). Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 22, 1067-1068.
- [10] Baker J, Liu JP, Robertson EJ und Efstratiadis A (1993). Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75, 73-82.
- [11] Banks WA, Kastin AJ und Gutierrez EG (1994). Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. *Neuroscience letters* 179, 53-56.
- [12] Bardin C, Zelkowitz P und Papageorgiou A (1997). Outcome of small-for-gestational age and appropriate-for-gestational age infants born before 27 weeks of gestation. *Pediatrics* 100, E4.
- [13] Bartels DB, Schwab F, Geffers C, Poets CF und Gastmeier P (2007). Nosocomial infection in small for gestational age newborns with birth weight <1500 g: a multicentre analysis. *Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition* 92, F449-453.
- [14] Bas S, Gauthier BR, Spenato U, Stingelin S und Gabay C (2004). CD14 is an acute-phase protein. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 172, 4470-4479.
- [15] Bernstein IM, Horbar JD, Badger GJ, Ohlsson A und Golan A (2000). Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. The Vermont Oxford Network. *American journal of obstetrics and gynecology* 182, 198-206.

- [16] Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Fiers W, Cotran RS und Gimbrone MA, Jr. (1986). Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 4533-4537.
- [17] Bjorkqvist M, Jurstrand M, Bodin L, Fredlund H und Schollin J (2004). Defective neutrophil oxidative burst in preterm newborns on exposure to coagulase-negative staphylococci. *Pediatric research* 55, 966-971.
- [18] Blackwell TS und Christman JW (1996). Sepsis and cytokines: current status. *British journal of anaesthesia* 77, 110-117.
- [19] Bogdan C, Vodovotz Y und Nathan C (1991). Macrophage deactivation by interleukin 10. *The Journal of experimental medicine* 174, 1549-1555.
- [20] Bonig H, Banning U, Hannen M, Kim YM, Verheyen J, Mauz-Korholz C und Korholz D (1999). Transforming growth factor-beta1 suppresses interleukin-15-mediated interferon-gamma production in human T lymphocytes. *Scandinavian journal of immunology* 50, 612-618.
- [21] Borden EC und Chin P (1994). Interleukin-6: a cytokine with potential diagnostic and therapeutic roles. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 123, 824-829.
- [22] Bowen JM, Chamley L, Keelan JA und Mitchell MD (2002). Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition. *Placenta* 23, 257-273.
- [23] Brown MA, Hague WM, Higgins J, Lowe S, McCowan L, Oats J, Peek MJ, Rowan JA und Walters BN (2000). The detection, investigation and management of hypertension in pregnancy: executive summary. *The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology* 40, 133-138.

- [24] Cannon JG, Tompkins RG, Gelfand JA, Michie HR, Stanford GG, van der Meer JW, Endres S, Lonnemann G, Corsetti J, Chernow B et al. (1990). Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *The Journal of infectious diseases* 161, 79-84.
- [25] Capsoni F, Minonzio F, Ongari AM, Carbonelli V, Galli A und Zanussi C (1995). IL-10 up-regulates human monocyte phagocytosis in the presence of IL-4 and IFN-gamma. *Journal of leukocyte biology* 58, 351-358.
- [26] Carr R (2000). Neutrophil production and function in newborn infants. *British journal of haematology* 110, 18-28.
- [27] Carr R, Brocklehurst P, Dore CJ und Modi N (2009). Granulocyte-macrophage colony stimulating factor administered as prophylaxis for reduction of sepsis in extremely preterm, small for gestational age neonates (the PROGRAMS trial): a single-blind, multicentre, randomised controlled trial. *Lancet* 373, 226-233.
- [28] Chiswick ML (1976). Prolonged rupture of membranes, pre-eclamptic toxemia, and respiratory distress syndrome. *Archives of disease in childhood* 51, 674-679.
- [29] Clark DA und Coker R (1998). Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *The international journal of biochemistry & cell biology* 30, 293-298.
- [30] Couto RC, Pedrosa TM, Tofani Cde P und Pedroso ER (2006). Risk factors for nosocomial infection in a neonatal intensive care unit. *Infection control and hospital epidemiology* 27, 571-575.
- [31] Craft AP, Finer NN und Barrington KJ (2000). Vancomycin for prophylaxis against sepsis in preterm neonates. *The Cochrane database of systematic reviews*, Cd001971.

- [32] Creasey AA, Stevens P, Kenney J, Allison AC, Warren K, Catlett R, Hinshaw L and Taylor FB, Jr. (1991). Endotoxin and cytokine profile in plasma of baboons challenged with lethal and sublethal *Escherichia coli*. *Circulatory shock* 33, 84-91.
- [33] Cremer M, Weimann A, Schmalisch G, Hammer H, Buhner C und Dame C (2010). Immature platelet values indicate impaired megakaryopoietic activity in neonatal early-onset thrombocytopenia. *Thrombosis and haemostasis* 103, 1016-1021.
- [34] Currie AJ, Curtis S, Strunk T, Riley K, Liyanage K, Prescott S, Doherty D, Simmer K, Richmond P und Burgner D (2011). Preterm infants have deficient monocyte and lymphocyte cytokine responses to group B streptococcus. *Infection and immunity* 79, 1588-1596.
- [35] Dammann O und Leviton A (1997). Maternal intrauterine infection, cytokines, and brain damage in the preterm newborn. *Pediatric research* 42, 1-8.
- [36] De Jesus LC, Pappas A, Shankaran S, Li L, Das A, Bell EF, Stoll BJ, Laptook AR, Walsh MC, Hale EC, Newman NS, Bara R und Higgins RD (2013). Outcomes of small for gestational age infants born at <27 weeks' gestation. *The Journal of pediatrics* 163, 55-60.e51-53.
- [37] de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG und de Vries JE (1991). Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *The Journal of experimental medicine* 174, 1209-1220.
- [38] DeChiara TM, Efstratiadis A und Robertson EJ (1990). A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 345, 78-80.
- [39] Defrance T, Vanbervliet B, Briere F, Durand I, Rousset F und Banchereau J (1992). Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-

activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *The Journal of experimental medicine* 175, 671-682.

