

1. Einleitung

Frühgeborene sind aufgrund der Unreife ihres Immunsystems anfällig für schwere Infektionen und haben ein erhöhtes Risiko, eine Sepsis zu entwickeln. Die Weiterentwicklung auf dem Gebiet der neonatalen Intensivmedizin hat zu einer erhöhten Überlebenschance von Frühgeborenen mit sehr niedrigem Geburtsgewicht (englisch: very low birth weight, VLBW – Geburtsgewicht < 1500 g) geführt.¹ Je unreifer ein Neugeborenes ist, desto größer ist die Gefahr nosokomialer Infektionen, d.h. im Krankenhaus erworbener Infektionen. Trotz der Fortschritte in der Medizin zählt eine Sepsis noch immer zu den häufigsten Todesursachen in dieser Patientenpopulation.²

Die Pathogenese einer Sepsis ist multifaktoriell. Zahlreiche Risikofaktoren tragen zur Entstehung und zum Schweregrad der Erkrankung bei. Das unreife Immunsystem Frühgeborener ist noch nicht in der Lage, adäquat auf Infektionen zu reagieren. Die Diagnose einer Sepsis ist zudem selten eindeutig zu stellen. Begleitende Erkrankungen des Neugeborenen und unterschiedliche Manifestationsformen infektiöser Erkrankungen erschweren die Diagnose.³

Während der letzten Jahre zeigten verschiedene Studien, dass relativ häufig vorkommende Polymorphismen in Genen, die bei der angeborenen Immunität eine Rolle spielen, mit einer erhöhten Anfälligkeit für Sepsis einhergehen. Das Serumprotein MBL (Mannose-bindendes Lektin) ist beispielsweise als Aktivator des Komplementsystems bei der frühen Infektabwehr von großer Bedeutung. Es konnten spezifische Punktvarianten im *MBL2* Gen (bei *MBL1* handelt es sich um ein Pseudogen) identifiziert werden, die zu einer veränderten Antwort des angeborenen Immunsystems führen.⁴

In der vorliegenden Arbeit sollen am Beispiel von *MBL2* potentielle genetische Risikofaktoren evaluiert werden, die Einfluss auf die Entstehung einer Sepsis und deren Verlauf bei VLBW Frühgeborenen haben könnten.

1.1 MBL und Sepsis

Das menschliche Immunsystem stellt ein komplexes Netzwerk verschiedener Komponenten dar. Interindividuelle Unterschiede dieser Komponenten sind bei der Entstehung von Krankheiten, vor allem infektiöser Genese, von großer Bedeutung. Genetische Varianten von Genen der angeborenen Immunität können die Suszeptibilität für Infektionen beeinflussen. Zu diesen Genen zählt *MBL2*, das Protein MBL gehört der Gruppe der Lektine an. MBL ist ein in Gewebsflüssigkeit vorkommendes Akute-Phase-Protein und zählt zu den wichtigsten Komponenten der angeborenen humoralen Immunabwehr. Ein MBL Mangel wurde mehrfach in Verbindung mit einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen gebracht, da niedrige MBL Plasmakonzentrationen zu einer verminderten Reaktion der angeborenen Immunität führen.^{5,6}

Verminderte MBL Serumspiegel scheinen vor allem bei geschwächtem Immunsystem von klinischer Bedeutung zu sein. Vor diesem Hintergrund ist die Fragestellung nach der Entwicklung einer Sepsis bei VLBW Frühgeborenen entstanden, da sie durch eine unreife Immunabwehr geprägt sind. Lau et al.⁷ beschrieben 1995, dass MBL bereits in der 25. Schwangerschaftswoche gebildet wird und dass die Plasmakonzentration unabhängig vom Geburtsgewicht ist. Daher kann man bereits bei sehr unreifen Frühgeborenen eine intakte Funktion des Mannose-bindenden Lektins voraussetzen.

In den folgenden Abschnitten wird näher auf die Funktion und Struktur von MBL und genetische Varianten eingegangen. Dabei soll seine klinische Bedeutung und die eines Mangels im Zusammenhang mit der Entwicklung einer Sepsis verdeutlicht werden.

