

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. E. Herting

**Immunologische und klinische Einflussfaktoren von
Infektionen mit koagulase-negativen Staphylokokken in der
Neonatalogie**

**Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der medizinischen Fakultät-**

**vorgelegt von Berit Christin Haase
aus Eckernförde
Lübeck**

1. Berichterstatter/ Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. Christoph Härtel
2. Berichterstatter/ Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. Daniel Drömann
- Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2011
- Zum Druck genehmigt: 06.12.2011

*Die Widmung dieser Dissertation gebührt einem Kind. Einem ganz besonderen Kind, von dem ich mich 249 Tage gefragt habe: wie mag es wohl aussehen, sich anfühlen und riechen? Am 21.09.2010 hielt ich es dann das erste Mal in meinen Armen.
Ich wünsche dir alles nur erdenklich Gute mein kleiner Schatz!*

Lennard Maximilian Haase

errechneter Geburtstermin 22.10.2010

geboren am 21.09.2010

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
1 Einleitung	8
1.1 Die neonatale Sepsis	8
1.2 Frühgeburtlichkeit	9
1.3 Koagulase negative Staphylokokken	11
1.4 Parenterale Ernährung	12
1.5 Die intravenöse Lipid- und Glukoseapplikation als wesentliche Bestandteile der parenteralen Ernährung des Neugeborenen	14
1.6 Enteraler Nahrungsaufbau bei Neugeborenen	17
1.7 Immunologische Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems und deren Unreife beim Neugeborenen	19
1.8 Die Rolle der untersuchten Zytokine bei der Immunantwort	20
2 Fragestellung	22
3 Material und Methoden	23
3.1 Reagenzien	23
3.2 Monoklonale Antikörper	24
3.3 Stimulanzien für die Zellkultur	24
3.4 Geräte	25
3.5 Computerprogramme	25
3.6 Untersuchungsmaterial	25
3.7 In-vitro-Sepsis-Modell/ Zellkultur	26
3.7.1 Lipide: verschiedene Konzentrationen	26
3.7.2 Lipide: verschiedene Bakterienstämme	27
3.7.3 Glukose: verschiedene Konzentrationen	27
3.7.4 Protokoll	27
3.8 Zellfixation	29
3.8.1 Protokoll	29
3.9 Permeabilisierung und Antigenmarkierung mittels spezifischer Antikörper	30
3.9.1 Monoklonale Antikörper	30
3.9.2 Protokoll	30
3.10 Durchflusszytometrie - Messung intrazellulärer Zytokine in Monozyten	31
3.11 Studienpopulation der Multizenterstudie - Nahrungsaufbau	31
3.11.1 Beurteilung des Outcomes der Patienten	32
3.12 Statistische Analysen	33

3.13	Ethikvotum	33
4	Ergebnisse der in-vitro Studien	33
4.1	Kollektiv der Neu- und Frühgeborenen.....	33
4.2	Zytokinproduktion in Abhängigkeit von verschiedenen Lipidkonzentrationen.....	34
4.3	Zytokinproduktion unter der Stimulation durch verschiedene Bakterienstämme	36
4.4	Zytokinproduktion in Abhängigkeit von verschiedenen Glukosekonzentrationen ..	39
5	Ergebnisse der multizentrischen Studie.....	43
5.1	Studienpopulation.....	43
5.2	Klinische Charakteristika der Kohorten	45
5.3	Klinisches Outcome unter den verschiedenen Nahrungsaufbaustrategien.....	46
6	Diskussion	47
7	Zusammenfassung	51
8	Danksagungen	53
9	Referenzen	54
10	Publikationen.....	59
11	Lebenslauf	60

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ursachen der Frühgeburtlichkeit.....	9
Tabelle 2: Komplikationen von Frühgeburtlichkeit	10
Tabelle 3: KoNS Spezies, die in der Neonatologie eine Rolle spielen.....	11
Tabelle 4: Energie- und Nährstoffbedarf von Früh- und Neugeborenen bei TPN	15
Tabelle 5: Vorinkubationsschema	28
Tabelle 6: Beeinflussung der Zytokinexpression durch Zusatz von Lipidlösung	28
Tabelle 7: Einfluss verschiedener Staph. epi. Stämme auf die Zytokinexpression.....	28
Tabelle 8: Untersuchung des Einflusses von Glukoselösung auf die Zytokinexpression	29
Tabelle 9: Studienpopulation bei der Untersuchung des enteralen Nahrungsaufbaus	43
Tabelle 10: Klinische Charakteristika der VLBW Kohorte	45
Tabelle 11: Klinisches Outcome der Kinder eingeteilt nach Ernährungsstrategie.....	46

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: IL6 Produktion in Abhängigkeit von der Lipidkonzentration.....	34
Abbildung 2: IL8 Produktion in Abhängigkeit von der Lipidkonzentration.....	35
Abbildung 3: TNF α Produktion in Abhängigkeit von der Lipidkonzentration.....	36
Abbildung 4: IL6 Produktion unter der Stimulation durch verschiedene Bakterienstämme ...	37
Abbildung 5: IL8 Produktion unter der Stimulation durch verschiedene Bakterienstämme ...	38
Abbildung 6: TNF α Produktion unter der Stimulation durch verschiedene Bakterienstämme	39
Abbildung 7: IL6 Produktion in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration	40
Abbildung 8: IL8 Produktion in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration	41
Abbildung 9: TNF α Produktion in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration	42

Abkürzungsverzeichnis

AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BPD	bronchopulmonale Dysplasie
CARS	compensatory antiinflammatory response system
CRP	C-reaktives Protein
CTG	Cardiotokogramm
DGEM	Deutsche Gesellschaft für Ernährungsmedizin
ELBW	extremely low birth weight
EOS	early onset sepsis
EPH	Edema – Proteinurie – Hypertension Gestose
ESPEN	The European Society for Clinical Nutrition and Metabolism
ESPGHAN	European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition
ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
IL	Interleukin
IUGR	intrauterine growth retardation
IVH	intraventriculäre Hämorrhagie
KoNS	Koagulase negative Staphylokokken
LBW	low birth weight
LOS	late onset sepsis
NEC	necrotizing enterocolitis
PDA	persistierender Ductus arteriosus
RDS	respiratory distress syndrome
RKI	Robert Koch-Institut

ROP	retinopathy of prematurity
RSV	respiratory syncytial virus
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SSW	Schwangerschaftswochen
TNF	Tumornekrosefaktor
TPN	total parenteral nutrition
VLBW	very low birth weight
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

1.1 Die neonatale Sepsis

Auf Grund des großen Fortschrittes in der Neonatologie in den letzten Jahren konnte die Mortalität von Neu- und Frühgeborenen wesentlich verbessert werden, jedoch ist die Morbidität mit der Notwendigkeit invasiver Maßnahmen assoziiert [1]. Eine nach wie vor große Bedeutung, insbesondere für Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g (very low birth weight= VLBW), hat die neonatale Sepsis. Eine Sepsis ist definiert als eine mittels positiver Blutkultur bewiesenen Infektion im Zusammenhang mit einem Systemic Inflammatory Response Syndrom (SIRS), mit Fieber oder Hypothermie, Tachykardie, Tachypnoe und Leukozytose oder Leukopenie [2]. Eine schwere Sepsis bzw. ein septischer Schock ist definiert als eine Sepsis mit Organdysfunktion und Hypotension, trotz adäquater Therapie [2]. Für Früh- und Neugeborene wurde darüber hinaus im deutschen Surveillance-Modul NEO-KISS des RKI eine differenziertere Definition entwickelt, da die diagnostische Wertigkeit einer Blutkultur bei diesen Patienten nur bedingt gewährleistet ist. So unterscheidet man die klinische Sepsis ohne Erregernachweis von der mikrobiologischen Sepsis [3]. Nach dem Zeitpunkt des Auftretens spricht man von einer Early Onset Sepsis (EOS), wenn diese in den ersten 72 Lebensstunden auftritt, von einer Late Onset Sepsis (LOS), wenn diese sich nach 72 Stunden entwickelt [4]. Im Folgenden soll die LOS genauer erläutert werden. Keime, die sich hier als besonders relevant herausgestellt haben, sind gram-positive Bakterien, worunter die Koagulase-negativen Staphylokokken mit fast 50% die bedeutendste Rolle spielen [4]. Kinder, die an einer Sepsis erkranken, haben eine deutlich erhöhte Mortalität, Morbidität und müssen stets länger im Krankenhaus bleiben als gesund Geborene [1]. Die höchsten Infektionsraten werden bei Kindern beobachtet, die mit einem Geburtsgewicht von 401-750 g bzw. < 25 SSW zur Welt kommen. Die Diagnose einer Sepsis beruht zum einen auf der Beachtung möglicher Risikofaktoren, der z.T. sehr unspezifischen klinischen Zeichen und entsprechenden Laborparameter sowie einer positiven Blutkultur [5]. Klinische Zeichen, die zu der Diagnose Sepsis führen können, sind eine erhöhte Apnoerate, Fütterungsprobleme, ein erhöhter Bedarf an respiratorischer Unterstützung, Hypothermie, ein lethargisches Erscheinungsbild, Hypotonie, sowie Meteorismus. Die Sepsis relevanten Laborparameter, die in jedem Fall überwacht werden sollten, sind das Blutbild, eine ungeklärte metabolische Azidose sowie Hypo- oder Hyperglykämien.

1.2 Frühgeburtslichkeit

Laut der ICD 10 Klassifikation der WHO ist die Frühgeburtslichkeit definiert als ein Gestationsalter von mehr als 28 SSW jedoch weniger als 37 vollendete Wochen, also ab einer Schwangerschaftsdauer von 196 vollendeten bis unter 259 vollendeten Tagen [6]. Liegt das Gestationsalter unter 28 SSW, so wird von extremer Unreife gesprochen. Darüber hinaus werden die Kinder nach ihrem Geburtsgewicht unterteilt in Kinder mit einem geringen Geburtsgewicht (LBW – low birth weight: < 2500g), einem sehr geringen Geburtsgewicht (VLBW – very low birth weight: < 1500g) und einem extrem geringen Geburtsgewicht (ELBW – extremely low birth weight: < 1000g). Laut Statistischem Bundesamt wurden 2006 in Deutschland rund 700 000 Kinder geboren [7]. Die Rate an Frühgeburten weltweit variiert zwischen 5-10% [8]. Die Anzahl von VLBW Kindern unter diesen Frühgeborenen ist starken regionalen Unterschieden unterworfen und liegt in den Industrieländern zwischen 3,6 -10 % und in den Entwicklungsländern zwischen 9,3 und 43% , was vor allem auf die intrauterine Malnutrition zurückzuführen ist [8]. Der häufigste Grund von Frühgeburtslichkeit ist eine aufsteigende urogenitale Infektion der werdenden Mütter. Dies ist insbesondere der Fall, wenn diese vor der 32 SSW beginnt [9]. Weitere häufige Ursachen der Frühgeburtslichkeit sind in der Tabelle 1 zusammengefasst [10].

Tabelle 1: Ursachen der Frühgeburtslichkeit

<i>Ursachen der Frühgeburtslichkeit</i>	
Maternal	<ul style="list-style-type: none"> - Pathologisches CTG - Pathologische Dopplersonographie - Vorzeitige Wehen - Vorzeitiger Blasensprung - Amnioninfektionssyndrom - Akute Plazentalösung - Mütterliche Erkrankungen wie z.B. EPH Gestose
Fetal	<ul style="list-style-type: none"> - Mehrlingsschwangerschaften - Intrauterine Wachstumsverzögerung (IUGR)

Frühgeburtslichkeit ist für 60% der perinatalen Mortalität und für 50% der neurologischen Langzeitmorbidität verantwortlich, geht meist mit einer intensivmedizinischen Betreuung einher und stellt auch für die meisten Familien eine erhebliche emotionale, ökonomische und

psychosoziale Belastung dar. Das Überleben konnte in den letzten Jahrzehnten dank intensivmedizinischer Maßnahmen verbessert werden. 85% der Frühgeborenen können nach Hause entlassen werden [11], dennoch besteht eine stabile Rate an medizinischen Komplikationen für diese Kinder in kurzer und langfristiger Hinsicht. Tabelle 2 fasst die auf die verschiedenen Organsysteme bezogenen kurzfristigen und langfristigen medizinischen Probleme zusammen.

Tabelle 2: Komplikationen von Frühgeburtlichkeit [11]

<i>Organsystem</i>	<i>Kurzzeitproblematik</i>	<i>Langzeitproblematik</i>
Pneumologisch	- RDS - BPD - Apnoen	- BPD - Asthma bronchiale - Infektanfälligkeit
Gastrointestinal	- Hyperbilirubinämie - Nahrungsintoleranz - NEC - Wachstumsverzögerung	- Gedeihstörungen - Kurzdarmsyndrom - Cholestase
Immunologisch	- Nosokomiale Infektionen - Immundefizienz - Perinatale Infektionen	- RSV Infektionen - Bronchiolitis
Zentralnervös	- IVH - Periventrikuläre Leukomalazie - Hydrocephalus	- Zerebralparese - Hydrocephalus - Zerebrale Atrophie - Neurologische Entwicklungsverzögerung - Taubheit
Ophthalmologisch	- ROP	- Blindheit - Netzhautablösung - Myopie - Strabismus
Kardiovaskulär	- Hypotension - PDA - Pulmonale Hypertension	- Pulmonale Hypertension - Arterielle Hypertension
Renal	- Gestörter Wasser-, Elektrolyt-, Säure-	- Arterielle Hypertension

Basenhaushalt	
Hämatologisch	- Iatrogene Anämie - Häufiger Transfusionsbedarf
Endokrinologisch	- Hypoglykämie - Glukoseregulationsstörungen - Transiente Hypothyreose - Erhöhte Insulinresistenz - Kortisol-Defizienz

1.3 Koagulase negative Staphylokokken

Koagulase-negative Staphylokokken (KoNS), die früher lediglich als normale Haut- und Schleimhautkeime betrachtet wurden, werden zurzeit als Hauptgrund von nosokomialen Infektionen bei kritisch kranken Personen beobachtet [12]. Der Familienname „Staphylococcus“ wurde durch Sir Alexander Ogston eingeführt, der als erster den mikroskopischen Unterschied zwischen „Haufen formenden“ und „Ketten formenden“ Bakterien erkannte. Es handelt sich um gram-positive, unbewegliche Bakterien. Im Labor grenzt man Koagulase bildende von nicht Koagulase bildenden Staphylokokken ab. Die Produktion freier Koagulase verleiht den Bakterien die Fähigkeit, Plasma zu koagulieren. [13]. Während vor 1980 die meisten LOS noch durch Staphylococcus aureus und gram-negative Bakterien verursacht worden sind, sind nun die KoNS die prädominanten Keime, die für etwa die Hälfte der Infektionen zuständig sind [1, 14, 15]. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Bakterien, die zu der Gruppe der KoNS gezählt werden. Unter ihnen ist der klinisch am häufigsten anzutreffende Staph. epidermidis.

Tabelle 3: KoNS Spezies, die in der Neonatologie eine Rolle spielen

Koagulase negative Staphylokokken

Staph. epidermidis
Staph. haemolyticus
Staph. capitis
Staph. simulans
Staph. warneri
Staph. hominis
Staph. cohnii
Staph. auricularis

Die Pathogenität von KoNS, die fast ausschließlich nicht ausreichend immunkompetente Individuen beeinträchtigen, hängt eng mit der Fähigkeit zusammen, an diversen Biomaterialien zu adhären und einen Biofilm zu bilden, der aus Serum und flüssigen Gewebsbestandteilen zusammengesetzt ist. Die Adhäsion wird über Adhesine, sowie elektrostatische hydrophobe Interaktionen gewährleistet. [13]. Die Biofilmbildung kann in zwei Phasen eingeteilt werden. Zunächst kommt es zur bakteriellen Adhärenz an organischen und anorganischen Oberflächen. Die zweite Zellakkumulationsphase hingegen läuft ein wenig langsamer ab. In dieser Phase kommt es zur Bildung von interzellulären Polysaccharid-Adhäsinen, für deren Produktion das *icaADB* Operon verantwortlich ist. Dieses ist besonders bei den invasiven Stämmen weit verbreitet [16]. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass *icaADB* negative Stämme eine geringere Fähigkeit aufweisen, in den Körper eingebrachte Materialien zu kolonisieren. [17, 18]. Klingenberg et al. beobachteten, dass die CRP Bildung bei Biofilm produzierenden Stämmen geringer ist als bei anderen. [16]. Die hohe Anzahl von Antibiotikaresistenzen, die besonders im klinischen Alltag ein großes Problem darstellt, ist zum einen auf den rein mechanisch schützenden Effekt des Biofilms zurückzuführen und zum anderen wird vermutet, dass die enge Ansammlung der Bakterien unter diesem schützenden Biofilm dazu führt, dass der Austausch von Resistenzfaktoren untereinander leichter gelingt [16].