- [40] Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R und Romagnani S (1993). Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 150, 353-360.
- [41] Dembinski J, Behrendt D, Martini R, Heep A und Bartmann P (2003). Modulation of pro- and anti-inflammatory cytokine production in very preterm infants. *Cytokine* 21, 200-206.
- [42] Deshmukh HS, Liu Y, Menkiti OR, Mei J, Dai N, O'Leary CE, Oliver PM, Kolls JK, Weiser JN und Worthen GS (2014). The microbiota regulates neutrophil homeostasis and host resistance to Escherichia coli K1 sepsis in neonatal mice. *Nature medicine* 20, 524-530.
- [43] Dinarello CA (1989). The endogenous pyrogens in host-defense interactions. *Hospital practice (Office ed)* 24, 111-115, 118, 121 passim.
- [44] Dinarello CA (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest* 118, 503-508.
- [45] Doron MW, Makhlof RA, Katz VL, Lawson EE und Stiles AD (1994). Increased incidence of sepsis at birth in neutropenic infants of mothers with preeclampsia. *The Journal of pediatrics* 125, 452-458.
- [46] Fanaroff AA, Korones SB, Wright LL, Verter J, Poland RL, Bauer CR, Tyson JE, Philips JB, 3rd, Edwards W, Lucey JF, Catz CS, Shankaran S und Oh W (1998). Incidence, presenting features, risk factors and significance of late onset septicemia in very low birth weight infants. The National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *The Pediatric infectious disease journal* 17, 593-598.

- [47] Faust K, Göpel W, Herting E und Härtel C (2011). Sepsis bei Frühgeborenen mit einem sehr niedrigen Geburtsgewicht. *Chemother J* 20, 1-8.
- [48] Ferdynus C, Quantin C, Abrahamowicz M, Platt R, Burguet A, Sagot P, Binquet C und Gouyon JB (2009). Can birth weight standards based on healthy populations improve the identification of small-for-gestational-age newborns at risk of adverse neonatal outcomes? *Pediatrics* 123, 723-730.
- [49] Fiorentino DF, Bond MW und Mosmann TR (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *The Journal of experimental medicine* 170, 2081-2095.
- [50] Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M und O'Garra A (1991). IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 147, 3815-3822.
- [51] Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW und O'Garra A (1991). IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 146, 3444-3451.
- [52] Freeman J, Platt R, Epstein MF, Smith NE, Sidebottom DG und Goldmann DA (1990). Birth weight and length of stay as determinants of nosocomial coagulase-negative staphylococcal bacteremia in neonatal intensive care unit populations: potential for confounding. *American journal of epidemiology* 132, 1130-1140.
- [53] Frey EA, Miller DS, Jahr TG, Sundan A, Bazil V, Espevik T, Finlay BB und Wright SD (1992). Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *The Journal of experimental medicine* 176, 1665-1671.
- [54] Gahr M, Schulze M, Scheffczyk D, Speer CP und Peters JH (1987). Diminished release of lactoferrin from polymorphonuclear leukocytes of human neonates. *Acta haematologica* 77, 90-94.

- [55] Garite TJ, Clark R und Thorp JA (2004). Intrauterine growth restriction increases morbidity and mortality among premature neonates. *American journal of obstetrics and gynecology* 191, 481-487.
- [56] Garland JS, Alex CP, Henrickson KJ, McAuliffe TL und Maki DG (2005). A vancomycin-heparin lock solution for prevention of nosocomial bloodstream infection in critically ill neonates with peripherally inserted central venous catheters: a prospective, randomized trial. *Pediatrics* 116, e198-205.
- [57] Garner A (1984). The pathogenesis of ocular vascular disorders. *Australian journal of ophthalmology* 12, 401-404.
- [58] Gasparoni A, Ciardelli L, Avanzini A, Castellazzi AM, Carini R, Rondini G und Chirico G (2003). Age-related changes in intracellular TH1/TH2 cytokine production, immunoproliferative T lymphocyte response and natural killer cell activity in newborns, children and adults. *Biology of the neonate* 84, 297-303.
- [59] Geffers C, Baerwolff S, Schwab F und Gastmeier P (2008). Incidence of healthcare-associated infections in high-risk neonates: results from the German surveillance system for very-low-birthweight infants. *The Journal of hospital infection* 68, 214-221.
- [60] Go NF, Castle BE, Barrett R, Kastelein R, Dang W, Mosmann TR, Moore KW und Howard M (1990). Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *The Journal of experimental medicine* 172, 1625-1631.
- [61] Gorelik L, Constant S und Flavell RA (2002). Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *The Journal of experimental medicine* 195, 1499-1505.
- [62] Gortner L, Misselwitz B, Milligan D, Zeitlin J, Kollee L, Boerch K, Agostino R, Van Reempts P, Chabernaud JL, Breart G, Papiernik E, Jarreau PH, Carrapato M,