1.1.1 Funktionen von MBL

Das Mannose-bindende Protein ist in der Lage, eine Vielzahl klinisch relevanter Mikroorganismen zu binden und vernichten,^{8,9} entweder durch direkte Opsonophagozytose oder durch die Aktivierung des Komplementsystems über den Lektinweg. Als Komplementaktivator kommt MBL eine besonders große Bedeutung zu, da das Komplementsystem eine Schlüsselfunktion bei der angeborenen Immunität einnimmt.

MBL fungiert außerdem als Akute-Phase-Protein, wird aber unabhängig von den anderen Akute-Phase-Proteinen, wie z.B. dem C-reaktiven Protein (CrP), reguliert.¹⁰ Des Weiteren kann es körpereigene Komponenten, wie beispielsweise apoptotische

Zellen, Immunkomplexe oder Rheumafaktoren binden und deren Entsorgung über das retikuloendotheliale System in Leber und Milz einleiten.⁸ Körper-eigene Bestandteile mit physiologischer Funktion werden dagegen nicht gebunden.⁹

Der genaue Wirkungsmechanismus von MBL ist noch nicht geklärt. Ein Mangel des Proteins könnte die körpereigene Immunantwort auf Mikroorganismen und deren Produkte hin verändern und damit den Schweregrad einer Infektion potentiell verschlechtern.¹¹

1.1.2 Die Struktur von MBL

Das Mannose-bindende Lektin ist ein in der Leber synthetisiertes Glykoprotein der Kolektin Familie, der ebenfalls die Lungen Surfactant Proteine A (SP-A) und D (SP-D) angehören.^{12,13} Sie sind gemeinsam auf Chromosom 10 lokalisiert. Jedes Mitglied besteht aus drei identischen Polypeptidketten mit einer N-terminalen Region, einer „Neck“-Region und einer C-terminalen Lektindomäne. Es gibt zwei *MBL* Gene, wobei *MBL1* nur ein „Pseudogen“ darstellt und *MBL2* ein Proteinprodukt verschlüsselt (siehe Abb. 1). *MBL2* besteht aus vier Exonen.^{9,14}