1.4 Parenterale Ernährung

Die total parenterale Ernährung (TPN = total parenteral nutrition) ist ein wichtiges Mittel, um den Neugeborenen alle essentiellen Nahrungsbestandteile zukommen zu lassen, die sie für eine adäquate Entwicklung benötigen [19]. Die Geschichte der parenteralen Ernährung geht bis in das Jahr 1660 zurück, als noch Öl und Wein die Komponenten waren, die intravenös appliziert wurden [20]. 1966 implantierte Dudrick nach Versuchen an Hunden einem Kind mit Kurzdarmsyndrom einen Katheter in die Vena cava zur Applikation von Nahrungsbestandteilen und schlussfolgerte aus seinem Erfolg, dass TPN den Personen angedacht werden sollte, die nicht essen können, nicht dürfen oder dies nicht in ausreichender Menge tun [21]. Eine unzureichende Ernährung, besonders in den ersten Lebenswochen, führt zu einem frühen Wachstumsdefizit, das weitreichende Folgen wie eine verminderte Körperendgröße und eine eingeschränkte neuronale Entwicklung haben kann [22]. Die ersten Lebenswochen eines VLBW Kindes sind kritisch und in keiner anderen Lebensphase sind die Bedürfnisse einer adäquaten Ernährung größer als in diesen ersten Lebenstagen [23]. Es gilt bei der Abwägung, ob ein Kind enteral oder parenteral ernährt werden soll, unter anderem zu

beachten, dass insbesondere bei den Frühgeborenen die enterale Nahrungsaufnahme in der Regel durch die Unreife des Gastrointestinaltraktes, die sich durch eine verzögerte Magenentleerung, gastroösophagealen Reflux, abdominelle Distension und sehr geringen Stuhlabgang äußern kann [22], eingeschränkt ist. Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass auch die Frühgeborenen von einer frühen enteralen Ernährung in Bezug auf Infektionen profitieren können und das Risiko an einer nekrotisierenden Enterokolitis zu erkranken, nicht ansteigt [24]. Es bleibt also im Einzelfall abzuwägen, die beste Nutzen- und Risikorelation für das einzelne Kind zu treffen, um das Kind bestmöglich in seiner Entwicklung zu unterstützen. Das Ziel des Nahrungsregimes sollte es besonders bei VLBW Kindern sein, ein Wachstum und Gedeihen zu erreichen, das in etwa dem intrauterinen Wachstum entsprechen würde [22].

Gerade in Bezug auf die KoNS Infektionen muss die parenterale Ernährung kritisch betrachtet werden. Auf der einen Seite ist es essentiell wichtig, Risiko-Neugeborene ausreichend mit Nährstoffen zu versorgen. Auf der anderen Seite sind es gerade die intravenös ernährten Risiko-Neugeborenen, die ein hohes Sepsisrisiko aufweisen. 5-37 % der Kinder, die TPN erhalten, bekommen eine Bakteriämie, meist durch KoNS [25, 26]. Es wird auf der einen Seite postuliert, dass die intravenösen Zugänge einer der Risikofaktoren sind, die es den Bakterien ermöglichen, die Hautbarriere zu überwinden. Ebenso könnten die Bestandteile der parenteralen Ernährung selbst zu einer dysregulierten Immunantwort gegenüber den Bakterien führen [19].

Es gibt verschiedene Leitlinien zur parenteralen Ernährung in der Pädiatrie und Neonatologie. Die von der AWMF (Arbeitsgemeinschaft der medizinischen Fachgesellschaften) und der DGEM (Deutsche Gesellschaft für Ernährungsmedizin) erarbeiteten Leitlinien zur parenteralen Ernährung von Patienten in der Neonatologie und Pädiatrie wurden in Anlehnung an die „Guidelines of Paediatric Parenteral Nutrition“, einer Arbeitsgruppe der European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) und der European Society of Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN) erstellt [27-29]. Die Empfehlungen für die Neonatalzeit gehen auf eine Vielzahl publizierter Studien und systematischer Übersichtsartikel zurück. Schwieriger ist die Datenlage für ältere Kinder. Im Folgenden sollen die Empfehlungen für die Neonatalperiode im Vordergrund stehen, die definitionsgemäß den 1. bis 28. Lebenstag umfasst und deren alters- und reifeabhängige Besonderheiten bezüglich Flüssigkeits- und Nährstoffbedarf berücksichtigt. Das Nutrition Committee der „Canadian Paediatric Society“ hat darüber hinaus noch spezifischer zusammengetragen, was die Empfehlungen für Frühgeborene anbelangt [30]. In der Regel benötigen alle Frühgeborenen < 35 SSW und alle kranken Reifgeborenen während der Phase

des enteralen Nahrungsaufbaus eine vollständige oder teilparenterale Ernährung [27]. Frühgeborene werden im Vergleich zu Reifgeborenen mit geringeren Energiereserven geboren und haben deswegen einen hohen Bedarf an Nährstoffen. Diese Problematik äußert sich vor allem durch das besondere Risiko für Hypoglykämien. Die Tabelle 4 zeigt, wie differenziert die Ernährung in den ersten Lebenstagen bei Frühgeborenen und kranken Reifgeborenen betrachtet werden muss.

1.5 Die intravenöse Lipid- und Glukoseapplikation als wesentliche Bestandteile der parenteralen Ernährung des Neugeborenen

Zu den wesentlichen Bestandteilen der parenteralen Ernährung zählen neben einer balancierten Flüssigkeitszufuhr eine ausgeglichene Nährstoffbilanz aus den Komponenten Glukose, Aminosäuren, Lipide sowie Spurenelemente und Vitamine. Im Folgenden wird insbesondere auf die beiden integralen Bestandteile Glukose und Lipide eingegangen, die Gegenstand unserer Untersuchung waren.

Der Energiebedarf wird nicht nur vom Alter (siehe Tabelle 4) bestimmt, sondern variiert auch je nach Erkrankung und aktueller Therapie. Bedarfstabellen können für den klinischen Alltag eine gute Orientierungshilfe darstellen, müssen aber je nach Zustand des Patienten an seinen aktuellen Bedarf angepasst werden. Hierbei ist stets zu beachten, dass die Richtwerte an gesunden Patienten gewonnen wurden und Umstände wie Fieber oder Fototherapie nicht berücksichtigt wurden und so Auf- und Abschläge nicht nur zugelassen, sondern auch erwünscht sind [27]. Geeignete Monitoring-Maßnahmen können den tatsächlichen Bedarf des Patienten überwachen.

<i>Tag</i>	<i>Geburtsgewicht</i>	<i>Energie</i> [kcal/kgKG/d]	<i>Flüssigkeit</i> [ml/kgKG/d]	<i>Glukose</i> [g/kgKG/d]	<i>Aminosäuren</i> [g/kg/KG/d]	<i>Lipide</i> [g/kgKG/d]	<i>NaCl</i> [mmol/kgKG/d]	<i>KCl</i> [mmol/kgKG/d]
1	FG < 1000g		90	4-8	1 (-3)	1	0	0
	FG 1000-1500g		80	4-8	1 (-3)	1	0	0
	NG > 1500		60	4-10	1 (-3)	1	2-5	1-3 (nach Miktion)
2	FG < 1000g		110	4-8	1 (-3)	1	0	0
	FG 1000-1500g		100	4-8	1 (-3)	1	0	0
	NG > 1500		80	4-10	1 (-3)	1	2-5	1-3
3	FG < 1000g		130	5-9	1 (-3)	1	0	0
	FG 1000-1500g		120	5-9	1 (-3)	1	(2-5)	(1-3)
	NG > 1500		100	5-10	1 (-3)	1	2-5	1-3
4	FG < 1000g		150	5-10	2 (-3)	1	(2-5)	(1-3)
	FG 1000-1500g		140	5-10	2 (-3)	1	2-5	1-3
	NG > 1500		120	6-12	2 (-3)	1	2-5	1-3
5	FG < 1000g		160	6-12	2,5 (-3)	2	2-5	1-3
	FG 1000-1500g		160	6-12	2,5 (-3)	2	2-5	1-3
	NG > 1500		140	7-15	2,5 (-3)	2	2-5	1-3
6	FG < 1000g	80-160	160	7-14	2,5 (-3)	3	2-5	1-3
	FG 1000-1500g	70-140	160	7-14	2,5 (-3)	3	2-5	1-3
	NG > 1500	60-120	160	7-16	2,5 (-3)	3	2-5	1-3
7	FG < 1000g	80-160	160	7-16	2,5 (-3)	3,5	2-5	1-3
	FG 1000-1500g	70-140	160	7-16	2,5 (-3)	3,5	2-5	1-3
	NG > 1500	60-120	160	7-16	2,5 (-3)	3,5	2-5	1-3
14	FG < 1000g	80-160	160	7-16	2,5 (-4)	3,5	2-5	1-3
	FG 1000-1500g	70-140	160	7-16	2,5 (-4)	3,5	2-5	1-3
	NG > 1500	60-120	160	7-16	2,5 (-4)	3,5	2-5	1-3
28	FG < 1000g	80-160	160	7-16	2,5 (-4)	3,5	2-5	1-3
	FG 1000-1500g	70-140	160	7-16	2,5 (-4)	3,5	2-5	1-3
	NG > 1500	60-120	160	7-16	2,5 (-4)	3,5	2-5	1-3

Tabelle 4: Energie- und Nährstoffbedarf von Früh- und Neugeborenen bei TPN (DGEM 2007)

Kohlenhydrate sind die Hauptenergielieferanten und stellen in der Regel rund 40-60% der Nicht- Protein Kalorienzufuhr dar [29]. Glukose kann von allen Zellen verwertet werden und stellt darüber hinaus die obligatorische Energiequelle für das zentrale Nervensystem dar. Auch schon während der Schwangerschaft stellt die Glukose die Hauptkohlenhydratquelle dar, von der das Kind über die Plazenta in etwa 5mg/kg/min im letztem Trimenon zugeführt bekommt [29]. In den ersten Lebenstagen treten bei Neugeborenen häufig Schwankungen des Blutglukosespiegels auf. Die noch geringen Substratreserven führen zu Hypoglykämien, während Hyperglykämien durch Insulinresistenz oder systemische Inflammation verursacht werden können [31-33]. Die Inzidenz von Hyperglykämien steigt mit abnehmendem Gestationsalter [34, 35]. Als untere Grenze definiert man im Allgemeinen einen Blutzuckerspiegel von 45-50 mg/dl, während die obere Grenze meist bei 150 mg/dl gesetzt wird. Daten aus Tierversuchen legen die Vermutung nahe, dass eine Hyperglykämie ein Risikofaktor für die Entwicklung von Infektionen darstellen kann [36], da sie im Tiermodell die Makrophagen in der Lunge in ihrer Funktion einschränkt. Außerdem konnte in einer Studie an Kindern, die an einer Meningokokkensepsis erkrankten, gezeigt werden, dass hohe Blutzuckerspiegel (BZ) positiv mit der Mortalität und negativ mit der Anzahl beatmungsfreier Tage korrelieren [37]. In der intensivmedizinischen Betreuung erwachsener Patienten wird zurzeit kontrovers diskutiert, ob die Patienten von einer engen Einstellung des Blutzuckers profitieren oder nicht. In der kürzlich publizierten NICE Sugar Studie war die Mortalität in der Gruppe mit der intensivierten Blutzuckereinstellung (BZ zwischen 81 mg/dl und 180 mg/dl) höher als in der Gruppe mit der konventionellen Blutzuckereinstellung (BZ unter 180 mg/dl) [38].

Die Einführung von Lipiden in die parenterale Ernährung bedeutete einen großen Durchbruch [39]. Sie stellen 25-40% der Nicht - Protein Energiequelle der parenteralen Ernährung dar, mit nur einer geringen Osmolarität aber hohen Energiedichte pro Volumeneinheit. Darüber hinaus dienen sie als Quelle für alle essentiellen Fettsäuren [40-42]. Diese werden von Pflanzen durch das Einfügen von Doppelbindungen in Ölsäure hergestellt [43]. Da Menschen die entsprechenden Enzyme für eine De-Novo-Synthese fehlen, sind sie darauf angewiesen, diese mit der Nahrung aufzunehmen [44]. Diese wiederum sind Vorläufer der mehrfach ungesättigten Fettsäuren n3 und n6. Intrauterin erhält der Fetus die Lipide diaplazentar, wo sie eine große Rolle für das Wachstum, die Entwicklung der neuroretinalen Zellmembran und die Eicosanoidproduktion darstellen [45-48]. Für das Neugeborene stellen die Fette neben der

wichtigen Bedeutung als Energielieferant einen wesentlichen Bestandteil von Zellmembranen und als Signalmolekül dar [44]. Um einen Mangel an essentiellen Fettsäuren zu verhindern, sollten bei Frühgeborenen mindestens 0,25 g/kg KG/ d zugeführt werden. Es muss hierbei der unterschiedliche Lipidgehalt an Linolsäure in den verschiedenen Emulsionen berücksichtigt werden [49, 50]. Bis zu 3 g/kgKG/d werden gut toleriert. Vorsicht ist jedoch bei Frühgeborenen geboten, da die Toleranz gegenüber einer parenteralen Fettzufuhr gemindert sein kann [51]. Abhängig von Gewicht, Alter und Gesundheitszustand des Kindes sollte ein Monitoring anhand der Plasmatriglyzeride durchgeführt werden.

1.6 Enteraler Nahrungsaufbau bei Neugeborenen

Das Ziel der Neonatologen ist es, das Wachstum des Frühgeborenen so gut wie möglich entsprechend dem intrauterinen Wachstum zu fördern. Neben einer adäquaten und situationsgerechten parenteralen Ernährung ist es deswegen nötig, die Kinder zusätzlich auch an die enterale Nahrungsaufnahme heranzuführen. Es wird zurzeit kontrovers diskutiert, wann der richtige Zeitpunkt ist und welches die richtige Strategie hierfür darstellt. Einig ist man sich dahingehend, dass die Muttermilch die optimale Nahrung darstellt [52], wobei Frühgeborene vom Zusatz z.B. von Kalzium profitieren.

Ein kontinuierlicher Fluss von Amnionflüssigkeit durch das Intestinum stellt in utero eine physiologische Situation dar. Im letzten Trimenon schluckt der Fetus in etwa 450 ml Flüssigkeit pro Tag, was nach der Geburt nicht mehr der Fall ist [53]. In Versuchen an Ratten konnte gezeigt werden, dass es in Folge einer nur 3 Tage anhaltend fehlenden enteralen Nahrungsaufnahme zu einer Atrophie der Schleimhaut kommt [54]. Auf der anderen Seite weiß man, dass der Gastrointestinaltrakt per se zum Zeitpunkt der Geburt bei den Frühgeborenen noch unreif ist. Gerade im letzten Trimenon verdoppelt sich die Länge des Darms und es vergrößert sich die Oberfläche durch Villus und Mikrovillusbildung erheblich. Die Saug-Schluck-Koordination entwickelt sich in der Regel nicht vor der 34 SSW. Die Motorik und die Entleerung des Magens kann verzögert sein und auch die Motilität des Dünndarms ist noch nicht so gut koordiniert. Das noch unterentwickelte enterische Nervensystem führt zu einer längeren Transitzeit und als Konsequenz zu einer bakteriellen Überbesiedlung. Zudem ist die physikalische und chemische Barriere noch nicht vollständig ausgeprägt [53].

Kinder, die älter als 34 SSW sind, können größtenteils das Saugen, Schlucken und Atmen koordinieren und haben so kein Problem damit, ihre Nahrung in ausreichend großer Menge zu sich zu nehmen [55]. Um jüngeren oder unreiferen Kindern dennoch eine enterale Nahrungsaufnahme zu ermöglichen, gibt es die Option, diese über kontinuierliche Infusionen oder als intermittierende Bolusgabe über eine schmale Sonde über Nase oder Mund zuzuführen [56]. Was Neonatologen trotz dieser Möglichkeiten dennoch davon abhält, frühzeitig mit einem enteralen Nahrungsaufbau zu beginnen bzw. diesen nur langsam steigern zu können, ist die häufige Fütterungsintoleranz der Kinder, die den noch unreifen Entwicklungszustand des Gastrointestinaltrakts widerspiegelt. Darüber hinaus besteht die Angst vor Verletzungen und vor der Entwicklung einer nekrotisierenden Enterokolitis (NEC), die mit einer signifikanten Morbidität und Mortalität einhergeht und bei der das Gestationsalter den zentralen Risikofaktor darstellt [57]. 90% der NEC Fälle kommen bei Frühgeborenen vor, während Reifgeborene nur selten eine NEC bekommen [58, 59]. Risikofaktoren bei Reifgeborenen sind ein kardiales Vitium, eine perinatale Asphyxie und Drogenabusus der Mutter.

Derzeit findet man im klinischen Alltag und in verschiedenen Studien im Wesentlichen vier unterschiedliche Strategien, die für den Nahrungsaufbau angewendet werden. Man findet das (1) „minimal enterale“ Füttern, das frühstmöglich begonnen wird, (2) das Abwarten und zunächst gar kein Zufüttern, (3) den schnellen Nahrungsaufbau und den (4) langsamen Nahrungsaufbau, die hinsichtlich verschiedener Parameter miteinander verglichen werden [57].

Unter dem „minimalen enteralen Füttern“, das im englischen Sprachgebrauch synonym auch als „trophic feeding, gastrointestinal priming oder frühes hypokalorisches Füttern“ bezeichnet wird, versteht man die frühzeitige enterale Gabe kleiner Nahrungsmengen, um das gastrointestinale System zu stimulieren. Man gibt den Kindern hierbei in der Regel 10-20 ml Milch pro kg Körpergewicht pro Tag [52]. Der schnell und aggressive versus langsame Nahrungsaufbau wird in der Regel definiert über die Fütterungsmenge, die zu einem bestimmten Zeitpunkt enteral aufgenommen werden kann und das Kind so als vollständig enteral ernährt angesehen werden kann. In unserer Multizenterstudie wurde eine vollständig enterale Ernährung definiert als eine Menge von 150 ml/kg/d [60].