- Gadzinowski J und Draper E (2011). Rates of bronchopulmonary dysplasia in very preterm neonates in Europe: results from the MOSAIC cohort. *Neonatology* 99, 112-117.
- [63] Graham PL, 3rd, Della-Latta P, Wu F, Zhou J und Saiman L (2007). The gastrointestinal tract serves as the reservoir for Gram-negative pathogens in very low birth weight infants. *The Pediatric infectious disease journal* 26, 1153-1156.
- [64] Gray JD, Liu T, Huynh N und Horwitz DA (2001). Transforming growth factor beta enhances the expression of CD154 (CD40L) and production of tumor necrosis factor alpha by human T lymphocytes. *Immunology letters* 78, 83-88.
- [65] Grutz G (2005). New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *Journal of leukocyte biology* 77, 3-15.
- [66] Hack CE, Hart M, van Schijndel RJ, Eerenberg AJ, Nuijens JH, Thijs LG und Aarden LA (1992). Interleukin-8 in sepsis: relation to shock and inflammatory mediators. *Infection and immunity* 60, 2835-2842.
- [67] Harmon QE, Engel SM, Wu MC, Moran TM, Luo J, Stuebe AM, Avery CL und Olshan AF (2014). Polymorphisms in inflammatory genes are associated with term small for gestational age and preeclampsia. *American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989)* 71, 472-484.
- [68] Hartel C, Haase B, Browning-Carmo K, Gebauer C, Kattner E, Kribs A, Segerer H, Teig N, Wense A, Wieg C, Herting E und Gopel W (2009). Does the enteral feeding advancement affect short-term outcomes in very low birth weight infants? *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 48, 464-470.
- [69] Hauser T, Frei K, Zinkernagel RM und Leist TP (1990). Role of tumor necrosis factor in Listeria resistance of nude mice. *Medical microbiology and immunology* 179, 95-104.

- [70] Haziot A, Rong GW, Bazil V, Silver J und Goyert SM (1994). Recombinant soluble CD14 inhibits LPS-induced tumor necrosis factor-alpha production by cells in whole blood. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 152, 5868-5876.
- [71] Haziot A, Rong GW, Lin XY, Silver J und Goyert SM (1995). Recombinant soluble CD14 prevents mortality in mice treated with endotoxin (lipopolysaccharide). *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 154, 6529-6532.
- [72] Haziot A, Rong GW, Silver J und Goyert SM (1993). Recombinant soluble CD14 mediates the activation of endothelial cells by lipopolysaccharide. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 151, 1500-1507.
- [73] Heine H und Lien E (2003). Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. *International archives of allergy and immunology* 130, 180-192.
- [74] Henneke P und Berner R (2006). Interaction of neonatal phagocytes with group B streptococcus: recognition and response. *Infection and immunity* 74, 3085-3095.
- [75] Hesse DG, Tracey KJ, Fong Y, Manogue KR, Palladino MA, Jr., Cerami A, Shires GT und Lowry SF (1988). Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. *Surgery, gynecology & obstetrics* 166, 147-153.
- [76] Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K und Akira S (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 162, 3749-3752.
- [77] Imdad A und Bhutta ZA (2011). Effect of balanced protein energy supplementation during pregnancy on birth outcomes. *BMC public health* 11 Suppl 3, S17.
- [78] Janeway CA, Jr. und Medzhitov R (2002). Innate immune recognition. *Annual review of immunology* 20, 197-216.

- [79] Jenkins JK, Malyak M und Arend WP (1994). The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils. *Lymphokine and cytokine research* 13, 47-54.
- [80] Karlowicz MG, Buescher ES und Surka AE (2000). Fulminant late-onset sepsis in a neonatal intensive care unit, 1988-1997, and the impact of avoiding empiric vancomycin therapy. *Pediatrics* 106, 1387-1390.
- [81] Kato K, Nakane A, Minagawa T, Kasai N, Yamamoto K, Sato N und Tsuruoka N (1989). Human tumor necrosis factor increases the resistance against *Listeria* infection in mice. *Medical microbiology and immunology* 178, 337-346.
- [82] Kaufman D und Fairchild KD (2004). Clinical Microbiology of Bacterial and Fungal Sepsis in Very-Low-Birth-Weight Infants. *Clinical Microbiology Reviews* 17, 638-680.
- [83] Kaufmann P, Black S und Huppertz B (2003). Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biology of reproduction* 69, 1-7.
- [84] Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Derynck R, Sporn MB und Fauci AS (1986). Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *The Journal of experimental medicine* 163, 1037-1050.
- [85] Kellogg JA, Ferrentino FL, Goodstein MH, Liss J, Shapiro SL und Bankert DA (1997). Frequency of low level bacteremia in infants from birth to two months of age. *The Pediatric infectious disease journal* 16, 381-385.
- [86] Kirkland TN und Viriyakosol S (1998). Structure-function analysis of soluble and membrane-bound CD14. *Progress in clinical and biological research* 397, 79-87.

- [87] Klinger G, Levy I, Sirota L, Boyko V, Reichman B und Lerner-Geva L (2009). Epidemiology and risk factors for early onset sepsis among very-low-birthweight infants. *American journal of obstetrics and gynecology* 201, 38.e31-36.
- [88] Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elnor VM, Elnor SG und Strieter RM (1992). Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science (New York, NY)* 258, 1798-1801.
- [89] Koenig JM und Christensen RD (1989). Incidence, neutrophil kinetics, and natural history of neonatal neutropenia associated with maternal hypertension. *The New England journal of medicine* 321, 557-562.
- [90] Koppelman B, Neefjes JJ, de Vries JE und de Waal Malefyt R (1997). Interleukin-10 down-regulates MHC class II alphabeta peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling. *Immunity* 7, 861-871.
- [91] Kuhns DB, Alvord WG und Gallin JI (1995). Increased circulating cytokines, cytokine antagonists, and E-selectin after intravenous administration of endotoxin in humans. *The Journal of infectious diseases* 171, 145-152.
- [92] Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM und Karlsson S (1993). Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 770-774.
- [93] Kuppala VS, Meinen-Derr J, Morrow AL und Schibler KR (2011). Prolonged initial empirical antibiotic treatment is associated with adverse outcomes in premature infants. *The Journal of pediatrics* 159, 720-725.
- [94] Lal MK, Manktelow BN, Draper ES und Field DJ (2003). Chronic lung disease of prematurity and intrauterine growth retardation: a population-based study. *Pediatrics* 111, 483-487.