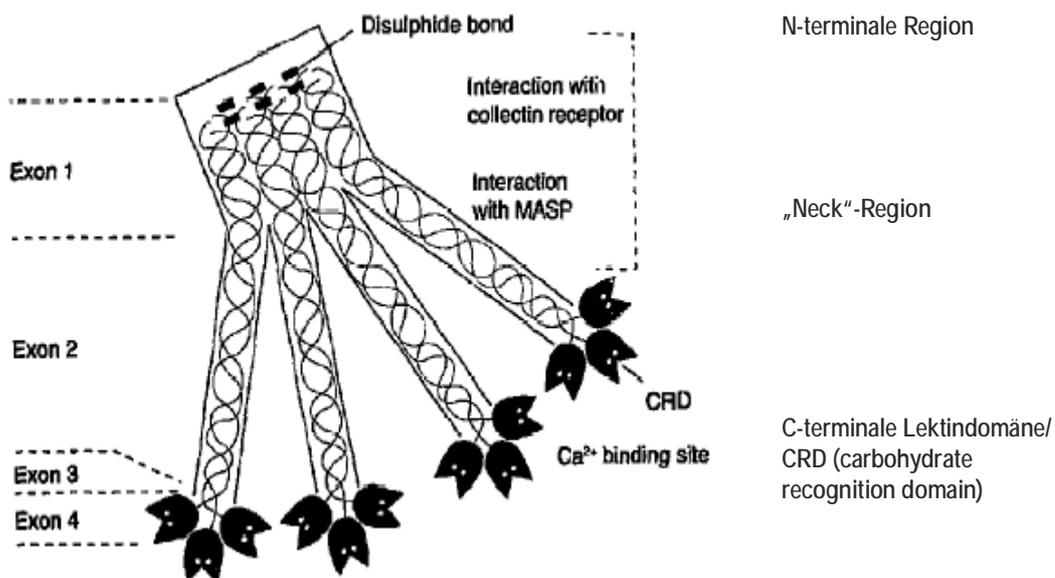


Abb. 1: MBL Proteinstruktur¹⁵

Die Polypeptidkette von MBL setzt sich aus 228 Aminosäuren und einer zusätzlichen, aus 20 Aminosäuren bestehenden, cysteinreichen Region zusammen. An diese schließt sich eine Kollagenregion an, die aus 18-20 sich wiederholenden Triplets besteht. Es folgen die „Neck“-Region und das C-terminale Ende, welches eine kalziumabhängige, kohlenhydratbindende Lektindomäne darstellt. Die „Neck“-Region bildet eine α -Helix Struktur, die wahrscheinlich die Trimerisation der drei Polypeptide fördert, welche eine Untereinheit bilden. MBL Untereinheiten finden sich in größeren oligomeren Strukturen zusammen, die eine tulpenstraußartige Erscheinung haben und Ähnlichkeit mit der C1q Komponente des Komplementsystems aufweisen. Die einzelnen Trimere werden durch hydrophobe Interaktionen und Disulfidbrücken zwischen den Ketten der N-terminalen Region stabilisiert (siehe Abb. 2).^{9,12}

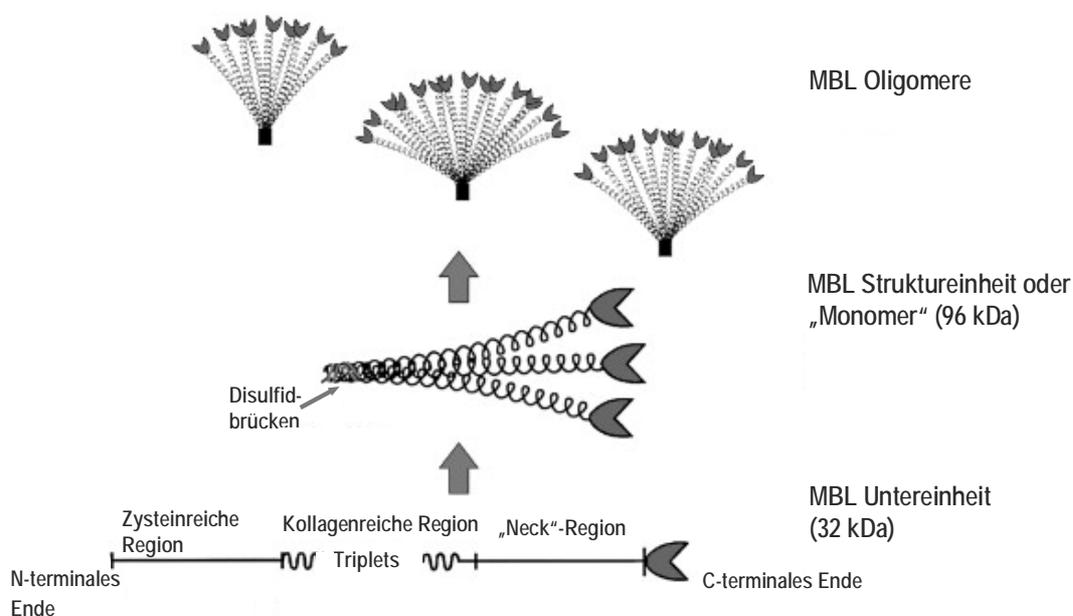


Abb. 2: Untereinheit von MBL mit Struktureinheit¹⁶

Die häufigste oligomere Form beim Menschen enthält sechs Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 96 kDa, die je aus 3 identischen Polypeptidketten von 32 kDa bestehen (Gesamtgewicht 18 x 25 kDa). Verschiedenen Publikationen zufolge tritt natives MBL in Serum oder Plasma in oligomeren Formen unterschiedlicher Größe auf (ein bis sechs Untereinheiten).^{12,17}

1.1.3 MBL Bindungs-Spezifität

MBL benötigt Kalziumionen, um Kohlenhydrat-Liganden zu binden. Es bindet mit hoher Affinität an Mannose und Fukose Reste. Bei den Liganden handelt es sich sowohl um N-glykosidische Oligosaccharide, die mit Mannose oder N-Acetyl-D-Glukosamin Aminosäuren enden, als auch um fukosylierte Sequenzen, die sich auf der Oberfläche verschiedener Erregergruppen befinden. Dazu zählen Mikroorganismen wie HIV-1,¹⁸ Influenza A Virus,¹⁹ *Staphylokokkus aureus*,²⁰ *Neisseria meningitidis*,²¹ und *Candida albicans*.²⁰