1.7 Immunologische Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems und deren Unreife beim Neugeborenen

Der Körper kommt jeden Tag mit unzähligen Mikroorganismen in Kontakt, bei deren Abwehr das angeborene und erworbene Immunsystem eine große Rolle spielt. Ebenso wie alle anderen Organsysteme des Feten und Neugeborenen durchläuft auch das Immunsystem eine altersabhängige Reifung [61].

Das angeborene Immunsystem stellt die erste Instanz bei der Abwehr von Mikroorganismen dar und besteht im Wesentlichen aus drei Komponenten: den Epithelien, den Immunzellen und den von ihnen produzierten Chemokinen [62].

Die Epithelien bilden die inneren und äußeren Oberflächen unseres Körpers, die direkten Kontakt zu den Pathogenen haben und mit ihren mechanischen, chemischen und physikalischen Eigenschaften die Keime daran hindern, in den Körper einzudringen. Insbesondere im Hinblick auf die neonatale Sepsis bleibt festzuhalten, dass diese Barrieren das Reservoir der KoNS darstellen, die in über 50% der Fälle für eine LOS verantwortlich gemacht werden können [15, 63]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Neugeborene auf die Körperfläche gesehen zehnmal mehr Haarfollikel besitzen als Erwachsene und dass eine Kolonisation mit KoNS möglicherweise mit der Ausbildung des Neugeborenenexanthems assoziiert ist [64]. Auch das iatrogene Schädigen dieser Barriere mittels intravenöser Katheter im Rahmen intensivmedizinischer Prozeduren stellt eine Risikofaktor für die Entwicklung einer Sepsis dar [65]. Wenn ein Bakterium diese Barriere überwindet und beginnt, sich im darunterliegenden Gewebe zu vermehren, wird es in den meisten Fällen von den Gewebsmakrophagen erkannt und phagozytiert, was unter anderem zu einer kaskadenartigen Produktion der Zytokine führt, die in dieser Studie näher untersucht wurden: IL6, IL8 und TNF α [62]. Die zweite große Zellgruppe, die in der angeborenen Immunantwort eine große Rolle spielt, sind die neutrophilen Granulozyten, die aus der Blutzirkulation an den Ort des Geschehens wandern, wo sie jedoch nur kurze Zeit überleben. Insbesondere im Zusammenhang mit der parenteralen Applikation von Lipiden in Neugeborenen konnte gezeigt werden, dass diese einen inhibierenden Einfluss auf die Zellfunktion von Monozyten und Neutrophilen haben [39, 44, 66]. Konnte auch auf dieser Stufe der Immunantwort die Invasion des Bakteriums noch nicht effektiv verhindert werden, wird eine systemische Entzündungsreaktion (SIRS) initiiert, die zum einen weiter

Effektorzellen und -moleküle an den Ort des Geschehens locken soll, zum anderen eine physikalische Barriere in Form von mikrovaskulärer Koagulation herstellen soll, um eine Ausbreitung der Infektion zu verhindern und schließlich die Reparatur des geschädigten Gewebes einleiten soll [62, 67]. Die neonatale Anfälligkeit gegenüber Infektionen wurde lange Zeit als allgemeine Unreife des neonatalen Immunsystems, eine derartige Entzündungsreaktion zu initiieren, beschrieben [68]. Man ist davon ausgegangen, dass die Neugeborenen nicht in der Lage sind, adäquat proinflammatorische Zytokine zu bilden [69-71], was aber in neueren Studien widerlegt werden konnte. Diese zeigen ganz im Gegenteil eine eher überschießende proinflammatorische Immunantwort im Sinne einer SIRS, die einer unreifen antiinflammatorischen Antwort gegenübersteht (CARS = compensatory antiinflammatory response system) [72-74]. In einer früheren Arbeit konnten wir in einem in-vitro-Experiment zeigen, dass die Immunantwort auf *Staphylokokkus epidermidis* vom Gestationsalter abhängig ist. Höhere Zytokinspiegel von IL6 und TNF alpha konnten mit zunehmendem Alter gemessen werden, was jedoch nicht für das antiinflammatorische Zytokin IL10 der Fall war [75]. Dies ist insbesondere wichtig, da erhöhte proinflammatorische Zytokinspiegel mit Organdysfunktion und Organschäden in Verbindung gebracht werden [76, 77].

1.8 Die Rolle der untersuchten Zytokine bei der Immunantwort

Aktivierte Makrophagen sezernieren eine ganze Reihe unterschiedlicher Zytokine. Es handelt sich um eine große Familie an Proteinen, die wesentlich an der Leukozytenmigration beteiligt sind. Die hier untersuchten Zytokine stammen zum einen aus der Interleukinfamilie (IL6, TNF α) und zum anderen aus der Chemokinfamilie (IL8).

Neben lokalen Effekten bewirken sie ebenfalls systemische Reaktionen. TNF α induziert die lokale entzündliche Reaktion, in dem es das Gefäßendothel aktiviert und die vaskuläre Permeabilität erhöht, was wiederum zu einem erhöhten Einstrom an IgG und Komplement sowie Entzündungszellen ins Gewebe führt und die Drainagerate über die Lymphknoten erhöht. Außerdem führt die Aktivierung der Endothelzellen dazu, dass es zur Bildung von kleinen Blutgerinnseln kommt, die den Mikroorganismus daran hindern sollen, sich weiter auszubreiten. Zudem wirkt es systemisch und induziert Fieber und ist in die Mobilisation von Metaboliten und in die Genese des septischen Schocks involviert [78, 79]. IL6 aktiviert Lymphozyten und erhöht somit die Antikörperproduktion. Systemisch ist es ebenfalls an der

Fieberentstehung beteiligt und induziert die Produktion von Akut-Phase-Proteinen [43]. IL8 ist ein chemotaktischer Faktor, der im wesentlichen lokal wirkt und Neutrophile und Monozyten aus der Blutbahn rekrutiert und T-Zellen zu einem Infektionsherd lockt und aktiviert [62, 80].

2 Fragestellung

Mit der wachsenden Anzahl an sehr kleinen Frühgeborenen, die auf Grund moderner Medizin überleben können, fokussiert sich die Neonatologie immer mehr auf die Vermeidung von Langzeitmorbidity dieser Kinder. Die besonderen Bedürfnisse in der vulnerablen Phase der Frühgeburtlichkeit gilt es genau zu untersuchen und Krankheiten wie die Sepsis zu vermeiden, frühzeitig zu erkennen und adäquat zu therapieren, um auch langfristig eine normale Entwicklung dieser Kinder zu ermöglichen. Wichtige Einflussfaktoren stellen die parenterale und enterale Ernährung dar, die zurzeit Gegenstand vieler Untersuchungen sind.

Im ersten Teil der vorliegenden Dissertation soll experimentell anhand eines in-vitro-Sepsismodells der Einfluss parenteraler Ernährungsbestandteile genauer untersucht werden. Im zweiten Teil sollen multizentrische Daten zum enteralen Nahrungsaufbau und deren Konsequenzen für das Risiko einer Sepsis bei VLBW-Frühgeborenen erhoben und diskutiert werden. Es sollten folgende Hypothesen überprüft werden:

Hypothese 1:

Die beiden integralen Bestandteile der parenteralen Ernährung, Glukose und Lipide, haben einen nachweisbaren immunmodulatorischen Effekt in einem in-vitro-Staph. epidermidis-Sepsismodell .

Hypothesen 2:

Die neonatale Immunantwort in vitro unter Lipideinfluss ist von dem bakteriellen Phänotyp abhängig.

Hypothese 3:

Die Geschwindigkeit des enteralen Nahrungsaufbaus hat Einfluss auf die Häufigkeit der Sepsis bei VLBW-Frühgeborenen.

3 Material und Methoden

3.1 Reagenzien

<i>Reagenz</i>	<i>Zusätze</i>	<i>Firma</i>
PBS Puffer 1, pH 7,2		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
HEPES Puffer		Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Lithium-Heparinröhrchen		Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Monensin		Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd		Riedel de Haen, Seelze, Deutschland
RPMI 1640		PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
10000 µg/ml Penicillin/ Streptomycin 200mM L-Alanyl-L- Glutamin 100mM Natrium-Pyruvat Nicht-essentielle Aminosäuren (NEA)		Biochrome AG, Berlin, Deutschland
Saponin		Riedel de Haen, Seelze, Deutschland
Magermilchpulver		Certus Handels GmbH, Norderstedt, Deutschland
Lipopolysaccharid von E.coli 0127: B8		Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

3.2 Monoklonale Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Klon</i>	<i>Firma</i>
CD 14 PC5	RMO52; Phycoerythrin (PC5)-konjugiert	Beckman Coulter Company, Marseille Frankreich
IL6-FITC	MQ2-13A5; Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugiert	
IL8-PE	G265-8; Phycoerythrin (PE)-konjugiert	
TNF α -FITC	MAb11; Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugiert	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
IL6 unkonjugiert	MQ2-13A5	
IL8 unkonjugiert	G265-8	
TNF α unkonjugiert	MAb11	

3.3 Stimulanzen für die Zellkultur

Staphylokokkus epidermidis

Der ATCC Stamm 12228 wurde benutzt, um die Zellkulturen mit 1 CFU/ 1 WBC zu stimulieren und mit zwei anderen klinisch gewonnenen Stämmen (M1, M2) in Hinsicht auf die Zytokinantwort verglichen. Diese wurden uns freundlicherweise von Dr. Maria Björkqvist und Professor Jens Schollin (Department of Pediatrics, Universität von Orebro, Schweden) zur Verfügung gestellt.

M1

94B080 ; Genotyp A nach der von Björqvist et.al 2002 etablierten Klassifizierung [81].

IcaABD positiv (Biofilmproduktion); MecA positiv (methicillinresistent); ein Isolat eines Frühgeborenen mit klinischer Sepsis, Gestationsalter 26 +0 SSW, Geburtsgewicht 990g

M2

94B575 ; Genotyp „Single isolate“ nach der von Börqvist et. al 2002 etablierten Klassifizierung [81].

IcaABD negativ; MecA negativ; ein Isolat eines Frühgeborenen mit klinischer Sepsis, Gestationsalter 31+0 SSW, Geburtsgewicht 1195g.

Clinoleic® 20%

Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland

Glukoselösung 50%

Delta Select, Dreieich, Deutschland

3.4 Geräte

24er Multiwell Platten (greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)

15 ml Falcons (greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)

Pipetten (Eppendorf Reference)

Brutschrank (Heraeus Instruments, Hanau)

Zentrifuge Rotanta 46 RSC (Hettich Zentrifuge, Tuttlingen)

Analysenwaage AE 240, Zweibereichswaage (Mettler GmbH, Giessen)

Beckman Coulter AcT8 (Beckman Coulter, Fullerton, USA)

BD FACS Canto (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)

3.5 Computerprogramme

BD FACS Diva™ 5.0.3 Software

SPSS® Version 16/17.0

Sigma Plot® 2001

3.6 Untersuchungsmaterial

Für die Untersuchungen wurde Nabelschnurblut verwendet, das von Reif- und Frühgeborenen stammt, die in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe (Direktor: Prof. Dr. med. K. Diedrich) der Universität zu Lübeck geboren wurden.

Nach Aufklärung und eingeholtem Einverständnis der Eltern erfolgte direkt nach der Geburt die Entnahme von Nabelschnurblut. Alle Blutproben wurden in Lithium-Heparin-Röhrchen gesammelt und nicht länger als 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert, bevor sie weiterverarbeitet wurden.

Als Kontrolle dienten Blutproben, die von freiwilligen Spendern, mittels peripherer Venenpunktion im Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität zu Lübeck gewonnen und uns zur Verfügung gestellt wurden.

3.7 In-vitro-Sepsis-Modell/ Zellkultur

Das im Labor etablierte in-vitro-Sepsis-Modell [82] bildet die Grundlage für die Untersuchung.

Ausgangsmaterial ist eine ex-vivo-Vollblutprobe, die direkt nach der Geburt aus der Nabelschnur der Neugeborenen gewonnen wurde, bevor jegliche Behandlung eingeleitet wurde.

Um eine standardisierte Menge von Leukozyten/ well in den unterschiedlichen Ansätzen gewährleisten zu können, wurde zunächst eine Zellzahlbestimmung durchgeführt. Die weiteren Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Das Blut wurde mittels Nährmedium in 24- Multiwell Platten auf einheitliche Leukozytenzahlen von 5×10^6 / ml Blut verdünnt. Als Nährmedium verwendeten wir RPMI (Roswell Park Memorial Institut Medium), das zur Kultivierung zusätzlich mit 200mM L-Alanyl-L-Glutamin, 100mM Natrium-Pyruvat und nicht-essentielle Aminosäuren (NEA) angereichert wurde. Ausgehend von dieser Vorbereitung wurden die Proben nun unterschiedlich vorinkubiert und stimuliert.

3.7.1 Lipide: verschiedene Konzentrationen

Die verschiedenen Proben wurden ohne oder mit Lipidlösung in steigender Konzentration (0,01% (1,5µl auf 1,5ml Vollblutansatz); 0,1% (15µl); 1% (150µl)) zwei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ Konzentration vorinkubiert. Wir verwendeten Clinoleic ® 20%, das im Verhältnis 1:2 verdünnt wurde. Die vorinkubierten Proben wurden im Anschluss mit lebenden Staph. epidermidis Stämmen versetzt, um die Zytokinproduktion (IL6, IL8, TNF α) in den Monozyten zu stimulieren und für weitere vier Stunden inkubiert. Zusätzlich wurde den Proben Monensin hinzugesetzt, das zu einer Blockierung intrazellulärer Transportprozesse und somit zu einer Akkumulation der Proteine im Golgiapparat führt [83], was für die spätere durchflusszytometrische Messung wichtig ist.

3.7.2 Lipide: verschiedene Bakterienstämme

Im zweiten Versuchsansatz wurden neben dem ATCC Staph. epidermidis Stamm auch noch die Stämme M1 und M2 zur Stimulation der Zytokinproduktion verwendet. Es wurde neben einer unstimulierten Probe, eine ohne zusätzliche Lipidzugaben und eine mit 1%iger Lipidvorinkubation angesetzt.

3.7.3 Glukose: verschiedene Konzentrationen

Für den entsprechenden Versuchsansatz mit Glukoselösung wurden die Proben eine Stunde ohne oder mit 50% iger Glukoselösung in aufsteigender Konzentration (3µl, 100mg/dl; 10µl, 300mg/dl; 30µl, 1000mg/dl) vorinkubiert. Anschließend erfolgte auch hier eine Stimulation mit Staph. epidermidis (ATCC-Stamm).

3.7.4 Protokoll

Ausgehend von dem folgenden Standardprotokoll wurden die oben erläuterten Modifizierungen vorgenommen. Die Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt:

- Vollblut mit Nährmedium auf 5×10^6 Zellen/ ml Blut verdünnen und mit Medium auf 1,5 ml Ansatz ergänzen
- Vorinkubation siehe Tabellen
- Proben mit 33,3µl Staph. epidermidis ATCC Stamm, M1 oder M2 stimulieren siehe Tabelle 6-8
- Nach einer Minute 50 µl Monensinansatz (990µl Medium + 10µl Monensin) hinzugeben
- Weitere 4 Stunden bei 37°C / 5% CO₂ inkubieren

Tabelle 5: Vorinkubationsschema für die Versuchsansätze 1-3

<i>Zusatz</i>	<i>Konzentrationen</i>	<i>Inkubationszeit</i>
Ansatz 1	<i>1,5 µl/ 1,5 ml (0,01%)</i>	<i>2 h</i>
Clinoleic ® 20% (1:2 vorverdünnt)	<i>15 µl/ 1,5 ml (0,1%)</i> <i>150 µl/ 1,5 ml (1 %)</i>	
Ansatz 2	<i>150 µl/ 1,5 ml (1 %)</i>	<i>2 h</i>
Clinoleic ® 20% (1:2 vorverdünnt)		
Ansatz 3	<i>100 mg/dl</i>	<i>1 h</i>
Glukoselösung 50%	<i>300 mg/dl</i> <i>1000 mg/dl</i>	

Tabelle 6: Untersuchung der Beeinflussung der Zytokinexpression durch Zusatz von Lipidlösung

<i>Ansatz 1</i>						
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
Clinoleic ® (1:2 vorverdünnt)	-	-	<i>1,5µl/1,5ml</i> <i>(0,01%)</i>	<i>15µl/1,5ml</i> <i>(0,1%)</i>	<i>150µl/1,5ml</i> <i>(1%)</i>	<i>1% ohne</i> <i>Vorinkubation</i>
Staph. epi. (ATCC Stamm)	-	+	+	+	+	+

Tabelle 7: Untersuchung des Einflusses verschiedener Staph. epi. Stämme auf die Zytokinexpression

<i>Ansatz 2</i>							
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>
Clinoleic ® (1:2 vorverdünnt)	-	-	1%	-	1%	-	1%
Staph. epi.	-	ATCC	ATCC	M1	M1	M2	M2

Tabelle 8: Untersuchung des Einflusses von Glukoselösung auf die Zytokinexpression

<i>Ansatz 3</i>					
	1	2	3	4	5
Glukose	-	-	100 mg/dl	300 mg/dl	1000 mg/dl
Staph. epi. (ATCC Stamm)	-	+	+	+	+

3.8 Zellfixation

Nach 4 stündiger Inkubation wurden die Zellen mit Hilfe von Paraformaldehyd (PFA) fixiert, was die Zellmorphologie und intrazelluläre Antigenität erhält und es den Zellen ebenfalls unmöglich macht, der folgenden Permeabilisierung mittels Saponin standzuhalten.