- [95] Lavoie PM (2009). Earlier initiation of enteral nutrition is associated with lower risk of late-onset bacteremia only in most mature very low birth weight infants. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association* 29, 448-454.
- [96] Lee HM und Rich S (1993). Differential activation of CD8+ T cells by transforming growth factor-beta 1. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 151, 668-677.
- [97] Leigh L, Stoll BJ, Rahman M und McGowan J, Jr. (1995). Pseudomonas aeruginosa infection in very low birth weight infants: a case-control study. *The Pediatric infectious disease journal* 14, 367-371.
- [98] Leonard WJ und O'Shea JJ (1998). Jaks and STATs: biological implications. *Annual review of immunology* 16, 293-322.
- [99] Levy DE und Darnell JE, Jr. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature reviews Molecular cell biology* 3, 651-662.
- [100] Levy O (2002). Impaired innate immunity at birth: deficiency of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in the neutrophils of newborns. *Pediatric research* 51, 667-669.
- [101] Levy O (2007). Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nature reviews Immunology* 7, 379-390.
- [102] Li J, Li H, Mao H, Yu M, Yang F, Feng T, Fan Y, Lu Q, Shen C, Yin Z, Mao M und Tu W (2013). Impaired NK cell antiviral cytokine response against influenza virus in small-for-gestational-age neonates. *Cellular & molecular immunology* 10, 437-443.
- [103] Libert C, Vink A, Coulie P, Brouckaert P, Everaerd B, Van Snick J und Fiers W (1992). Limited involvement of interleukin-6 in the pathogenesis of lethal septic shock as revealed by the effect of monoclonal antibodies against interleukin-6 or its

receptor in various murine models. *European journal of immunology* 22, 2625-2630.

- [104] Lindner U, Tutdibi E, Binot S, Monz D, Hilgendorff A und Gortner L (2013). Levels of cytokines in umbilical cord blood in small for gestational age preterm infants. *Klinische Padiatrie* 225, 70-74.
- [105] Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ und Efstratiadis A (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75, 59-72.
- [106] Liu S, Khemlani LS, Shapiro RA, Johnson ML, Liu K, Geller DA, Watkins SC, Goyert SM und Billiar TR (1998). Expression of CD14 by hepatocytes: upregulation by cytokines during endotoxemia. *Infection and immunity* 66, 5089-5098.
- [107] Longo S, Bollani L, Decembrino L, Di Comite A, Angelini M und Stronati M (2013). Short-term and long-term sequelae in intrauterine growth retardation (IUGR). *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet* 26, 222-225.
- [108] Loppnow H, Stelter F, Schonbeck U, Schluter C, Ernst M, Schutt C und Flad HD (1995). Endotoxin activates human vascular smooth muscle cells despite lack of expression of CD14 mRNA or endogenous membrane CD14. *Infection and immunity* 63, 1020-1026.
- [109] Louvi A, Accili D und Efstratiadis A (1997). Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development. *Developmental biology* 189, 33-48.

- [110] Makhoul IR, Sujov P, Smolkin T, Lusky A und Reichman B (2002). Epidemiological, clinical, and microbiological characteristics of late-onset sepsis among very low birth weight infants in Israel: a national survey. *Pediatrics* 109, 34-39.
- [111] Makhoul IR, Sujov P, Smolkin T, Lusky A und Reichman B (2005). Pathogen-specific early mortality in very low birth weight infants with late-onset sepsis: a national survey. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 40, 218-224.
- [112] Mamelie N, Cochet V und Claris O (2001). Definition of fetal growth restriction according to constitutional growth potential. *Biology of the neonate* 80, 277-285.
- [113] Marchant A, Bruyns C, Vandenaabeele P, Ducarme M, Gerard C, Delvaux A, De Groote D, Abramowicz D, Velu T und Goldman M (1994). Interleukin-10 controls interferon-gamma and tumor necrosis factor production during experimental endotoxemia. *European journal of immunology* 24, 1167-1171.
- [114] Maritz GS, Cock ML, Louey S, Joyce BJ, Albuquerque CA und Harding R (2001). Effects of fetal growth restriction on lung development before and after birth: a morphometric analysis. *Pediatric pulmonology* 32, 201-210.
- [115] Maritz GS, Cock ML, Louey S, Suzuki K und Harding R (2004). Fetal growth restriction has long-term effects on postnatal lung structure in sheep. *Pediatric research* 55, 287-295.
- [116] Mark KS, Trickler WJ und Miller DW (2001). Tumor necrosis factor-alpha induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin release in brain microvessel endothelial cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 297, 1051-1058.
- [117] Marlow N, Morris T, Brocklehurst P, Carr R, Cowan FM, Patel N, Petrou S, Redshaw ME, Modi N und Dore C (2013). A randomised trial of granulocyte-

macrophage colony-stimulating factor for neonatal sepsis: outcomes at 2 years. *Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition* 98, F46-53.