1.1.4 MBL2 Gen und Varianten

MBL Serumspiegel sind wahrscheinlich genetisch festgelegt und um ein 1000-faches variabel.²² Beim gesunden Menschen reichen sie von 0 bis > 5000 ng/ml.^{12,22,23} Die starken interindividuellen Unterschiede werden maßgeblich durch drei funktionelle Varianten im Exon1 des *MBL2* Gens beeinflusst.⁹ Diese beruhen auf dem Austausch einzelner Basen im Exon 1 des *MBL2* Gens. Im Kodon 54 kommt es zu einem Austausch von Glycin zu Asparginsäure (B Allel), im Kodon 57 von Glycin zu Glutaminsäure (C Allel) und im Kodon 52 von Arginin zu Cystein (D Allel).^{12,17} Das normale *MBL2* Allel wird mit A bezeichnet. In der Literatur werden alle Exon 1 Varianten als Allel 0 zusammengefasst.¹⁷

Die Exon 1 Varianten sind weltweit häufig verbreitet. Eine homozygote bzw. compound heterozygote, d.h. gemischt homozygote Mutation, bei der jedes Exon 1 Allel eine unterschiedliche Mutation trägt, ist bei ungefähr 3% - 5% der Bevölkerung vorzufinden und wurde mit schweren und wiederkehrenden Infektionen sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern assoziiert. Etwa ein Drittel der Bevölkerung ist Träger heterozygoter *MBL2* Varianten.^{6,24-26} Es wurde postuliert, dass ein MBL Mangel zu den häufigsten Formen einer Immundefizienz beim Menschen beiträgt.⁹

Individuen, die homozygot/compound heterozygot für *MBL2* Exon 1 Varianten sind, haben sehr niedrige MBL Plasmakonzentrationen, die in der Regel nicht nachweisbar sind. Heterozygote zeigen Konzentrationen von bis zu 1000 ng/ml.^{27,28} Bei Serumspiegeln < 1000 ng/ml wird in der Literatur von niedrigen MBL Spiegeln gesprochen.⁶ MBL Plasmakonzentrationen variieren auch bei Individuen mit identischem Genotyp beträchtlich.^{9,28}

Die Häufigkeit der Varianten im *MBL2* Gen variiert zwischen ethnischen Gruppen.^{14,29} In der eurasischen Bevölkerung dominiert die Variante im Kodon 54 (G54D) mit 22-28%, gefolgt von der Variante im Kodon 52 (R52C) mit 14%. Die Variante im Kodon 57 (G57E) ist in dieser Population selten. Dagegen ist sie in der afrikanischen Bevölkerung im Gebiet Sub-Sahara zu 50-60% vorzufinden.¹⁴

Die drei varianten Allele verhindern die Ausbildung der MBL Grundstruktur (siehe Abbildung 3). Bei den Allelen B und C kommt es zu einer Unterbrechung in den Basen Triplets der Kollagenregion, was die Bildung der Triplehelix behindert. Die D Variante fügt eine zusätzliche Aminosäure ein und unterbricht somit die Oligomerisierung durch Bildung zu vieler Disulfidbrücken.^{12,14}