3.8.1 Protokoll

- Kulturgefäße mit PBS auffüllen
- Zellkulturen in Plastikröhrchen überführen und mit PBS (Phosphat buffered saline/ Phosphat gepufferte Salzlösung) auffüllen; gut mischen
- Zentrifugieren: 10 min bei 1200 U
- Überstand absaugen
- 1 ml PFA 4% zu jedem Röhrchen geben und mischen
- 10 min bei 4°C inkubieren; zwischendurch einmal mischen
- erneut zentrifugieren: 10 min bei 1200 U
- Überstand absaugen und verwerfen
- Nun die Zellsuspension in 1 ml Magermilch 5% resuspendieren, gut mischen und für 16 Stunden bei 4°C inkubieren, um unspezifische Bindungen zu reduzieren

3.9 Permeabilisierung und Antigenmarkierung mittels spezifischer Antikörper

Um die intrazellulären Antigene nun mit spezifischen Antikörpern zu markieren, werden die Zellen mittels einer Saponinlösung permeabilisiert, das mit dem Cholesterin der Zellwände interagiert.

3.9.1 Monoklonale Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Klon</i>
CD 14 PC5	RMO52; Phycoerythrin (PC5)-konjugiert
IL6-FITC	MQ2-13A5; FITC-konjugiert
IL8-PE	G265-8; PE-konjugiert
TNFα-FITC	MAb11; FITC-konjugiert

PE = Phycoerythrin; FITC = Fluoresceinisothiocyanat

3.9.2 Protokoll

- die Zellen mit der Magermilch für 10 min bei 1200 U zentrifugieren
- Magermilch absaugen und in 1 ml Pufferlösung bestehend aus : 10% Saponinlösung (2ml), HEPES (2ml) und PBS (196ml) resuspendieren und vortexen und für 10 min bei 4°C inkubieren
- Jedes FACS Röhrchen mit 10 μ l Oberflächenmarkers CD14 PC5 vorbereiten
- jeweils ein Röhrchen mit 5 μ l unkonjugiertem AK vorbereiten
- 10 μ l des vorverdünnten konjugierten AK (1:20) in die jeweiligen FACS Röhrchen geben
- nun 200 μ l der Zellsuspension in die FACS Röhrchen pipettieren
- gut durchmischen und für 20 min bei 4°C inkubieren
- nun erneut 1 ml der Saponinlösung in alle Röhrchen geben und diese nun 5 min bei 1000 U zentrifugieren
- Überstand absaugen

- Nun in die Röhrchen, die bisher nur unkonjugierte AK enthalten, 10µl der vorverdünnten konjugierten AK hinzugeben, gut mischen; 500µl PBS auf die übrigen Röhrchen
- für 20 min bei 4°C inkubieren
- 1ml Saponinlösung auf die Röhrchen mit den unkonjugierten AK und dann für 5 min bei 1000 U zentrifugieren
- Überstand absaugen und 500µl PBS hinzufügen, Aufbewahrung bis zur durchflusszytometrischen Messung

3.10 Durchflusszytometrie - Messung intrazellulärer Zytokine in Monozyten

Die durchflusszytometrische Messung wurde mit dem BD FACS Canto (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Die verwendete Software war BD FACS Diva™ 5.0.3. Vor jeder Messung fand eine von der Firma empfohlene Kompensation und Kalibrierung statt.

Je Probe wurden 2000 CD14+ Zellen untersucht. Abgestorbene Zellen und Zelldetritus wurden durch die Vorwärts- und Seitwärtsscatter ausgeschlossen. Der Schwellenwert wurde bei <2% positiver Zellen angesetzt. Die unkonjugierten Zellen dienten als Negativkontrolle. Das Messergebnis wurde angegeben in % CD14+ Zellen.

3.11 Studienpopulation der Multizenterstudie - Nahrungsaufbau

Für den Vergleich zweier unterschiedlicher Strategien des enteralen Nahrungsaufbaus wurden im Rahmen einer prospektiven Multizenterstudie in dem Zeitraum von September 2003 bis April 2007 klinische Daten von 1909 VLBW-Frühgeborene ausgewertet. Diese Frühgeborenen wurden auf 13 Neugeborenen-Intensivstationen aus Deutschland (Klinikum Aschaffenburg, Universität Greifswald, Kinderkliniken Hamburg-Altona, Hannover auf der Bult, Kassel, Regensburg, Saarbrücken, Olga Spital Stuttgart, Universitätskinderkliniken Köln, Lübeck, Kiel, Bochum im Rahmen der Studie „Genetic Factors in Neonatology Study Group“) betreut. Einschlusskriterien waren: ein Geburtsgewicht unter 1500 g und ein Gestationsalter von 22+0 bis 36+6 Wochen. Ausschlusskriterien waren: tödliche

Missbildungen, darunter Trisomie 13 und Trisomie 18, sowie Kinder mit den folgenden Malformationen: n=1 kongenitale intestinale Stenose, n=1 Ösophagusatresie, n=1 Analatresie, n=1 Omphalozele. Von 1430 Kindern wurden im Rahmen dieser Studie in Form von Fragebögen Daten gesammelt, darunter Angaben zum enteralen Nahrungsaufbau, pränatale Behandlungen, postnatale Therapien und Outcome. Von den restlichen nicht eingeschlossenen 479 Kindern wurden lediglich Basisdaten verschiedener Erkrankungen darunter Sepsis, nekrotisierende Enterokolitis, Operationen und Tod gesammelt. In den Studienzentren wurde die Qualität der Daten halbjährlich durch erfahrene Neonatologen als Studien-Monitorer evaluiert.

3.11.1 Beurteilung des Outcomes der Patienten

Ein vollständiger enteraler Nahrungsaufbau wurde definiert als ein enterales Nahrungsvolumen von 150 ml/ kg/d. Outcome-Parameter beinhalteten die Inzidenzen der Sepsis, NEC, BPD, IVH, PVL, operationsbedürftiger ROP oder PDA. Eine Sepsis wurde definiert als eine Kombination aus klinischen und laborchemischen Parametern einer Infektion in Verbindung mit einer positiven Blutkultur. Eine antibiotische Behandlung wurde ebenfalls registriert. Eine intraventrikuläre Hämorrhagie (IVH) Grad I wurde definiert als Blutansammlung in der germinalen Matrix, Grad II als Blutansammlung im Ventrikelsystem ohne Erweiterung und Einnahme nicht mehr als 50% des Ventrikelvolumens. Eine Grad III IVH als eine Blutung, die mehr als 50% des Ventrikels einnimmt und mit einer Volumenzunahme assoziiert war und eine Grad IV IVH als eine mit Parenchymbeteiligung und Parenchymzerstörung. Die periventrikuläre Leukomalazie (PVL) wurde diagnostiziert, wenn definitionsgemäß eine oder mehrere echodichte Strukturveränderungen mit eventueller Höhlenbildung einhergingen. Unter einer nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) oder lokalisierte intestinale Perforationen, die zu einer OP führten, wurden ebenfalls registriert. Die bronchopulmonale Dysplasie (BPD) wurde im Rahmen dieser Studie definiert als eine chronische Lungenerkrankung, die eine zusätzliche Sauerstoffgabe oder CPAP Therapie noch bis über 36+0 SSW des korrigierten Gestationsalter benötigte. Ein operationsbedürftiger persistierender Ductus arteriosus Botalli (PDA) wurde definiert als PDA mit notwendiger interventioneller Ligatur und eine operationspflichtige Retinopathia praematurorum (ROP) lag dann vor, wenn die Kinder auf Grund einer höhergradigen ROP eine Laser- oder Kryotherapie erhalten haben.

3.12 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen der Ergebnisse der in-vitro Versuche wurden mittels der SPSS® Versionen 16.0 und 17.0 (München, Deutschland) durchgeführt. Für den Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben angewendet. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

Die Auswertung der in der Multizenterstudie gewonnenen Daten erfolgte mit SPSS® 17.0. Hypothesen wurden mit dem zweiseitigen Test nach Fisher ausgewertet. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

3.13 Ethikvotum

Die Studien wurde von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck (Aktenzeichen 05-119, Genehmigungsschreiben datiert auf den 10. August 2005), sowie den Ethikkommissionen der teilnehmenden Studienzentren positiv begutachtet.

4 Ergebnisse der in-vitro Studien

4.1 Kollektiv der Neu- und Frühgeborenen

<i>Angaben/ Versuche</i>	<i>Lipidversuche</i>	<i>Lipidversuche verschiedene Stämme</i>	<i>Glukoseversuche</i>
Anzahl	13	15	12
SSW (Mittelwert)	37,3	38,7	39
Minimum (SSW)	35,3	35,3	34,4
Maximum (SSW)	41,0	41,1	41,0
Geburtsgewicht (g) (Mittelwert)	2895	3360	3344
Minimum (g)	2400	2400	2820
Maximum (g)	4640	4640	4640

Ausschlusskriterium: Amnioninfektionssyndrom

Dem Kollektiv der Neu- und Frühgeborenen stand ein Kontrollkollektiv von 5 gesunden erwachsenen freiwilligen Spendern gegenüber.

4.2 Zytokinproduktion in Abhängigkeit von verschiedenen Lipidkonzentrationen

Zur Untersuchung der Beeinflussung der Zytokinproduktion durch Lipidemulsionen in Monozyten von Neugeborenen in einem in-vitro-Staph. epidermidis-Sepsismodell wurden die Nabelschnur-Vollblutproben von 13 gesunden Neugeborenen untersucht. Sie hatten ein mittleres Geburtsalter von 37,3 SSW (Minimum: 35,3 SSW; Maximum 41 SSW). Bei keinem der Neugeborenen lag ein Amnioninfektionssyndrom oder eine EOS vor. Das durchschnittliche Geburtsgewicht lag bei 2895g (Minimum: 2400g; Maximum: 4640g). Die Daten sind in einem überlagerten Streudiagramm (Abb.1) dargestellt. Mit dargestellt zu den Einzelwerten ist der Median.

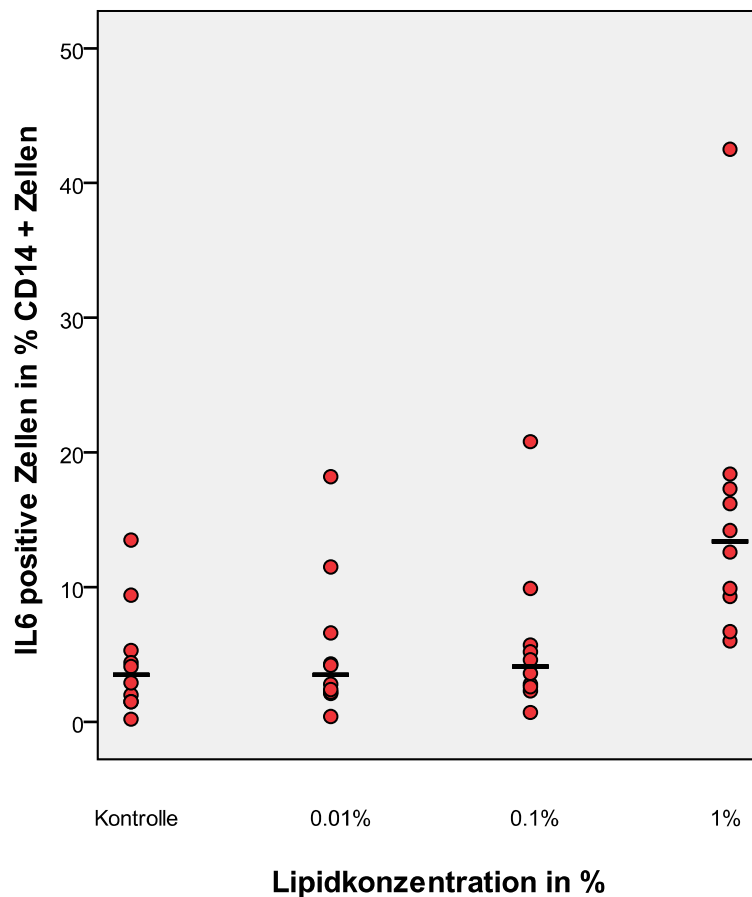


Abbildung 1: IL6 Produktion in Abhängigkeit von der Lipidkonzentration

Die durchflusszytometrische Messung der intrazytoplasmatischen IL6 Produktion in CD14 + Zellen nach Stimulation mit Staph. epidermidis und Zusatz von unterschiedlichen Lipidkonzentrationen zeigt eine signifikant höhere Zytokinproduktion bei hohen Lipidkonzentrationen ($p \leq 0,05$; $n=10$), der waagerechte Strich repräsentiert den Median.

Die IL6 Produktion CD 14 + Zellen (Abb.1) war unter hohen Lipidkonzentrationen deutlich gegenüber geringen Konzentrationen gesteigert (0,1 % versus 1%; $p = 0,005$).

Insgesamt war die IL8-Expression der CD14+ Zellen stärker ausgeprägt als die IL6-Expression. Die Anzahl der IL8 produzierenden Zellen war unter 1%igem Lipidzusatz signifikant höher (0,1% versus 1%; $p= 0,022$, Abb.2).

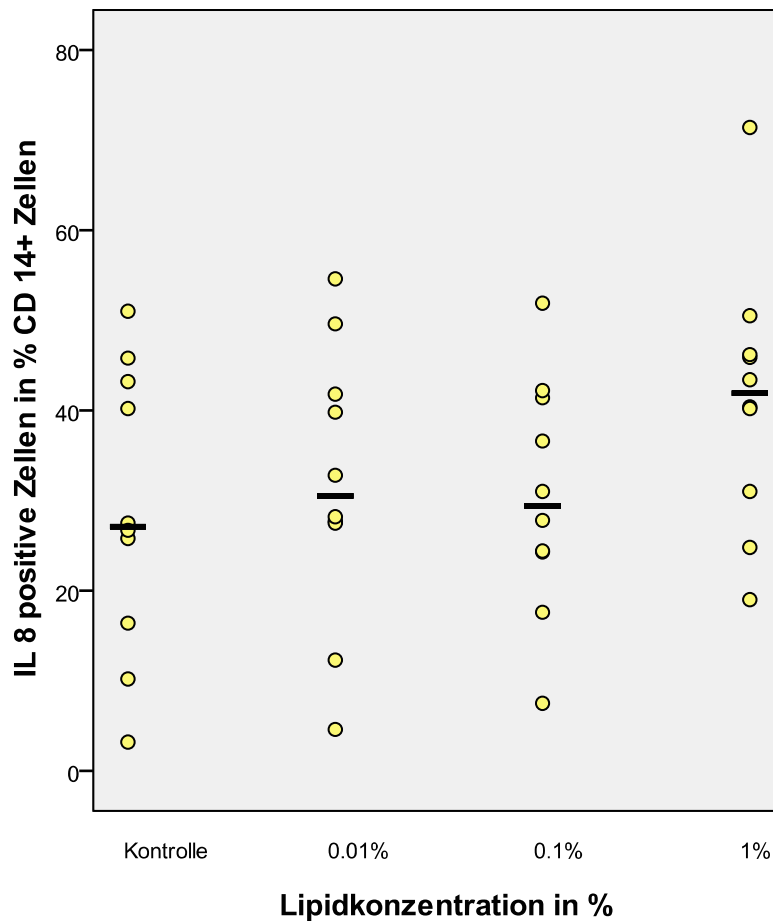


Abbildung 2: IL8 Produktion in Abhängigkeit von der Lipidkonzentration

Die durchflusszytometrische Messung der IL8 Produktion zeigt ein signifikant höheres Zytokinniveau unter Zugabe hochkonzentrierter Lipidemulsion ($n=10$).

Die TNF α (Abb.3) Produktion zeigte bei durchflusszytometrischer Analyse ebenfalls signifikant höhere Werte, wenn Lipide in höheren Konzentrationen zugesetzt wurden (0,1% versus 1%; $p=0,005$, Abb.3).