- [118] Marshall JS, Leal-Berumen I, Nielsen L, Glibetic M und Jordana M (1996). Interleukin (IL)-10 inhibits long-term IL-6 production but not preformed mediator release from rat peritoneal mast cells. *The Journal of clinical investigation* 97, 1122-1128.
- [119] Marty C, Misset B, Tamion F, Fitting C, Carlet J und Cavaillon JM (1994). Circulating interleukin-8 concentrations in patients with multiple organ failure of septic and nonseptic origin. *Critical care medicine* 22, 673-679.
- [120] Massague J (1990). The transforming growth factor-beta family. *Annual review of cell biology* 6, 597-641.
- [121] Massaro D, Teich N, Maxwell S, Massaro GD und Whitney P (1985). Postnatal development of alveoli. Regulation and evidence for a critical period in rats. *The Journal of clinical investigation* 76, 1297-1305.
- [122] McEvoy LT, Zakem-Cloud H und Tosi MF (1996). Total cell content of CR3 (CD11b/CD18) and LFA-1 (CD11a/CD18) in neonatal neutrophils: relationship to gestational age. *Blood* 87, 3929-3933.
- [123] McIntire DD, Bloom SL, Casey BM und Leveno KJ (1999). Birth weight in relation to morbidity and mortality among newborn infants. *The New England journal of medicine* 340, 1234-1238.
- [124] Merritt TA und Farrell PM (1976). Diminished pulmonary lecithin synthesis in acidosis: experimental findings as related to the respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 57, 32-40.
- [125] Moller JC, Nelskamp I, Jensen R, Gatermann S, Iven H und Gortner L (1996). Teicoplanin pharmacology in prophylaxis for coagulase-negative staphylococcal

sepsis of very low birthweight infants. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)* 85, 638-639.

- [126] Moller JC, Nelskamp I, Jensen R, Reiss I, Kohl M, Gatermann S, Iven H und Gortner L (1997). Comparison of vancomycin and teicoplanin for prophylaxis of sepsis with coagulase negative staphylococci (CONS) in very low birth weight (VLBW) infants. *Journal of perinatal medicine* 25, 361-367.
- [127] Mouzinho A, Rosenfeld CR, Sanchez PJ und Risser R (1992). Effect of maternal hypertension on neonatal neutropenia and risk of nosocomial infection. *Pediatrics* 90, 430-435.
- [128] Nakane A, Minagawa T und Kato K (1988). Endogenous tumor necrosis factor (cachectin) is essential to host resistance against *Listeria monocytogenes* infection. *Infection and immunity* 56, 2563-2569.
- [129] Ness RB und Sibai BM (2006). Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology* 195, 40-49.
- [130] Ng TH, Britton GJ, Hill EV, Verhagen J, Burton BR und Wraith DC (2013). Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Frontiers in immunology* 4, 129.
- [131] Pan Z, Zhou L, Hetherington CJ und Zhang DE (2000). Hepatocytes contribute to soluble CD14 production, and CD14 expression is differentially regulated in hepatocytes and monocytes. *The Journal of biological chemistry* 275, 36430-36435.
- [132] Papile LA, Burstein J, Burstein R und Koffler H (1978). Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm. *The Journal of pediatrics* 92, 529-534.

- [133] Philip AG und Tito AM (1989). Increased nucleated red blood cell counts in small for gestational age infants with very low birth weight. *American journal of diseases of children (1960)* 143, 164-169.
- [134] Procianoy RS, Garcia-Prats JA, Adams JM, Silvers A und Rudolph AJ (1980). Hyaline membrane disease and intraventricular haemorrhage in small for gestational age infants. *Archives of disease in childhood* 55, 502-505.
- [135] Procianoy RS, Silveira RC, Mussi-Pinhata MM, Souza Rugolo LM, Leone CR, de Andrade Lopes JM und de Almeida MF (2010). Sepsis and neutropenia in very low birth weight infants delivered of mothers with preeclampsia. *The Journal of pediatrics* 157, 434-438, 438.e431.
- [136] Pugin J, Schurer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ und Tobias PS (1993). Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 2744-2748.
- [137] Puopolo KM, Draper D, Wi S, Newman TB, Zupancic J, Lieberman E, Smith M und Escobar GJ (2011). Estimating the probability of neonatal early-onset infection on the basis of maternal risk factors. *Pediatrics* 128, e1155-1163.
- [138] Qing G, Rajaraman K und Bortolussi R (1995). Diminished priming of neonatal polymorphonuclear leukocytes by lipopolysaccharide is associated with reduced CD14 expression. *Infection and immunity* 63, 248-252.
- [139] Qiu X, Lodha A, Shah PS, Sankaran K, Seshia MM, Yee W, Jefferies A und Lee SK (2012). Neonatal outcomes of small for gestational age preterm infants in Canada. *American journal of perinatology* 29, 87-94.
- [140] Raymond J und Aujard Y (2000). Nosocomial infections in pediatric patients: a European, multicenter prospective study. European Study Group. *Infection control and hospital epidemiology* 21, 260-263.