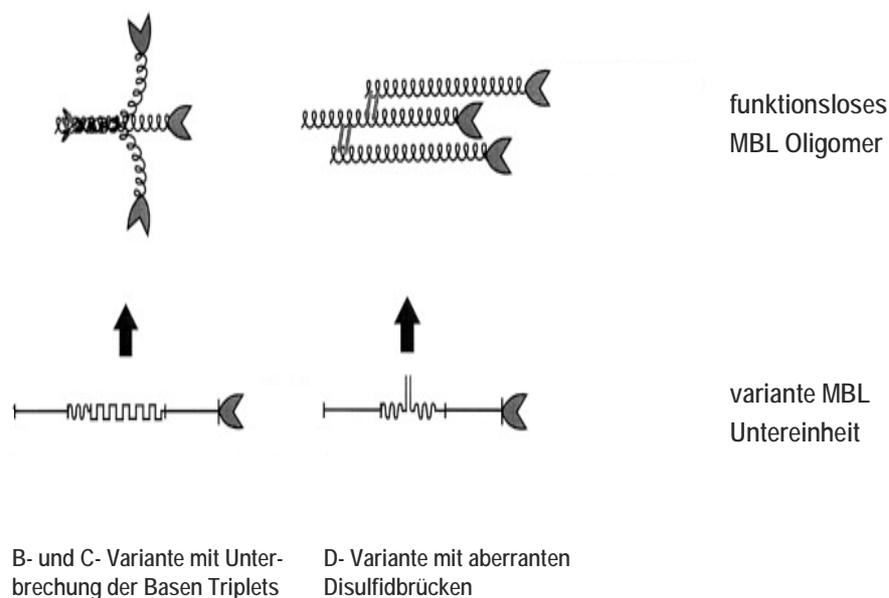
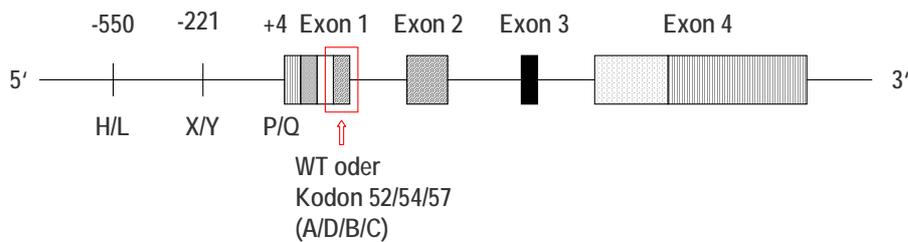


Abb. 3: Variante *MBL2* Allele mit Ausbildung funktionsloser Oligomere¹⁶

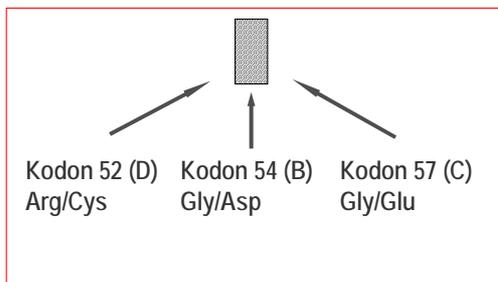
Die geringen Mengen an MBL in der Zirkulation von Individuen, die homozygot oder compound heterozygot für eine der drei Varianten sind, haben ein nachweislich geringeres Molekulargewicht als der *MBL2* Wildtyp. Heterozygote vereinen Merkmale zweier Phänotypen (Variante und Wildtyp). Sie produzieren hauptsächlich Wildtyp MBL mit normal hohem Molekulargewicht, daneben aber auch geringe Mengen einer niedermolekularen mutierten Form.³⁰

Neben den Exon 1 Varianten gibt es Varianten in der *MBL2* Promoter-Region (Positionen -550, -221 und +4, siehe Abb. 4), deren Funktionalität und Auswirkung auf MBL Serumspiegel jedoch nicht eindeutig geklärt sind.³¹

Detaillierte Struktur vom *MBL2* Gen:



Ausschnittsvergrößerung Exon 1:



Bekannte Haplotypen:

H	Y	P	A oder D
L	Y	P	A oder B
L	Y	Q	A oder C
L	X	P	A
<p>⏟</p> Promoterregion			<p>⏟</p> Exon 1

Legende:

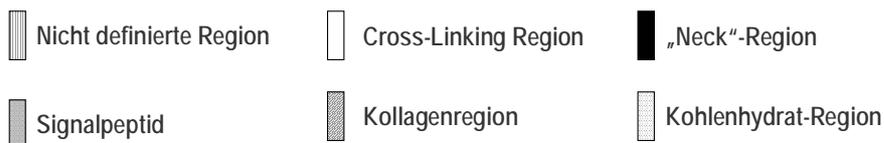


Abb. 4: Struktur des *MBL2* Gens - Promoterregion und Exon 1, nach Petersen et al.⁹