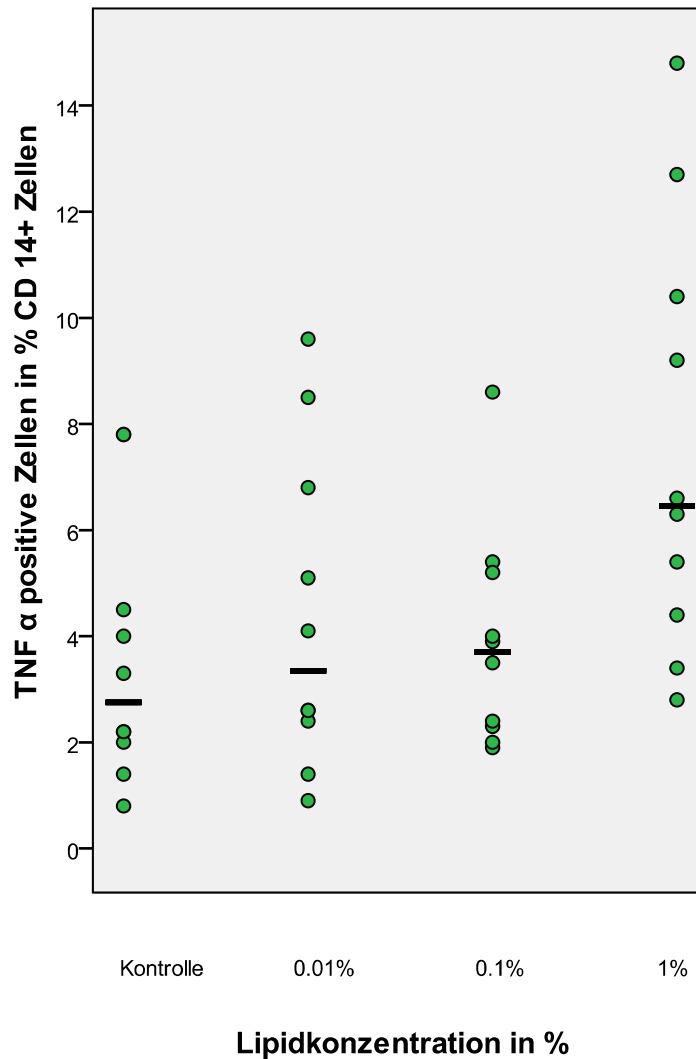


Abbildung 3: TNF α Produktion in Abhängigkeit von der Lipidkonzentration

Die % CD14 + Zellen, die unter Lipidstimulation TNF α bildeten, waren unter 1%iger Lipidlösung signifikant höher (n=10).

4.3 Zytokinproduktion unter der Stimulation durch verschiedene Bakterienstämme

Der Einfluss verschiedener Staph. epidermidis Stämme, die aus Blut von Frühgeborenen isoliert wurden, auf die Zytokinantwort, konnte in einer Vorarbeit bereits gezeigt werden. So wurde eine signifikant niedrigere IL6 Produktion in den Vollblutansätzen nachgewiesen, die mit dem Stamm M1 stimuliert worden sind, der zur Biofilmproduktion fähig ist [75]. Die folgenden Ergebnisse zeigen, dass auch der Zusatz von Lipidemulsionen bei den unterschiedlichen Keimen zu einer differentiellen Zytokinproduktion führt (Abb. 4-6). Die

Nabelschnurblutproben für diese Versuchsansätze stammten von 15 gesunden Neugeborenen. Das mittlere Alter lag bei 38,7 SSW (Minimum: 35,3 SSW; Maximum: 41,1 SSW), das mittlere Geburtsgewicht bei 3360g (Minimum: 2400; Maximum: 4640).

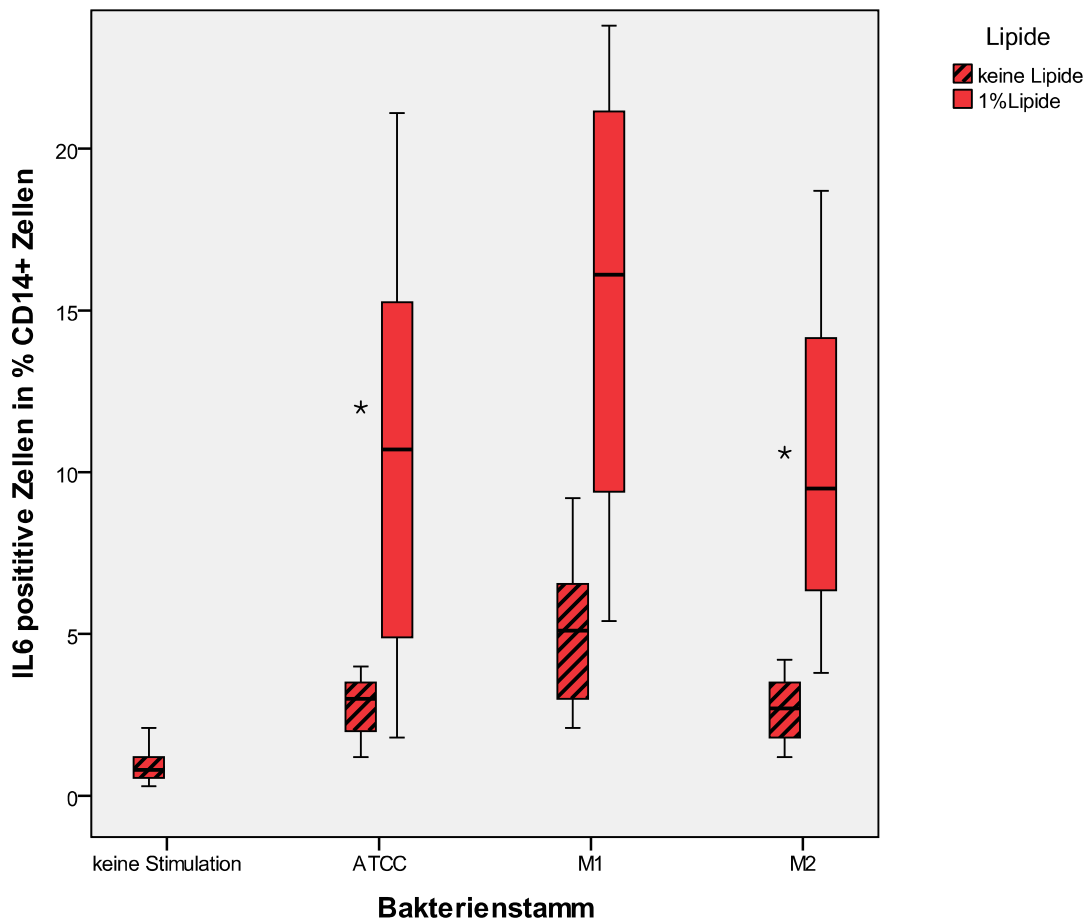


Abbildung 4: IL6 Produktion unter der Stimulation durch verschiedene Bakterienstämme

Unterschied zwischen den verschiedenen Staph. epi.Stämmen dargestellt als Boxplot mit Angaben der 25. 50. und 75. Perzentile. (n=15)

Für alle 3 Stämme gilt, dass die IL6 Produktion (Abb.4) unter Lipidzusatz deutlich höher ist als die Kontrolle. Signifikante Unterschiede ergaben sich unter gleichen Stimulationsbedingungen zwischen dem ATCC Stamm und dem Stamm M1 ($p=0,011$) und zwischen M1 und M2 ($p= 0,009$) ohne Lipidzusatz und zwischen M1 und M2 mit Lipidzusatz ($p= 0,001$).

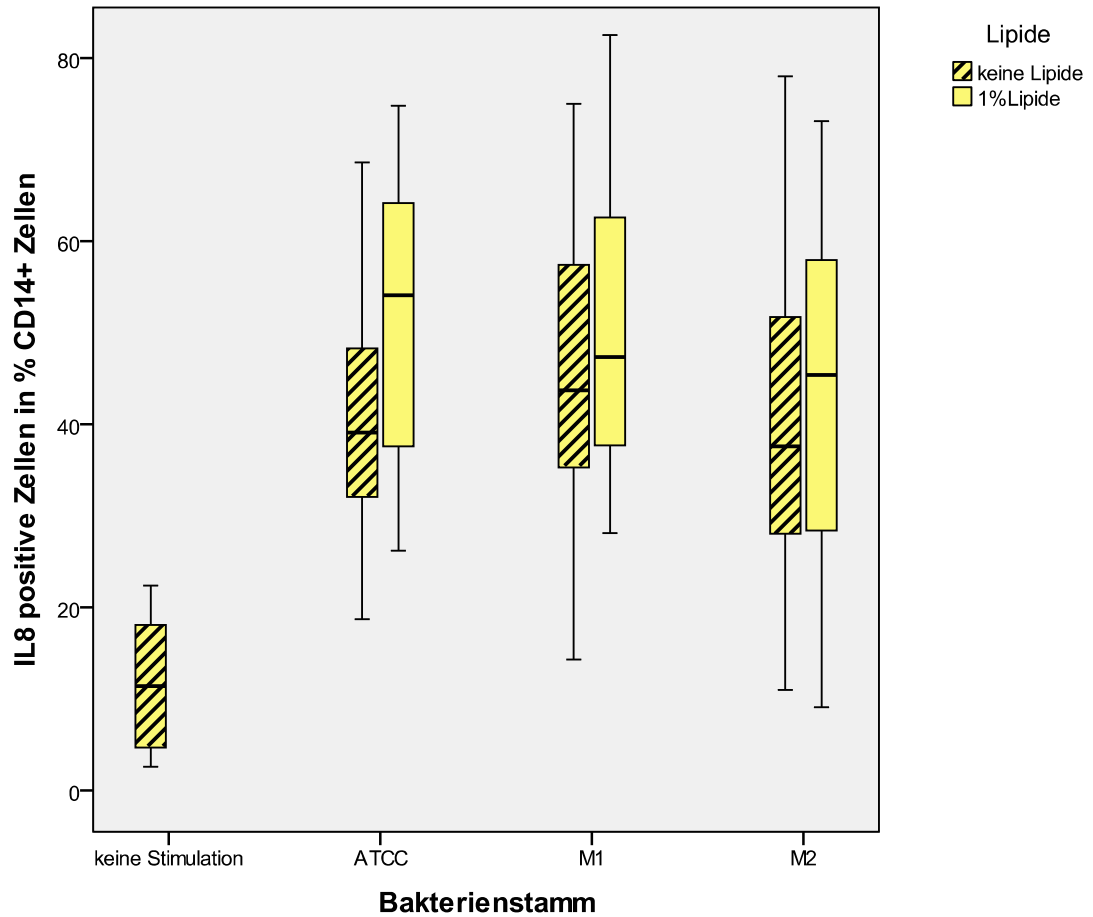


Abbildung 5: IL8 Produktion unter der Stimulation durch verschiedene Bakterienstämme

Darstellung der IL8 Produktion unter Stimulation durch 1%ige Lipidemulsion und verschieden Staph. epi. Stämme zeigt keine signifikanten Unterschiede. (n=15)

Bei der IL8 Messung (Abb.5) mittels Durchflusszytometrie konnte ebenfalls noch einmal gezeigt werden, dass der Lipidzusatz die proinflammatorische Zytokinbildung verstärkt. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Stämmen konnten hier nicht gezeigt werden.

Die Ergebnisse der TNF α Messung (Abb.6) hingegen zeigten ähnlich wie IL6 wieder deutliche Unterschiede in dem Ausmaß der Zytokinexpression. Es bestanden signifikante Unterschiede bei Messungen ohne Lipide zwischen den Stämmen ATCC und M2 ($p = 0,022$) und M1 und M2 ($p= 0,024$). In den Gruppen mit Lipidzusatz bestanden signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen ATCC und M1 ($p= 0,013$) und ATCC und M2 ($p= 0,011$).

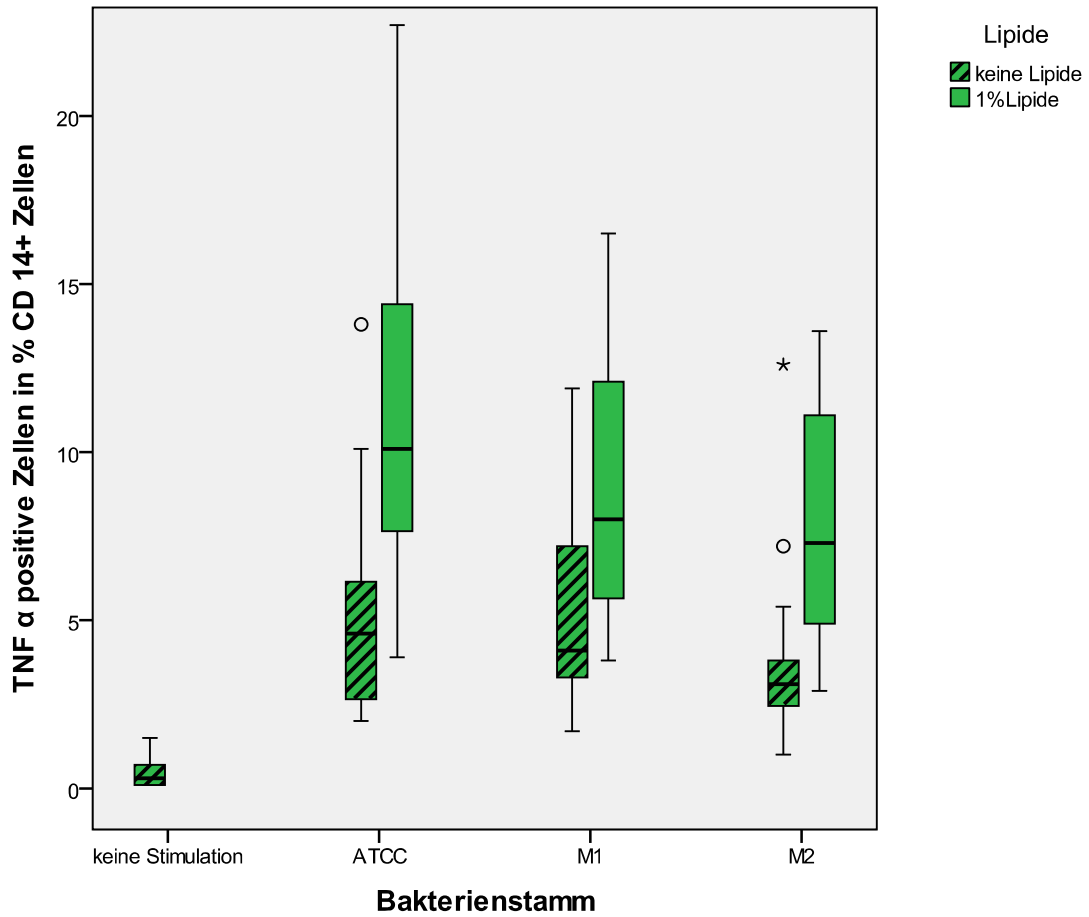


Abbildung 6: TNF α Produktion unter der Stimulation durch verschiedene Bakterienstämme

Deutlicher Unterschied zwischen mit oder ohne Lipidstimulation. Zudem signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen auszumachen. (n= 15)

4.4 Zytokinproduktion in Abhängigkeit von verschiedenen Glukosekonzentrationen

Zur Untersuchung der Beeinflussung von Glukoseemulsionen auf die Zytokinproduktion von Monozyten der Neugeborenen untersuchten wir die Blutproben von 12 Neugeborenen, dessen mittleres Geburtsgewicht bei 3344g (Minimum: 2820g; Maximum: 4640g) bei einem mittleren Gestationsalter von 39 SSW (Minimum: 34,4 SSW; Maximum 41,0 SSW) lag.

Für die IL 6 Produktion (Abb. 6) im in-vitro-Sepsismodell ergab sich lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen dem Versuchsansatz, in dem keine Glukose zugesetzt wurde, zu dem mit einer hohen Glukosekonzentration von 1000mg/dl (p=0,028).

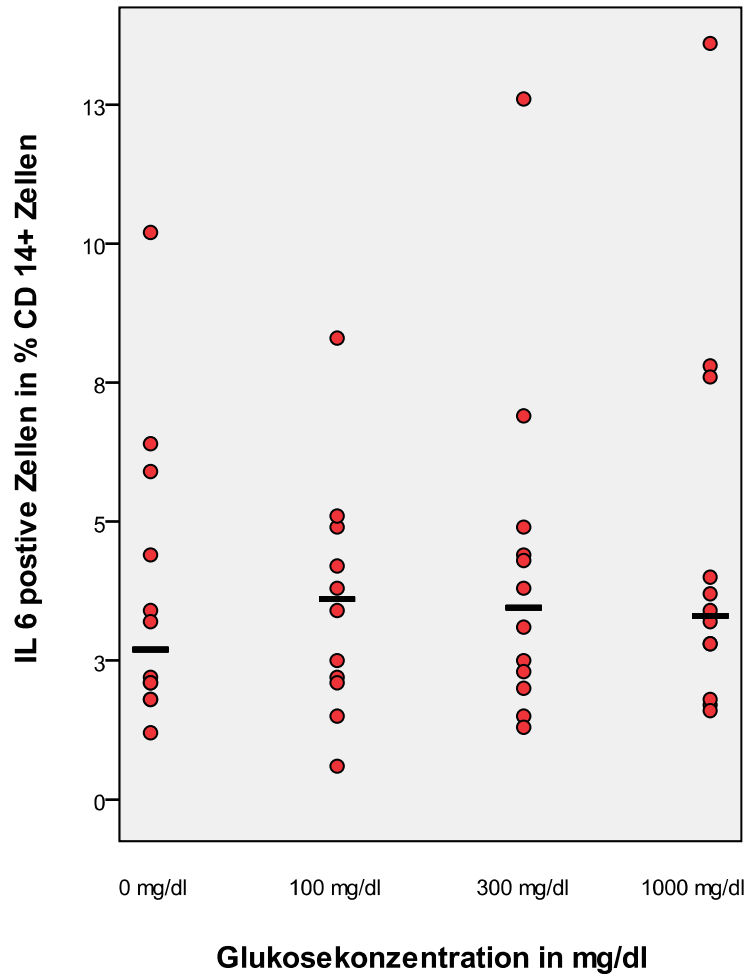


Abbildung 7: IL6 Produktion in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration

Ein signifikanter Unterschied bestand nur für den Ansatz mit einer hohen Glukosekonzentration von 1000 mg/dl im Vergleich zu dem Versuchsansatz ohne zusätzliche Glukosezusatz ($p=0,028$). ($n=12$)

Die Messung der Zytokinproduktion von CD14+ Zellen für IL 8 (Abb.8) zeigte eine deutliche dosisabhängige Steigerung. Signifikante Unterschiede bestanden zu jeder Stufe der Dosiserhöhung (0 vs. 100, $p=0,012$; 100 vs. 300, $p=0,019$; 300 vs. 1000 $p=0,002$).