- [141] Read MA, Cordle SR, Veach RA, Carlisle CD und Hawiger J (1993). Cell-free pool of CD14 mediates activation of transcription factor NF-kappa B by lipopolysaccharide in human endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 9887-9891.
- [142] Reddy RK, Xia Y, Hanikyrova M und Ross GD (1998). A mixed population of immature and mature leucocytes in umbilical cord blood results in a reduced expression and function of CR3 (CD11b/CD18). *Clinical and experimental immunology* 114, 462-467.
- [143] Rehan VK, Sakurai R, Li Y, Karadag A, Corral J, Bellusci S, Xue YY, Belperio J und Torday JS (2012). Effects of maternal food restriction on offspring lung extracellular matrix deposition and long term pulmonary function in an experimental rat model. *Pediatric pulmonology* 47, 162-171.
- [144] Rey Nores JE, Bensussan A, Vita N, Stelter F, Arias MA, Jones M, Lefort S, Borysiewicz LK, Ferrara P und Labeta MO (1999). Soluble CD14 acts as a negative regulator of human T cell activation and function. *European journal of immunology* 29, 265-276.
- [145] Roberts AB, Flanders KC, Kondaiah P, Thompson NL, Van Obberghen-Schilling E, Wakefield L, Rossi P, de Crombrughe B, Heine U und Sporn MB (1988). Transforming growth factor beta: biochemistry and roles in embryogenesis, tissue repair and remodeling, and carcinogenesis. *Recent progress in hormone research* 44, 157-197.
- [146] Rousset F, Garcia E, Defrance T, Peronne C, Vezzio N, Hsu DH, Kastelein R, Moore KW und Banchereau J (1992). Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 1890-1893.
- [147] Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC und Dinarello CA (1990). Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and

tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 75, 40-47.

- [148] Schultz C, Temming P, Bucsky P, Gopel W, Strunk T und Hartel C (2004). Immature anti-inflammatory response in neonates. *Clinical and experimental immunology* 135, 130-136.
- [149] Schutt C, Schilling T, Grunwald U, Schonfeld W und Kruger C (1992). Endotoxin-neutralizing capacity of soluble CD14. *Research in immunology* 143, 71-78.
- [150] Schutt C, Schilling T und Kruger C (1991). sCD14 prevents endotoxin inducible oxidative burst response of human monocytes. *Allergie und Immunologie* 37, 159-164.
- [151] Schwab F, Geffers C, Barwolff S, Ruden H und Gastmeier P (2007). Reducing neonatal nosocomial bloodstream infections through participation in a national surveillance system. *The Journal of hospital infection* 65, 319-325.
- [152] Sehested LT und Pedersen P (2014). Prognosis and risk factors for intrauterine growth retardation. *Danish medical journal* 61, A4826.
- [153] Selby P, Hobbs S, Viner C, Jackson E, Jones A, Newell D, Calvert AH, McElwain T, Fearon K, Humphreys J et al. (1987). Tumour necrosis factor in man: clinical and biological observations. *British journal of cancer* 56, 803-808.
- [154] Shalaby MR, Waage A, Aarden L und Espevik T (1989). Endotoxin, tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1 induce interleukin 6 production in vivo. *Clinical immunology and immunopathology* 53, 488-498.
- [155] Sherman ML, Spriggs DR, Arthur KA, Imamura K, Frei E, 3rd und Kufe DW (1988). Recombinant human tumor necrosis factor administered as a five-day continuous infusion in cancer patients: phase I toxicity and effects on lipid

metabolism. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 6, 344-350.

- [156] Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K und Kimoto M (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *The Journal of experimental medicine* 189, 1777-1782.
- [157] Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D et al. (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359, 693-699.
- [158] Sibai B, Dekker G und Kupfermanc M (2005). Pre-eclampsia. *Lancet* 365, 785-799.
- [159] Simchen MJ, Beiner ME, Strauss-Liviathan N, Dulitzky M, Kuint J, Mashiach S und Schiff E (2000). Neonatal outcome in growth-restricted versus appropriately grown preterm infants. *American journal of perinatology* 17, 187-192.
- [160] Smerieri A, Petraroli M, Ziveri MA, Volta C, Bernasconi S und Street ME (2011). Effects of cord serum insulin, IGF-II, IGFBP-2, IL-6 and cortisol concentrations on human birth weight and length: pilot study. *PloS one* 6, e29562.
- [161] Smyth MJ, Strobl SL, Young HA, Ortaldo JR und Ochoa AC (1991). Regulation of lymphokine-activated killer activity and pore-forming protein gene expression in human peripheral blood CD8+ T lymphocytes. Inhibition by transforming growth factor-beta. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 146, 3289-3297.
- [162] Sohn AH, Garrett DO, Sinkowitz-Cochran RL, Grohskopf LA, Levine GL, Stover BH, Siegel JD und Jarvis WR (2001). Prevalence of nosocomial infections in neonatal intensive care unit patients: Results from the first national point-prevalence survey. *The Journal of pediatrics* 139, 821-827.

- [163] Soraisham AS, Singhal N, McMillan DD, Sauve RS und Lee SK (2009). A multicenter study on the clinical outcome of chorioamnionitis in preterm infants. *American journal of obstetrics and gynecology* 200, 372.e371-376.
- [164] Speer CP (2009). Chorioamnionitis, postnatal factors and proinflammatory response in the pathogenetic sequence of bronchopulmonary dysplasia. *Neonatology* 95, 353-361.
- [165] Spittler A, Schiller C, Willheim M, Tempfer C, Winkler S und Boltz-Nitulescu G (1995). IL-10 augments CD23 expression on U937 cells and down-regulates IL-4-driven CD23 expression on cultured human blood monocytes: effects of IL-10 and other cytokines on cell phenotype and phagocytosis. *Immunology* 85, 311-317.
- [166] Splawski JB, Jelinek DF und Lipsky PE (1991). Delineation of the functional capacity of human neonatal lymphocytes. *The Journal of clinical investigation* 87, 545-553.
- [167] Stoll BJ, Gordon T, Korones SB, Shankaran S, Tyson JE, Bauer CR, Fanaroff AA, Lemons JA, Donovan EF, Oh W, Stevenson DK, Ehrenkranz RA, Papile LA, Verter J und Wright LL (1996). Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *The Journal of pediatrics* 129, 63-71.
- [168] Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Lemons JA, Donovan EF, Stark AR, Tyson JE, Oh W, Bauer CR, Korones SB, Shankaran S, Lupton AR, Stevenson DK, Papile LA und Poole WK (2002). Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 110, 285-291.
- [169] Suffredini AF, Fromm RE, Parker MM, Brenner M, Kovacs JA, Wesley RA und Parrillo JE (1989). The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *The New England journal of medicine* 321, 280-287.