Für die TNF α (Abb.9) Messung ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Ansätzen ohne Glukosezusatz und denen mit hohem Glukosezusatz (0 vs. 1000, $p=0,005$) aber auch zwischen dem 300 mg/dl und 1000 mg/dl Ansatz ($p=0,034$).

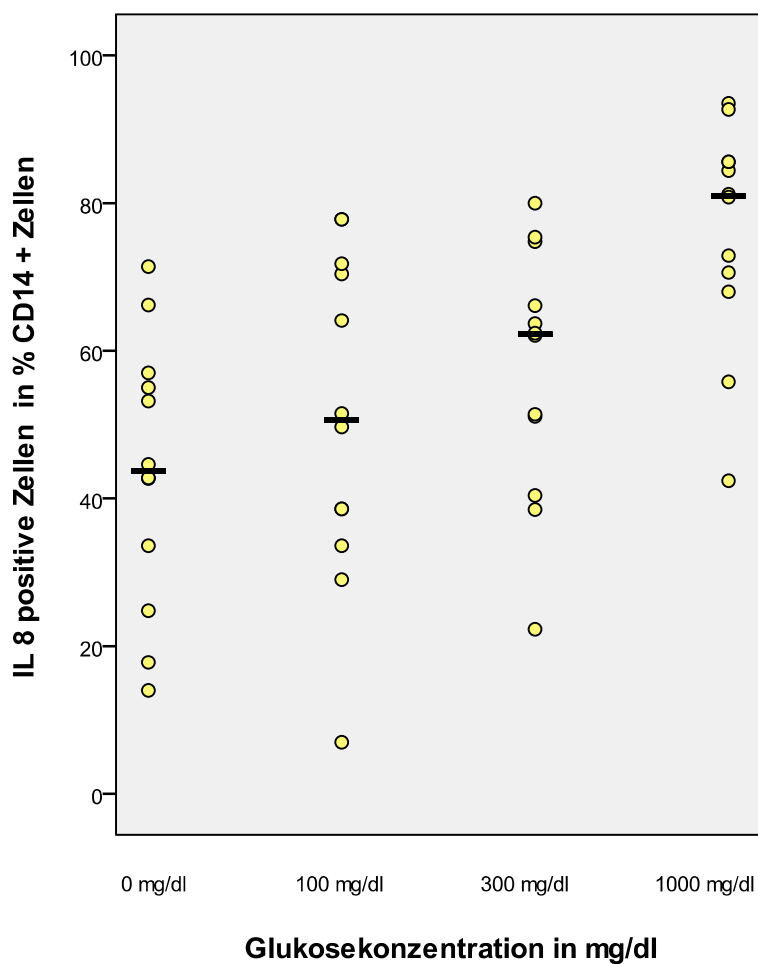


Abbildung 8: IL8 Produktion in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration

Die CD14+ Zellen zeigen bei der durchflusszytometrischen Messung eine dosisabhängige Steigerung der IL8 Produktion. (n=12)

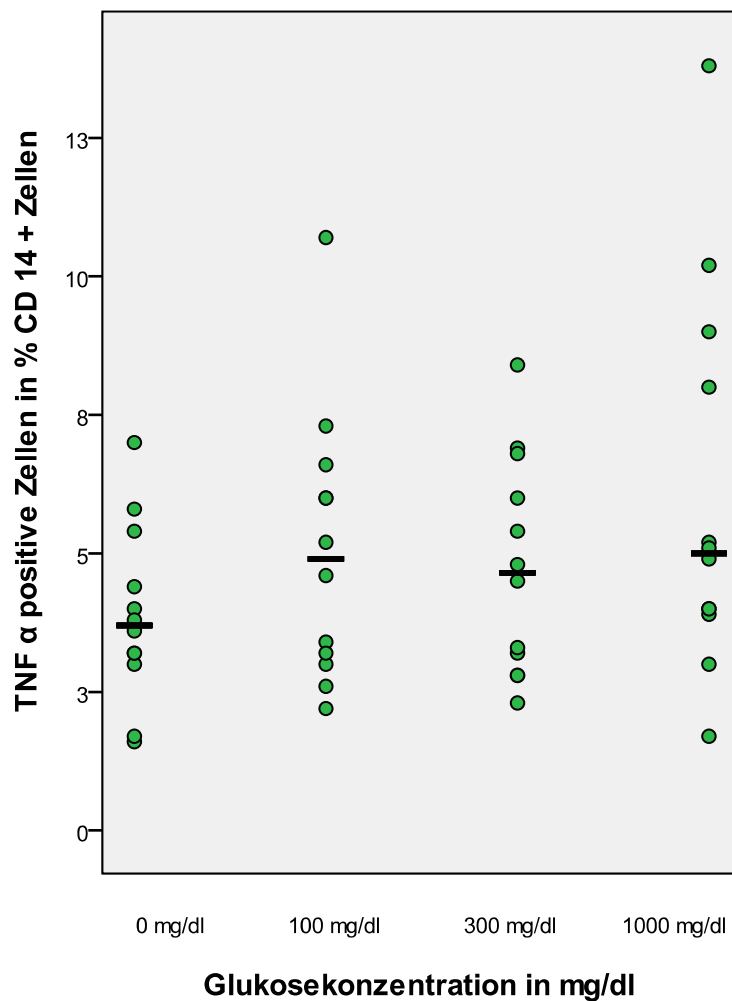


Abbildung 9: TNF α Produktion in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration

Die durchflusszytometrische Messung zeigt einen signifikanten Anstieg des Anteils TNF α produzierender CD 14+ Zellen unter hohen Glukosekonzentrationen. (n=12)

5 Ergebnisse der multizentrischen Studie

5.1 Studienpopulation

<i>Parameter</i>	<i>≤ 12,5 Tage (RA)</i>	<i>> 12,5 Tage (SA)</i>	<i>p -Werte</i>
Anzahl der Kinder	717	713	
Gestationsalter (SSW)	29,1	28,8	0,1
Geburtsgewicht (g)	1097	1074	0,19
Wachstumsretardierung (Gewicht <10. Perzentile)	22,9	19,1	0,08
Geschlecht	m (53,1%) w (46,9%)	m (52,2%) w (47,8%)	0,75
Antenatale Steroide	87,6%	89%	0,41
Antenatale Antibiotika	49,0%	37,7 %	<0,001
Mütterliche Herkunft			
Europa, Deutschland	83,9%	86,7%	
Türkei, mittlerer Osten	10,2%	9,3%	
Asien	1,7%	1,7%	
Afrika	2,7%	1,8%	
Andere Länder	1,5%	0,4%	

Tabelle 9: Studienpopulation bei der Untersuchung des enteralen Nahrungsaufbaus

1909 VLBW-Frühgeborene wurden im Untersuchungszeitraum geboren, 479 Frühgeborene wurden nicht berücksichtigt. Gründe für die Nichtteilnahme waren: Tod innerhalb der ersten 72 h (n=100), kein gegebenes Einverständnis der Eltern (n= 34), keine Aufklärung erfolgt (n= 282), andere (n=29). Bei 34 Kindern wurde die Zeit bis zum vollständigen Nahrungsaufbau nicht dokumentiert. Unter den 1430 verbleibenden Kindern dieser prospektiven Studie betrug die mediane Zeit, die bis zum vollständigen enteralen Nahrungsaufbau benötigt wurde, 12,5 Tage. Die verschiedenen Zentren wurden post-hoc unterteilt in solche, die einen schnellen Nahrungsaufbau verfolgt haben (RA = rapid advancement; ≤ 12,5 Tage, n=6 Zentren) und solche die einen langsamen Nahrungsaufbau anwendeten (SA = slow advancement; > 12,5 Tage, n=7 Zentren). Über die Zeit von 2003 bis 2007 gesehen, gab es in den beiden Gruppen keine signifikanten Veränderungen in der Zeit des Nahrungsaufbaus, auch wenn eine leichte Tendenz hin zu einem kürzeren Zeitraum des Nahrungsaufbaus festzustellen war. Es wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Geburtsalter, Geburtsgewicht oder anderen

demographischen Parametern innerhalb der verschiedenen Zentren festgestellt. In RA Zentren wurden allerdings den Müttern der Frühgeborenen häufiger pränatal Antibiotika gegeben (49% versus 37,7 % ; $p < 0,001$). Zusätzlich zu den signifikant unterschiedlichen Zeiten des Nahrungsaufbaus, erhielten VLBW Kinder in Zentren mit SA signifikant häufiger zentralvenöse Zugänge (48,6% versus 31,1%; $p < 0,001$). Diese erhielten auch häufiger eine antibiotische Behandlung, Katecholamine und Erythrozytenkonzentrate (Tab. 10).

Hinsichtlich des klinischen Outcomes unterschieden sich die Gruppen wie folgt:

Es gab keinen signifikanten Unterschied bei der Inzidenz von BPD, IVH, PDA und NEC bzw. Darmoperationen wegen lokaler Perforationen. Die Inzidenz von Kindern, die eine ROP entwickelten, die eine therapeutische Intervention nach sich zog, war in den Zentren, die definitionsgemäß einen schnellen Nahrungsaufbau verfolgten, höher als in den RA Zentren (3,7 % versus 1,7 %; $p = 0,018$). Die Kinder unterschieden sich auch nicht hinsichtlich ihrer Dauer des Krankenhausaufenthaltens und ihres Entlassungsgewichtes, allerdings war die Gewichtszunahme in den Zentren mit einem schnellen Aufbau der enteralen Ernährung leicht über dem der RA Zentren. Ein langsamer Nahrungsaufbau war allerdings mit signifikant höheren Sepsisraten assoziiert (23,3% versus 16,3 %; $p = 0,001$), worunter der größte Teil auf LOS entfiel (20,4 % versus 14,0%; $p = 0,002$) und sich der Unterschied bei Sepsis mit gram-positiven Bakterien zeigte (16,8% versus 10,6 %, $p = 0,001$). Für gram-negative Sepsisepisoden bestand kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Auch hinsichtlich der EOS gab es keine signifikanten Unterschiede (Tab.11).

5.2 Klinische Charakteristika der Kohorten

<i>Parameter</i>	<i>≤ 12,5 Tage</i>	<i>> 12,5 Tage</i>	<i>p-Werte</i>
Anzahl der Kinder	717	713	
Komplette enterale Ernährung (Mittelwert,d)	10	15	< 0,001
Körpergewicht bei der Entlassung (g)	2555	2594	0,07
Gewichtszunahme/ Tag (Mittelwert, g)	20,2	20,7	0,028
Antibiotika (%)	77,7	92,4	< 0,001
Prophylaktische Gabe von Teicoplanin/ Vancomycin (%)	12,0	12,9	0,63
Sauerstoff – Gabe (Median, d)	5	6	0,035
Erythrozytentransfusionen (Median)	1	2	< 0,001
Katecholamintherapie (%)	16,5	24,7	< 0,001
Zentralvenöse Zugänge (%)	31,1	48,6	< 0,001
Polyurethrankatheter (%)	11,6	28,9	< 0,001
Siliconkatheter (%)	12,2	13,4	0,52
Nabelvenenkatheter (%)	15,7	22,4	0,001
Arterieller Katheter (%)	22,3	24,2	0,41
Krankenhausaufenthaltsdauer (Mittelwert, d)	71,5	73,1	0,18

Tabelle 10: Klinische Charakteristika der VLBW Kohorte

Mann-Whitney U Test für: Gewicht bei Entlassung, Gewichtszunahme/ Tag, Dauer des Krankenhausaufenthaltes, Anzahl der Transfusionen; Chi-Quadrat Test für: vollständiger enteraler Nahrungsaufbau, Antibiotika-, Analgetika-, Katcholaminbedarf, zentralvenöser Zugang, arterieller Zugang, Prophylaktische Teicoplanin/ Vancomycingabe; das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt

5.3 Klinisches Outcome unter den verschiedenen Nahrungsaufbaustrategien

<i>Parameter</i>	<i>≤12,5 Tage</i>	<i>> 12,5 Tage</i>	<i>p-Werte</i>
Anzahl der Kinder	717	713	
Mechanische Beatmung (%)	43	48,5	0,038
BPD (%)	13,6	13,7	1,0
Sepsis (%)	16,3	23,3	0,001
EOS	3,4	4,6	0,28
LOS	14,0	20,4	0,002
KoNS Sepsis	6,1	12,3	< 0,001
Gram-positive Sepsis	10,6	16,8	0,001
Gram-negative Sepsis	5,3	5,3	1,0
> 1 Sepsisepisode (%)	4,1	7,2	0,011
ICH/ IVH (%)	17,6	19,1	0,49
OP NEC/ intestinale Perforation (%)	4,6	3,9	0,60
ROP Laser/ Kryotherapie (%)	2,2	4,6	0,013
PDA Ligation	7,0	4,6	0,07
Tod	3,9	2,0	0,041

Tabelle 11: Klinisches Outcome der Kinder eingeteilt nach Ernährungsstrategie

Chi-Quadrat-Test wurde angewendet, um die beiden Gruppen hinsichtlich aller Parameter miteinander zu vergleichen. Das Signifikanzniveau wurde festgelegt mit $p < 0,05$. Abkürzungen: BPD: bronchopulmonale Dysplasie, KoNS: Koagulase negative Staphylokokken, ICH/ IVH: intrazerebrale/ intraventrikuläre Hämorrhagie, NEC: nekrotisierende Enterokolitis, ROP: Retinopathia praematurorum, PDA: persistierender Ductus arteriosus Botalli

6 Diskussion

Mit der wachsenden Anzahl an überlebenden Kindern, die als ELBW und VLBW Frühgeborene auf die Welt kommen, ist das Langzeit-Outcome, insbesondere die neurologische Entwicklung ein zentraler Aspekt der Versorgungsqualität in der Neonatologie. Es wird versucht, die besonderen Bedürfnisse dieser vulnerablen Phase genauer zu erfassen und Krankheiten wie die Neugeborenenensepsis zu vermeiden, um diesen Kindern auch langfristig gesehen eine normale Entwicklung zu ermöglichen. Die vorliegende Arbeit hat verschiedene Aspekte der Ernährung Neugeborener ins Zentrum der Betrachtung gestellt und diese sowohl immunologisch-experimentell als auch klinisch im Hinblick auf die LOS mit KoNS untersucht. Insbesondere in den ersten Lebenswochen ist die ausgewogene und ausreichende Nahrungszufuhr für das Wachstum und eine adäquate Entwicklung wichtiger als in jeder anderen Lebensphase [23]. In der Regel benötigen alle Frühgeborenen < 35 SSW und alle kranken Reifgeborenen zunächst eine teilparenterale Ernährung [27]. Als wesentliche Bestandteile der parenteralen Ernährung haben wir die beiden Nährstoffe Glukose und Lipide in unseren Studien 4.1 und 4.3 hinsichtlich unserer *Hypothese 1*, dass diese einen Einfluss auf die Zytokinproduktion ausüben, in einem in-vitro-Sepsismodell genauer untersucht. Die Indikation für eine parenterale Lipidzufuhr beruht zum einen auf energetischen zum anderen auf strukturellen Gesichtspunkten. Ein unreif geborenes Kind, das noch keine besonders ausgeprägten Fettspeicher hat, benötigt ständig eine gewisse Zufuhr mehrfach ungesättigter Fettsäuren für die Entwicklung des zentralen Nervensystems [84]. Allerdings ist die Anwendung von parenteraler Ernährung auch mit Komplikationen, insbesondere Infektionen durch KoNS assoziiert [26]. Eine wichtige Quelle dieser Keime stellt die Haut dar, die auf einer Seite noch unreif ist und dessen immunologische Schutzbarriere durch invasive Maßnahmen gefährdet werden kann [85]. Deswegen werden diese Infektionen häufig als katheterassoziiert beschrieben [13, 63]. Darüber hinaus wird jedoch angenommen, dass auch die TPN selbst die Abwehrmechanismen beeinflusst und so eine Infektion begünstigt. Lipide und Glukose sind bekannt dafür, potente Immunmodulatoren zu sein [39, 44, 86, 87]. Die Zytokine, die in dieser Arbeit untersucht wurden (IL6, IL8 und TNF α), werden von Makrophagen zur Antwort auf einen bakteriellen Stimulus gebildet. In dieser Studie zeigten wir zum ersten Mal, dass die durch Staph. epidermidis induzierte pro-inflammatorische Immunantwort unter hohen Lipidkonzentrationen in einem in-vitro Vollblutansatz gesteigert ist. Wir konnten in unserem experimentellen Ansatz nachweisen, dass die kindlichen

Monozyten unter zusätzlicher Stimulation mit 1%iger Lipidlösung signifikant höhere Spiegel der proinflammatorischen Zytokine produzieren. Dies bestätigt frühere Studien, die einen immunmodulatorischen Effekt der Lipide aufzeigen konnten [39, 44, 66, 86, 88, 89]. Darüber hinaus ist die Immunmodulation nicht nur mit der Apoptoseinduktion der Monozyten [39], der Inhibition der Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten und durch eine Blockade der bakteriellen Clearance zu erklären [90], sondern kann im Hinblick auf diese Resultate auch auf der Stufe der einzelnen Immunzelle und ihrer Zytokinproduktion bestätigt werden. Die Bedeutung von Glukose auf die angeborene Immunantwort wurde bisher noch nicht im Detail untersucht, obwohl die Glukosehomöostase ein großes klinisches Problem insbesondere bei Frühgeborenen darstellt [91, 92]. Es ist immer noch unbekannt, ob Hyper- und Hypoglykämien Epiphänomene von Infektionen sind oder zu den Infektionen beitragen. Erwachsene Patienten mit einem Diabetes mellitus z.B. sind infektanfälliger, wenn sie hohe Blutglukosespiegel aufweisen [93, 94]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass hohe Blutglukosespiegel die Immunfunktion beeinträchtigen, indem sie die Zytokinproduktion von Makrophagen beeinflussen, die Lymphozytenproliferation supprimieren und die intrazelluläre bakterizide Aktivität von Lymphozyten in Erwachsenen vermindern [87, 95-97]. Hayes et al. zeigten, dass hohe Blutglukosewerte das Risiko für einen frühzeitigen Tod und IVH bei ELBW Frühgeborenen erhöhen. In unserem in-vitro Experiment konnte eine erhöhte IL6- und TNF α -Produktion unter Stimulation mit hohen Glukosekonzentrationen festgestellt werden. Bei der IL8-Produktion zeigte sich eine dosisabhängige kontinuierliche Steigerung. Hierbei handelt es sich um ein Zytokin, das insbesondere in die Chemotaxis und die Rekrutierung von Monozyten und T-Lymphozyten involviert ist.