- [170] Takakuwa T, Knopf HP, Sing A, Carsetti R, Galanos C und Freudenberg MA (1996). Induction of CD14 expression in Lpsn, Lpsd and tumor necrosis factor receptor-deficient mice. *European journal of immunology* 26, 2686-2692.
- [171] Takeda K, Kaisho T und Akira S (2003). Toll-like receptors. *Annual review of immunology* 21, 335-376.
- [172] Teng RJ, Wu TJ, Garrison RD, Sharma R und Hudak ML (2009). Early neutropenia is not associated with an increased rate of nosocomial infection in very low-birth-weight infants. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association* 29, 219-224.
- [173] Thompson-Snipes L, Dhar V, Bond MW, Mosmann TR, Moore KW und Rennick DM (1991). Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *The Journal of experimental medicine* 173, 507-510.
- [174] Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF und Cerami A (1987). Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 330, 662-664.
- [175] Tsai LY, Chen YL, Tsou KI und Mu SC (2014). The Impact of Small for Gestational Age on Neonatal Outcome among Very Low Birth Weight Infants. *Pediatrics and neonatology*.
- [176] Uematsu S und Akira S (2008). Toll-Like receptors (TLRs) and their ligands. *Handbook of experimental pharmacology*, 1-20.
- [177] Urlichs F und Speer CP (2004). Neutrophil function in preterm and term infants. *NeoReviews* 5, e417-e429.
- [178] van den Berg JP, Westerbeek EA, van der Klis FR, Berbers GA und van Elburg RM (2011). Transplacental transport of IgG antibodies to preterm infants: a review of the literature. *Early human development* 87, 67-72.

- [179] van der Poll T, Buller HR, ten Cate H, Wortel CH, Bauer KA, van Deventer SJ, Hack CE, Sauerwein HP, Rosenberg RD und ten Cate JW (1990). Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects. *The New England journal of medicine* 322, 1622-1627.
- [180] van der Poll T, Levi M, Hack CE, ten Cate H, van Deventer SJ, Eerenberg AJ, de Groot ER, Jansen J, Gallati H, Buller HR et al. (1994). Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. *The Journal of experimental medicine* 179, 1253-1259.
- [181] Van Zee KJ, DeForge LE, Fischer E, Marano MA, Kenney JS, Remick DG, Lowry SF und Moldawer LL (1991). IL-8 in septic shock, endotoxemia, and after IL-1 administration. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 146, 3478-3482.
- [182] Voigt M, Rochow N, Straube S, Briese V, Olbertz D und Jorch G (2010). Birth weight percentile charts based on daily measurements for very preterm male and female infants at the age of 154-223 days. *Journal of perinatal medicine* 38, 289-295.
- [183] Volpe JJ (2001). *Neurology of the Newborn*, 4. Ausg., W.B. Saunders, Philadelphia.
- [184] von Eiff C, Peters G und Heilmann C (2002). Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *The Lancet Infectious diseases* 2, 677-685.
- [185] Walsh MC und Kliegman RM (1986). Necrotizing enterocolitis: treatment based on staging criteria. *Pediatric clinics of North America* 33, 179-201.
- [186] Wan YY und Flavell RA (2007). 'Yin-Yang' functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation. *Immunological reviews* 220, 199-213.

- [187] Waugh DJ und Wilson C (2008). The interleukin-8 pathway in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 6735-6741.
- [188] Westby Wold SH, Sommerfelt K, Reigstad H, Ronnestad A, Medbo S, Farstad T, Kaaresen PI, Stoen R, Leversen KT, Irgens LM und Markestad T (2009). Neonatal mortality and morbidity in extremely preterm small for gestational age infants: a population based study. *Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition* 94, F363-367.
- [189] Willems F, Marchant A, Delville JP, Gerard C, Delvaux A, Velu T, de Boer M und Goldman M (1994). Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *European journal of immunology* 24, 1007-1009.
- [190] Wirbelauer J, Thomas W, Rieger L und Speer CP (2010). Intrauterine growth retardation in preterm infants ≤ 32 weeks of gestation is associated with low white blood cell counts. *American journal of perinatology* 27, 819-824.
- [191] Xie F, Hu Y, Turvey SE, Magee LA, Brunham RM, Choi KC, Krajdén M, Leung PC, Money DM, Patrick DM, Thomas E und von Dadelszen P (2010). Toll-like receptors 2 and 4 and the cryopyrin inflammasome in normal pregnancy and pre-eclampsia. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 117, 99-108.
- [192] Yoon BH, Romero R, Jun JK, Park KH, Park JD, Ghezzi F und Kim BI (1997). Amniotic fluid cytokines (interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8) and the risk for the development of bronchopulmonary dysplasia. *American journal of obstetrics and gynecology* 177, 825-830.
- [193] Zeitlin J, El Ayoubi M, Jarreau PH, Draper ES, Blondel B, Kunzel W, Cuttini M, Kaminski M, Gortner L, Van Reempts P, Kollee L und Papiernik E (2010). Impact

of fetal growth restriction on mortality and morbidity in a very preterm birth cohort. *The Journal of pediatrics* 157, 733-739.e731.

- [194] Zhang J, Merialdi M, Platt LD und Kramer MS (2010). Defining normal and abnormal fetal growth: promises and challenges. *American journal of obstetrics and gynecology* 202, 522-528.

Internetquellen

- [195] NEO-KISS Protokoll des NRZ (Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen des Robert Koch Institutes) unter: <http://www.nrz-hygiene.de/fileadmin/nrz/download/NEOKISSProtokoll221209.pdf> (Tag des letzten Zugriffs: 17.03.2015)

VI Anhang

Tabelle 9: Definition einer Sepsis bei Früh und Neugeborenen nach dem Surveillance-Protokoll NEO-KISS des NRZ (Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen des Robert Koch Institutes) [195]

Sepsis	Kriterien
Klinische Sepsis (ohne Erregernachweis)	<ul style="list-style-type: none"> • Betreuender Arzt beginnt geeignete antimikrobielle Therapie für Sepsis für mindestens 5 Tage • Kein Keimwachstum in der Blutkultur oder nicht getestet • Keine offensichtliche Infektion an anderer Stelle • Zwei der klinischen Zeichen und Symptome *
Mikrobiologisch bestätigte Sepsis (aber kein KNS)	<ul style="list-style-type: none"> • Erreger aus Blut oder Liquor isoliert und kein KNS (Keim ist mit Infektion an anderer Stelle nicht verwandt) • Zwei der klinischen Zeichen und Symptome *
Mikrobiologisch bestätigte Sepsis (nur KNS)	<ul style="list-style-type: none"> • Ausschließlich KNS aus Blutkultur oder intravasalem Katheter isoliert • Zwei der klinischen Zeichen und Symptome * • Ein Laborparameter #

* Klinischen Zeichen und Symptome

- Fieber (>38 °C) oder Temperaturinstabilität (häufiges Nachstellen des Inkubators) oder Hypothermie (<36.5 °C)
- unerklärte metabolische Azidose (BE < -10 mval/l)
- Tachykardie (> 200/min) oder neu/vermehrte Bradykardien (<80/min)
- neu aufgetretene Hyperglykämie (>140mg/dl)
- Rekapillarierungszeit >2s
- anderes Sepsiszeichen: Hautkolorit (nur wenn Rekapillarierungszeit nicht verwendet), erhöhter Sauerstoffbedarf (Intubation), instabiler AZ, Apathie
- neu oder vermehrte Apnoe(en) (>20s)

Ein Laborparameter

- CRP >2,0mg/dl oder Interleukin
- Thrombozyten < 100/nl
- I/T-Ratio >0,2 (unreife Granulozyten / gesamt Granulozyten)
- Leukozyten < 5/nl (ohne Erythroblasten)

VII Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Christoph Härtel für die Überlassung des Themas und die großartige Betreuung während des gesamten Zeitraums der Dissertation. Seine Hilfsbereitschaft und positive Art hatten großen Anteil an der angenehmen Atmosphäre, in der diese Arbeit entstehen konnte.

Auch gilt mein Dank Anja Sewe für die umfassende und geduldige Einarbeitung im Labor. Durch sie waren die Stunden dort nicht nur sehr lehrreich und produktiv, sondern auch stets von vielen interessanten persönlichen Gesprächen erfüllt.

Weiterhin danke ich den Mitarbeiterinnen des GNN-Büros (Anja Kaufmann, Irene Fischer und Bea Hatje) sowie der Archivmitarbeiterin Frau Liese für die Hilfe bei der Recherche und der Anfertigung der Dissertation.

Ich danke Frau Dr. Birte Tröger für die tolle Betreuung während meines Praktikums auf der neonatologischen Intensivstation, welches im Rahmen der Dissertation stattfand. Ihr Engagement hat eine Menge zu meinem Wunsch, Kinderarzt zu werden, beigetragen.

Auch möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre grenzenlose Unterstützung in allen Lebenslagen und ihr Vertrauen in den von mir gewählten Weg bedanken.

Ich danke meiner Freundin für die zahlreichen Ratschläge im Bezug auf die Dissertation und für die Zeit, die wir gemeinsam verbrachten und noch verbringen werden.

Abschließend danke ich meinen Schwestern für die Hilfe bei der Entscheidung zur Übernahme des Themas und der Korrektur der Arbeit sowie bei meinen Freunden für die gemeinsame Studienzeit.

VIII Veröffentlichungen

Tröger B, Müller T, Faust K, Bendiks M, Bohlmann MK, Thonnissen S, Herting E, Göpel W, and Härtel C (2013). Intrauterine growth restriction and the innate immune system in preterm infants of ≤ 32 weeks gestation. *Neonatology* 103, 199-204.

Tröger B, Göpel W, Faust K, Müller T, Jorch G, Felderhoff-Muser U, Gortner L, Heitmann F, Hoehn T, Kribs A, et al. (2014). Risk for late-onset blood-culture proven sepsis in very-low-birth weight infants born small for gestational age: a large multicenter study from the German Neonatal Network. *The Pediatric infectious disease journal* 33, 238-243.

IX Lebenslauf

Thilo Müller

Persönliche Daten

Geburtsdatum 4.4.1988
Geburtsort Hannover
Staatsangehörigkeit deutsch



Schulische Ausbildung

1998 – 2006 Integrierte Gesamtschule Garbsen
2006 Abitur

Studium

Oktober 2006 – Juli 2007 Studium Generale am Leibniz Kolleg in Tübingen
Oktober 2007 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der
Universität zu Lübeck
August 2009 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
August 2013 – Juli 2014 Praktisches Jahr (Wahlfach: Pädiatrie)
Dezember 2014 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Doktorarbeit

2011 – 2015 Charakterisierung der Immunantwort und
Infektionsprädisposition von small-for-gestational-age
Frühgeborenen