In vorausgehenden Studien konnten wir zeigen, dass die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine nach Staph. epidermidis Stimulation Gestationsalter abhängig ist, während die anti-inflammatorischen Zytokine auf einem individuellen Niveau reguliert zu werden scheinen [75]. Diese Daten implizierten bereits, dass dieses Ungleichgewicht ein Schlüsselement in der Anfälligkeit für Infektionen sein könnte. Die in vitro durch Lipide und Glukose nachgewiesene Steigerung der pro-inflammatorischen Zytokinantwort würde dieses Ungleichgewicht zusätzlich verstärken. Im Hinblick auf die steigende Anzahl nosokomialer Infektionen und der assoziierten Morbidität wie z.B. die BPD muss in nachfolgenden Studien überprüft werden, ob diese Steigerung auch in vivo zu finden ist. Hierzu müsste man bei Kindern, die an einer Sepsis erkranken, parallel Glukose- und Lipidspiegel im Blut

bestimmen, sowie die Zytokin-Expression messen und dies mit klinischen Verläufen korrelieren.

Für die Stimulation mit Lipiden untersuchten wir in dem experimentellen Ansatz 4.2 darüber hinaus unsere *Hypothese 2*, dass die Immunantwort auch von dem klinisch isolierten Bakterienstamm abhängig ist. Für die IL8-Messung konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen festgestellt werden. Bei der TNF α -Produktion zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen je zwei Stämmen. Die Zytokinproduktion kann also merklich darüber hinaus auch durch phänotypische Merkmale der Pathogene beeinflusst werden. Es scheint hier sehr individuell für jedes einzelne Zytokin das Wechselspiel mit den Pathogenen reguliert zu werden. Hierbei spielt die genetische Variabilität der Keime eine große Rolle, die zu einer unterschiedlichen Virulenz, Antibiotikaresistenzen und verschiedenen Fluchtmechanismen der Keime führt. Für *Staph. epidermidis* sei die Biofilmproduktion als die wichtigste Eigenschaft angeführt, die es dem Keim ermöglicht, an organische und anorganische Oberflächen zu adhären, in enger Nachbarschaft Resistenzfaktoren auszutauschen und gegenüber Antibiotika resistent zu sein. Darüber hinaus konnte *in vitro* gezeigt werden, dass KoNS Septitiden, die durch Stämme bedingt waren, die zur Biofilmproduktion in der Lage waren, mit einer geringeren Immunantwort des Wirtes einhergingen und somit eventuell die Möglichkeit des Wirtes, auf die Infektion zu reagieren, einschränkten [16].

Es muss beachtet werden, dass unsere Experimente mehrere Einschränkungen aufweisen. Erstens sind *in-vitro*-Modelle nicht in der Lage, die Vielzahl an Interaktionen zwischen Immunsystem und Metabolismus zu imitieren und zu regulieren. Zweitens wurden die Nabelschnurblutproben von reifen Neugeborenen entnommen. Folgestudien müssen die Immunantwort der ELBW Kinder charakterisieren, die besonders anfällig für diese KoNS Infektionen sind, da es wünschenswert wäre, das klinische Outcome dieser Kinder zu verbessern. Unsere Untersuchungen des Nabelschnurblutes von 7 VLBW Frühgeborenen konnten bereits zeigen, dass die Zytokinexpression gegenüber Reifgeborenen insgesamt zwar geringer ausfällt, der proinflammatorische Effekt der Lipide und der Glukose aber auch hier reproduzierbar ist [98]. Zu den wesentlichen Morbiditäten, die diese Kinder langfristig beeinflussen, gehört die BPD und neurologische Beeinträchtigungen, die eine starke Korrelation zur Sepsis aufweisen [99]. Die Patienten sind oftmals auf eine Sauerstofftherapie und Kortikosteroide, mit ihren Langzeitnebenwirkungen wie Hyperglykämien,

Schleimhautulzerationen und Osteoporose angewiesen. Die Kinder müssen frühzeitig eine Physiotherapie erhalten und sollten hochkalorisch ernährt werden. Außerdem sind die Infektions- und Komplikationsraten bei Infektionen durch RS-Viren erhöht [100].

Zusammenfassend kann man sagen, dass die in-vitro-Daten vermuten lassen, dass die Immunantwort von Substraten der parenteralen Ernährung beeinflusst wird. In Anbetracht der Tatsache, dass proinflammatorische Zytokine eine herausragende Rolle bei der Entstehung vieler neonataler Erkrankungen spielen, scheint es deswegen angebracht, in in-vivo-Situationen diese Effekte zu verifizieren und die parenterale Ernährung gegebenenfalls zu optimieren bzw. in ihrer Dauer zu verkürzen, was einen effizienten enteralen Nahrungsaufbau nötig macht. Daraus leitet sich *Hypothese 3* dieser Arbeit ab. In einer klinischen Multizenterstudie erhoben wir Daten über den enteralen Nahrungsaufbau. Die Hypothese lautete, dass dieser einen Einfluss auf das klinische Outcome der Kinder in Bezug auf Infektionen hat. Es wird zurzeit kontrovers diskutiert, wann der richtige Zeitpunkt des Beginns und welches die optimale Strategie für den enteralen Nahrungsaufbau ist. Im klinischen Alltag findet man daher unterschiedliche Strategien. In unserer Studie wurden die Zentren nach der Datenerhebung in zwei Gruppen nach der Zeit eingeteilt, die sie für einen vollständigen Nahrungsaufbau benötigten. Wir unterschieden einen schnellen (≤ 12.5 Tage) versus einen langsamen (> 12.5 Tage) Nahrungsaufbau (Median der Gesamtgruppe 12.5 Tage). Frühgeborene, die älter als 34 SSW sind, beherrschen in der Regel eine ausreichende Saug-, Schluck- und Atemkoordination, um enteral ernährt zu werden bzw. können die Nahrung per Sonde zugeführt bekommen [56]. Die Gründe dafür, dass Neonatologen dennoch verzögert mit dem enteralen Nahrungsaufbau beginnen, sind die Angst vor Fütterungsintoleranz, Verletzungen des Gastrointestinaltraktes und vor der Entwicklung einer NEC bei VLBW Frühgeborenen [57]. Der post-hoc Vergleich unsere Kohorten ergab, dass VLBW Kinder, die in Zentren mit langsamem Nahrungsaufbau geboren wurden, eine deutlich höhere Sepsisrate hatten, was u.a. durch eine höhere Rate an KoNS Infektionen deutlich wurde. Zudem fiel auf, dass diese Kinder häufiger zentralvenöse Katheter und eine antibiotische Therapie erhielten. Die erhöhte Infektionsrate kann also zum einen mit der Zerstörung der physiologischen Barriere Haut gesehen werden und zum anderen, sollte sich die glukose- und lipidinduzierte Zytokinantwort auch im klinischen Alltag bestätigen lassen, auf die längere parenterale Ernährung mit einer immunologisch unvorteilhaften Imbalance zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen. Eine erhöhte Inzidenz an NEC Fällen

konnten wir in unserer Studie nicht bestätigen. Randomisiert-kontrollierte Studien liegen bis zu diesem Zeitpunkt nicht vor. Diese Ansprüche kann auch diese Studie nicht erfüllen, da es sich um eine Beobachtungsstudie mit einer post-hoc Stratifizierung der VLBW Kinder nach Geburt handelt. Trotz methodischer Einschränkungen belegt die Studie jedoch die zentrumsspezifischen Unterschiede mit ihren Auswirkungen auf das klinische Outcome der Patienten.

Weiterführende Studien sind notwendig, um die *in vitro* gefundenen Phänomene in ihrer *in vivo* Bedeutung besser einschätzen zu können und ihre Relevanz für den klinischen Alltag zu erfassen. Es sollte überprüft werden, inwieweit ein Monitoring von Zytokinen bei Kindern, die eine parenterale Ernährung erhalten, sinnvoll ist. So sollte an größeren Kollektiven z.B. im Rahmen einer Multizenterstudie BZ-Monitoring mit Zytokinmessungen erwogen werden.

Im Hinblick auf die problematische Ernährung bei Neugeborenen mit einer Sepsis scheint es also in der Zusammenschau der Ergebnisse am sinnvollsten, die parenterale Ernährung so kurz wie möglich und so lang wie nötig beizubehalten und früh mit einem enteralen Nahrungsaufbau zu beginnen. Zukünftiges Ziel sollte es sein, die Kinder in dieser vulnerablen Phase nach individuellen Risikoprofilen behandeln zu können und so vor allem die Morbidität weiter zu senken und den Kindern langfristig eine normale Entwicklung zu ermöglichen.

7 Zusammenfassung

Mit der wachsenden Anzahl überlebender Kinder, die als ELBW und VLBW Frühgeborene auf die Welt kommen, ist es zum wichtigsten Ziel geworden Präventionsstrategien zur Vermeidung von Langzeitmorbidität zu etablieren. Hierzu ist es dringend notwendig die Kinder mit einer optimalen Ernährungsstrategie darin zu unterstützen, dass ihr Wachstum in etwa dem *in utero* Wachstum entsprechen kann. Allerdings muss die parenterale Ernährung besonders bei Kindern, die an einer Sepsis erkrankt sind, kritisch betrachtet werden. Ebenso wird über die optimale Strategie des enteralen Nahrungsaufbaus zurzeit noch kontrovers diskutiert.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die beiden essentiellen Bestandteile der parenteralen Ernährung Glukose und Lipide die durch *Staph. epidermidis* induzierte Immunantwort im *in-vitro*-Sepsismodell steigern. Dies bestätigt andere Studien, die Glukose

und Lipide als potente Immunmodulatoren beschrieben haben und zeigt darüber hinaus, dass dieses auch auf der Ebene der einzelnen Immunzellen evident ist. Diese Effekte konnten für alle Zytokine unter hohen Lipid- und Glukosekonzentrationen gezeigt werden. Interessanterweise scheint die IL8 Produktion unter Glukosestimulation sogar dosisabhängig zu sein.

Zum anderen konnten wir zeigen, dass jene Zytokinprofile abhängig davon sind, welcher Staph. epidermidis Stamm in der Blutkultur zur Stimulation verwendet wurde. Dabei kamen drei verschiedene klinische Isolate zum Einsatz, die sich u.a. klar definiert in ihrer Fähigkeit Biofilm zu produzieren, unterschieden. Für die IL6 Produktion konnte eine signifikant höhere Produktion bei dem Biofilm produzierenden Stamm gezeigt werden. Es ist daher nötig, diese Interaktionen zwischen Wirt und Pathogen bei der Erstellung von Risikoprofilen mit zu beachten.

Schließlich wird vermutet, dass auch klinische Risikofaktoren wie z.B. zentrumsspezifische Unterschiede in der Behandlung der Frühgeborenen einen Einfluss auf das Outcome der Kinder haben können. Die Beobachtungen der Multizenterstudie legen nahe, dass in der Dauer des enteralen Nahrungsaufbaus ein wichtiger Einflussfaktor auf die Morbidität von VLBW Frühgeborenen im Hinblick auf die Inzidenz der neonatalen LOS besteht.

Langfristiges Ziel sollte es sein, die Kinder in dieser vulnerablen Phase durch die Erstellung individueller Risikoprofile unter Berücksichtigung sowohl immunologischer als auch klinischer Risikofaktoren zu betreuen, um ihnen so langfristig eine normale Entwicklung zu ermöglichen.

8 Danksagungen

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich bedanke mich bei der Universität zu Lübeck, die mich finanziell mit dem Promotionstipendium „Exellenzmedizin“ unterstützt hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Christoph Härtel, der meinen Horizont nicht nur in Sachen „Forschung in der Pädiatrie“, sondern auch um einen Kontinenten erweitert hat und mir trotz großer beruflicher Belastung immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Damit verbunden ist auch ein Dank an seine Familie.

Ich bedanke mich bei Anja Sewe, Christiane Staabs und Gabriele Walter, die mir geduldig die entsprechenden Labortechniken beigebracht haben und mit denen die Zusammenarbeit großen Spaß gemacht hat.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Rupp und Prof. Dr. Knobloch aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene und Prof. Dr. Diedrich aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe für die Bereitstellung von Keimen und Nabelschnurblutproben.

Ich bedanke mich bei allen teilnehmenden Zentren der multizentrischen Studie, allen Eltern und allen Kindern, die an der Studie teilgenommen haben, und bei Frau Brehm und Frau Roenspiess für die Unterstützung bei der Dateneingabe.

Einer der wohl am meisten mitbekommen hat, wie ich für diese Dissertation gekämpft habe, und der mich immer wieder motiviert hat, ist mein Mann. Ozan, dir ein ganz großes Dankeschön für deine liebevolle Unterstützung und die wertvollen Tipps, die du mir gegeben hast. Ich liebe dich über alles.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern Ralf und Christiane Haase für das gewissenhafte Korrekturlesen und die bedingungslose Unterstützung während meines gesamten Studiums.

Und zu guter Letzt soll der Dank meinen Geschwistern, Großeltern und Freunden gelten, die wertvolle Gesprächspartner waren und für die nötige Abwechslung gesorgt haben, aber stets Verständnis zeigten, wenn Arbeiten für die Dissertation anstanden.

Ohne euch alle hätte ich das hier nie geschafft! Danke!

9 Referenzen

1. Stoll, B.J., et al., *Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network*. Pediatrics, 2002. **110**(2 Pt 1): p. 285-91.
2. Russell, J.A., *Management of sepsis*. N Engl J Med, 2006. **355**(16): p. 1699-713.
3. Faust, K., *Sepsis bei Frühgeborenen mit einem sehr niedrigen Geburtsgewicht*. Chemotherapie Journal, 2011. **Heft 1**: p. 1-8.
4. Stoll BJ, H.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, Laptook AR, Stevenson DK, Papile LA, Poole WK., *Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network*. Pediatrics. 2002 Aug;110(2 Pt 1):285-91. Click here to read, 2002.
5. Fanaroff AA, K.S., Wright LL, Verter J, Poland RL, Bauer CR, Tyson JE, Philips JB 3rd, Edwards W, Lucey JF, Catz CS, Shankaran S, Oh W., *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*. 1998.
6. WHO, *ICD 10*. P07.
7. Pötzsch, O., *Geburten in Deutschland*. Statistisches Bundesamt, 2007 (Dez).
8. Saling, E., M. Schreiber, and T. al-Taie, *A simple, efficient and inexpensive program for preventing prematurity*. J Perinat Med, 2001. **29**(3): p. 199-211.
9. Saling, E., *Basic aspects of prematurity prevention and results achieved by a suitable, simple program*. J Perinat Med, 1998. **26**(6): p. 466-8.
10. Koletzko, *Kinder- und Jugendmedizin*. 13. Auflage.
11. Eichenwald, E.C. and A.R. Stark, *Management and outcomes of very low birth weight*. N Engl J Med, 2008. **358**(16): p. 1700-11.
12. Huang, S.Y., et al., *Coagulase-negative staphylococcal bacteremia in critically ill children: risk factors and antimicrobial susceptibility*. J Microbiol Immunol Infect, 2003. **36**(1): p. 51-5.
13. Jarlov, J.O., *Phenotypic characteristics of coagulase-negative staphylococci: typing and antibiotic susceptibility*. APMIS Suppl, 1999. **91**: p. 1-42.
14. Stoll, B.J. and N. Hansen, *Infections in VLBW infants: studies from the NICHD Neonatal Research Network*. Semin Perinatol, 2003. **27**(4): p. 293-301.
15. Isaacs, D., *A ten year, multicentre study of coagulase negative staphylococcal infections in Australasian neonatal units*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2003. **88**(2): p. F89-93.
16. Klingenberg, C., et al., *Coagulase-negative staphylococcal sepsis in neonates. Association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response*. Pediatr Infect Dis J, 2005. **24**(9): p. 817-22.
17. Rupp, M.E., et al., *Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of Staphylococcus epidermidis in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model*. Infect Immun, 1999. **67**(5): p. 2627-32.
18. Rupp, M.E., et al., *Characterization of Staphylococcus epidermidis polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model*. Infect Immun, 1999. **67**(5): p. 2656-9.

19. Okada, Y., et al., *Bactericidal activity against coagulase-negative staphylococci is impaired in infants receiving long-term parenteral nutrition*. Ann Surg, 2000. **231**(2): p. 276-81.
20. Grant, *Handbook of total parenteral nutrition*. 1980.
21. Wilmore, D.W. and S.J. Dudrick, *Growth and development of an infant receiving all nutrients exclusively by vein*. Jama, 1968. **203**(10): p. 860-4.
22. Chawla, D., et al., *Parenteral nutrition*. Indian J Pediatr, 2008. **75**(4): p. 377-83.
23. Dinerstein, A., et al., *Early and aggressive nutritional strategy (parenteral and enteral) decreases postnatal growth failure in very low birth weight infants*. J Perinatol, 2006. **26**(7): p. 436-42.
24. Flidel-Rimon, O., et al., *Early enteral feeding and nosocomial sepsis in very low birthweight infants*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2004. **89**(4): p. F289-92.
25. Bos, A.P., et al., *Total parenteral nutrition associated cholestasis: a predisposing factor for sepsis in surgical neonates?* Eur J Pediatr, 1990. **149**(5): p. 351-3.
26. Wesley, J.R. and A.G. Coran, *Intravenous nutrition for the pediatric patient*. Semin Pediatr Surg, 1992. **1**(3): p. 212-30.
27. Fusch C., B.K., Böhles H.-J., Jochum F., Koletzko B, Krawinkel M, Krohn K., Mühlenbach S., *Leitlinien Parenterale Ernährung der DGEM*. Aktuel Ernaehr Med, 2007.
28. *AWMF online Leitlinien Parenterale Ernährung Kapitel 13 -Neonatologie/ Pädiatrie-*
29. Koletzko, B., et al., *1. Guidelines on Paediatric Parenteral Nutrition of the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) and the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN), Supported by the European Society of Paediatric Research (ESPR)*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2005. **41 Suppl 2**: p. S1-87.
30. Nutrition Committee, C.P.S., *Nutrient needs and feeding of premature infants*. Nutrition Committee, Canadian Paediatric Society. Cmaj, 1995. **152**(11): p. 1765-85.
31. Cowett, R.M., et al., *Ontogeny of glucose homeostasis in low birth weight infants*. J Pediatr, 1988. **112**(3): p. 462-5.
32. Farrag, H.M., et al., *Persistent glucose production and greater peripheral sensitivity to insulin in the neonate vs. the adult*. Am J Physiol, 1997. **272**(1 Pt 1): p. E86-93.
33. Pildes, R.S. and S.P. Pyati, *Hypoglycemia and hyperglycemia in tiny infants*. Clin Perinatol, 1986. **13**(2): p. 351-75.
34. Dweck, H.S., *Neonatal hypoglycemia and hyperglycemia: two unique perinatal metabolic problems*. Postgrad Med, 1976. **60**(7): p. 118-24.
35. Dweck, H.S. and G. Cassady, *Glucose intolerance in infants of very low birth weight. I. Incidence of hyperglycemia in infants of birth weights 1,100 grams or less*. Pediatrics, 1974. **53**(2): p. 189-95.
36. Kwoun, M.O., et al., *Immunologic effects of acute hyperglycemia in nondiabetic rats*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1997. **21**(2): p. 91-5.
37. Day, K.M., et al., *Hyperglycemia is associated with morbidity in critically ill children with meningococcal sepsis*. Pediatr Crit Care Med, 2008. **9**(6): p. 636-40.
38. Finfer, S., et al., *Intensive versus conventional glucose control in critically ill patients*. N Engl J Med, 2009. **360**(13): p. 1283-97.
39. Sweeney, B., P. Puri, and D.J. Reen, *Induction and modulation of apoptosis in neonatal monocytes by polyunsaturated fatty acids*. J Pediatr Surg, 2007. **42**(4): p. 620-8.

40. Bresson, J.L., et al., *Energy substrate utilization in infants receiving total parenteral nutrition with different glucose to fat ratios*. *Pediatr Res*, 1989. **25**(6): p. 645-8.
41. Pierro, A., et al., *Metabolism of intravenous fat emulsion in the surgical newborn*. *J Pediatr Surg*, 1989. **24**(1): p. 95-101; Discussion 101-2.
42. Salas-Salvado, J., et al., *Effect of the quality of infused energy on substrate utilization in the newborn receiving total parenteral nutrition*. *Pediatr Res*, 1993. **33**(2): p. 112-7.
43. Horn, F., C. Henze, and K. Heidrich, *Interleukin-6 signal transduction and lymphocyte function*. *Immunobiology*, 2000. **202**(2): p. 151-67.
44. Sweeney, B., P. Puri, and D.J. Reen, *Modulation of immune cell function by polyunsaturated fatty acids*. *Pediatr Surg Int*, 2005. **21**(5): p. 335-40.
45. Campbell, F.M., M.J. Gordon, and A.K. Dutta-Roy, *Placental membrane fatty acid-binding protein preferentially binds arachidonic and docosahexaenoic acids*. *Life Sci*, 1998. **63**(4): p. 235-40.
46. Gibson, R.A. and M. Makrides, *The role of long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) in neonatal nutrition*. *Acta Paediatr*, 1998. **87**(10): p. 1017-22.
47. Gibson, R.A. and M. Makrides, *Polyunsaturated fatty acids and infant visual development: a critical appraisal of randomized clinical trials*. *Lipids*, 1999. **34**(2): p. 179-84.
48. Makrides, M., et al., *Are long-chain polyunsaturated fatty acids essential nutrients in infancy?* *Lancet*, 1995. **345**(8963): p. 1463-8.
49. Lee, E.J., K. Simmer, and R.A. Gibson, *Essential fatty acid deficiency in parenterally fed preterm infants*. *J Paediatr Child Health*, 1993. **29**(1): p. 51-5.
50. Cooke, R.J., et al., *Soybean oil emulsion administration during parenteral nutrition in the preterm infant: effect on essential fatty acid, lipid, and glucose metabolism*. *J Pediatr*, 1987. **111**(5): p. 767-73.
51. Brans, Y.W., et al., *Tolerance of fat emulsions in very low birthweight neonates: effect of birthweight on plasma lipid concentrations*. *Am J Perinatol*, 1990. **7**(2): p. 114-7.
52. Ben, X.M., *Nutritional management of newborn infants: practical guidelines*. *World J Gastroenterol*, 2008. **14**(40): p. 6133-9.
53. Neu, J., *Gastrointestinal development and meeting the nutritional needs of premature infants*. *Am J Clin Nutr*, 2007. **85**(2): p. 629S-634S.
54. Dunn, L., et al., *Beneficial effects of early hypocaloric enteral feeding on neonatal gastrointestinal function: preliminary report of a randomized trial*. *J Pediatr*, 1988. **112**(4): p. 622-9.
55. McGuire, W., G. Henderson, and P.W. Fowlie, *Feeding the preterm infant*. *Bmj*, 2004. **329**(7476): p. 1227-30.
56. Hawes, J., P. McEwan, and W. McGuire, *Nasal versus oral route for placing feeding tubes in preterm or low birth weight infants*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2004(3): p. CD003952.
57. Clark, R.H., et al., *Nutrition in the neonatal intensive care unit: how do we reduce the incidence of extrauterine growth restriction?* *J Perinatol*, 2003. **23**(4): p. 337-44.
58. Israel, E.J., *Neonatal necrotizing enterocolitis, a disease of the immature intestinal mucosal barrier*. *Acta Paediatr Suppl*, 1994. **396**: p. 27-32.
59. Kliegman, R.M. and A.A. Fanaroff, *Necrotizing enterocolitis*. *N Engl J Med*, 1984. **310**(17): p. 1093-103.
60. Hartel, C., et al., *Does the enteral feeding advancement affect short-term outcomes in very low birth weight infants?* *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2009. **48**(4): p. 464-70.

61. Levy, O., *Innate immunity of the human newborn: distinct cytokine responses to LPS and other Toll-like receptor agonists*. J Endotoxin Res, 2005. **11**(2): p. 113-6.
62. Janeway, *Immunobiology*. 2005: p. 76.
63. Costa, S.F., M.H. Miceli, and E.J. Anaissie, *Mucosa or skin as source of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia?* Lancet Infect Dis, 2004. **4**(5): p. 278-86.
64. Marchini, G., et al., *Erythema toxicum neonatorum is an innate immune response to commensal microbes penetrated into the skin of the newborn infant*. Pediatr Res, 2005. **58**(3): p. 613-6.
65. Freeman, J., et al., *Association of intravenous lipid emulsion and coagulase-negative staphylococcal bacteremia in neonatal intensive care units*. N Engl J Med, **1990**. **323**(5): p. 301-8.
66. Sweeney, B., P. Puri, and D.J. Reen, *Polyunsaturated fatty acids influence neonatal monocyte survival*. Pediatr Surg Int, 2001. **17**(4): p. 254-8.
67. Gomez, R., et al., *The fetal inflammatory response syndrome*. Am J Obstet Gynecol, 1998. **179**(1): p. 194-202.
68. Angelone, D.F., et al., *Innate immunity of the human newborn is polarized toward a high ratio of IL-6/TNF-alpha production in vitro and in vivo*. Pediatr Res, 2006. **60**(2): p. 205-9.
69. Schibler, K.R., et al., *Defective production of interleukin-6 by monocytes: a possible mechanism underlying several host defense deficiencies of neonates*. Pediatr Res, 1992. **31**(1): p. 18-21.
70. Schibler, K.R., et al., *Diminished transcription of interleukin-8 by monocytes from preterm neonates*. J Leukoc Biol, 1993. **53**(4): p. 399-403.
71. Yachie, A., et al., *Defective production of interleukin-6 in very small premature infants in response to bacterial pathogens*. Infect Immun, 1992. **60**(3): p. 749-53.
72. Schultz, C., et al., *Enhanced interleukin-6 and interleukin-8 synthesis in term and preterm infants*. Pediatr Res, 2002. **51**(3): p. 317-22.
73. Schultz, C., et al., *Reduced IL-10 production and -receptor expression in neonatal T lymphocytes*. Acta Paediatr, 2007. **96**(8): p. 1122-5.
74. Schultz, C., et al., *Immature anti-inflammatory response in neonates*. Clin Exp Immunol, 2004. **135**(1): p. 130-6.
75. Hartel, C., et al., *Characterisation of the host inflammatory response to Staphylococcus epidermidis in neonatal whole blood*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2008. **93**(2): p. F140-5.
76. Yoon, B.H., et al., *High expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in periventricular leukomalacia*. Am J Obstet Gynecol, 1997. **177**(2): p. 406-11.
77. Yoon, B.H., C.W. Park, and T. Chaiworapongsa, *Intrauterine infection and the development of cerebral palsy*. Bjog, 2003. **110 Suppl 20**: p. 124-7.
78. Cairns, C.B., et al., *Bench to bedside: tumor necrosis factor-alpha: from inflammation to resuscitation*. Acad Emerg Med, 2000. **7**(8): p. 930-41.
79. Dellinger, R.P., *Inflammation and coagulation: implications for the septic patient*. Clin Infect Dis, 2003. **36**(10): p. 1259-65.
80. Matsukawa, A., et al., *Chemokines and innate immunity*. Rev Immunogenet, 2000. **2**(3): p. 339-58.
81. Bjorkqvist, M., et al., *Phenotypic and genotypic characterisation of blood isolates of coagulase-negative staphylococci in the newborn*. Apmis, 2002. **110**(4): p. 332-9.

82. Schultz, C., *Intracytoplasmic Detection of Proinflammatory Cytokines and Chemokines in Monocytes by Flow Cytometry*. Methods in Molecular Biology, vol. 215.
83. Tartakoff, A.M., *Perturbation of vesicular traffic with the carboxylic ionophore monensin*. Cell. 1983 Apr;32(4):1026-8, 1983.
84. Bohles, H., [*Indications for lipid infusion in pediatric patients*]. Klin Padiatr, 1989. **201**(3): p. 146-53.
85. Marchini, G., et al., *The newborn infant is protected by an innate antimicrobial barrier: peptide antibiotics are present in the skin and vernix caseosa*. Br J Dermatol, 2002. **147**(6): p. 1127-34.
86. Avila-Figueroa, C., et al., *Intravenous lipid emulsions are the major determinant of coagulase-negative staphylococcal bacteremia in very low birth weight newborns*. Pediatr Infect Dis J, 1998. **17**(1): p. 10-7.
87. Yu, W.K., et al., *Influence of acute hyperglycemia in human sepsis on inflammatory cytokine and counterregulatory hormone concentrations*. World J Gastroenterol, 2003. **9**(8): p. 1824-7.
88. Calder, P.C., *Effects of fatty acids and dietary lipids on cells of the immune system*. Proc Nutr Soc, 1996. **55**(1B): p. 127-50.
89. Calder, P.C., *N-3 polyunsaturated fatty acids and immune cell function*. Adv Enzyme Regul, 1997. **37**: p. 197-237.
90. Fischer, G.W., et al., *Diminished bacterial defences with intralipid*. Lancet, 1980. **2**(8199): p. 819-20.
91. Hays, S.P., E.O. Smith, and A.L. Sunehag, *Hyperglycemia is a risk factor for early death and morbidity in extremely low birth-weight infants*. Pediatrics, 2006. **118**(5): p. 1811-8.
92. Lilien, L.D., et al., *Hyperglycemia in stressed small premature neonates*. J Pediatr, 1979. **94**(3): p. 454-9.
93. Mizock, B.A., *Alterations in fuel metabolism in critical illness: hyperglycaemia*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2001. **15**(4): p. 533-51.
94. Mizock, B.A., *Blood glucose management during critical illness*. Rev Endocr Metab Disord, 2003. **4**(2): p. 187-94.
95. Gregory, R., et al., *The effects of 3-hydroxybutyrate and glucose on human T cell responses to Candida albicans*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1993. **7**(4): p. 315-20.
96. Losser, M.R., et al., *Glucose modulates hemodynamic, metabolic, and inflammatory responses to lipopolysaccharide in rabbits*. J Appl Physiol, 1997. **83**(5): p. 1566-74.
97. Reinhold, D., S. Ansorge, and E.D. Schleicher, *Elevated glucose levels stimulate transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1), suppress interleukin IL-2, IL-6 and IL-10 production and DNA synthesis in peripheral blood mononuclear cells*. Horm Metab Res, 1996. **28**(6): p. 267-70.
98. Haase, B., et al., *The modulatory effect of lipids and glucose on the neonatal immune response induced by Staphylococcus epidermidis*. Inflamm Res.
99. Lahra, M.M., P.J. Beeby, and H.E. Jeffery, *Intrauterine inflammation, neonatal sepsis, and chronic lung disease: a 13-year hospital cohort study*. Pediatrics, 2009. **123**(5): p. 1314-9.
100. 024/014, A.-L.-R.N., *Prävention und Therapie der bronchopulmonalen Dysplasie Frühgeborener*. 2010.

10 Publikationen

Haase B, Faust K, Heidemann M, Scholz T, Demmert M, Tröger B, Herz A, Härtel C.
The modulatory effect of lipids and glucose on the neonatal immune response induced by Staphylococcus epidermidis. Inflamm Res. 2010 Nov 9. [Epub ahead of print]

Härtel C, **Haase B**, Carmo K, Gebauer C, Kattner E, Kribs A, Segerer H, Teig N, von der Wense A, Wieg C, Herting E, Göpel W
Does the enteral feeding advancement affect short-term outcomes in very low birth weight infants? J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2009. **48**(4): p. 464-70.

Härtel C, Osthues I, Rupp J, **Haase B**, Röder K, Göpel W, Herting E, Schultz C
Characterisation of the host inflammatory response to Staphylococcus epidermidis in neonatal whole blood. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2008. **93**(2): p. F140-5.

11 Lebenslauf

Berit Haase

Persönliche Daten

Name: Haase
Vorname: Berit Christin
Geburtstag: 21.01.1985
Geburtsort: Eckernförde
Anschrift: Elsässer Straße 6,
23564 Lübeck
Telefonnummer: 0451/ 8836552
e-Mail: BeritHaase@gmx.de



Medizinischer Bildungsweg

Gymnasium Kronshagen: Abitur im Mai 2004 [Note: 1,6]
Christian Albrechts Universität: Studium der Humanmedizin vorklinischer Abschnitt
1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September 2006 [Note: 2,0]
Universität zu Lübeck: Studium der Humanmedizin klinischer Abschnitt
2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Dezember 2010 [Note: 1,66]
Praktika, Famulaturen im Bereich Pädiatrie:
Kinderonkologie (Uni Kiel), Allgemeinpädiatrie
(Neapean Hospital, Australien), Kinderkardiologie
(Dt. Kinderherzzentrum, Berlin), Allgemeinpädiatrie
(Helios Klinikum Buch, Berlin)
PJ-Abschnitte in pädiatrischen Bereichen:
Kinderchirurgie (CHU Montpellier, Frankreich),
Pädiatrie (Uniklinik, Lübeck)
Besondere Projekte: Organisation der Teddyklinik in Lübeck