1.1.5 Klinische Bedeutung von *MBL2* Varianten

Ein MBL Mangel wurde erstmals als ein funktioneller opsonierender Defekt bei Kindern mit häufig wiederkehrenden Infekten und Gedeihstörungen entdeckt.³² Zahlreiche Studien unterstützen die Aussage, dass MBL eine komplexe Rolle bei verschiedenen Erkrankungen spielt. Ein Mangel des Proteins scheint in Zusammenhang mit einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen zu stehen, vor allem durch Organismen, die akute Atemwegserkrankungen in der frühen Kindheit auslösen, aber auch verschiedene andere extrazelluläre Pathogene und Viren.^{5,33}

In den ersten Lebensmonaten wird das Neugeborene durch mütterliche Antikörper der Gruppe IgG geschützt.^{34,35} Ihre Konzentration nimmt nach der Geburt kontinuierlich ab und erreicht nach 3-4 Monaten einen Tiefpunkt (physiologische Hypogammaglobulinämie).³⁶ Die endogene Synthese von Immunglobulinen setzt ca. 6 Monate postnatal ein.³⁵ Bis zum Alter von 4-6 Jahren kommt es zu einem stetigen Anstieg von IgG bis Konzentrationen eines Erwachsenen erreicht werden.³⁶ In der vulnerablen Phase vor der Ausbildung schützender Antikörper sind die Komponenten des angeborenen Immunsystems von größter Bedeutung bei der Abwehr invasiver Keime. MBL übernimmt eine entscheidende Funktion bei der Immunabwehr von Kindern mit noch unreifem erworbenen Immunsystem und sinkenden Spiegeln mütterlicher Immunglobuline.³²

Verschiedene im Kindesalter durchgeführte klinische Studien konnten einen Zusammenhang zwischen niedrigen MBL Serumspiegeln und einer erhöhten Infektanfälligkeit nachweisen,^{5,32,33,37} insbesondere in der vulnerablen Phase zwischen 6 und 18 Monaten, in denen das erworbene Immunsystem noch nicht ausgereift ist.⁵ Andere Studien können einen Zusammenhang zwischen defizienten MBL Spiegeln und Sepsis nachweisen.^{6,38-40}

Ist das erworbene Immunsystem beeinträchtigt, z.B. durch Immunsuppression unter chemotherapeutischer Behandlung und bei HIV-Infektion, dann ist der Körper auf eine intakte angeborene Immunität angewiesen. Eine Immunsuppression wird zwar überwiegend sekundär durch eine ko-existierende Immundefizienz⁴¹ oder durch z.B. Chemotherapie bedingt, sie kann aber auch auf primären Ursachen wie einem unreifen Immunsystem beruhen. VLBW Frühgeborene spiegeln eine Patientenpopulation wider,

auf die der zuletzt genannte Punkt zutrifft. Zusätzlich zu einem Mangel an Immunglobulinen in den ersten Lebensmonaten, deren Quantität im Vergleich zu Termingeborenen erheblich reduziert ist, sind Frühgeborene durch eine allgemeine Unreife ihres Immunsystems geprägt. Das Mannose-bindende Protein ist bei ihnen von größter Bedeutung, da seine Synthese bereits in der 25. Schwangerschaftswoche beginnt und somit auch Frühgeborene mit sehr niedrigem Geburtsgewicht über relevante MBL Serumspiegel verfügen sollten. Ein MBL Mangel könnte daher einen Risikofaktor für die erhöhte Sepsisrate bei VLBW Kindern im Vergleich zu Reifgeborenen darstellen.

1.2 Sepsis bei VLBW Frühgeborenen

Frühgeborene haben aufgrund der Unreife ihres Immunsystems ein stark erhöhtes Risiko, an schweren nosokomialen Infektionen zu erkranken. Bislang ist es noch nicht gelungen, allgemein gültige Übereinstimmung über die Definition einer neonatalen Sepsis zu erstellen.⁴² Sepsisdefinitionen für Erwachsene und Kinder treffen auf Frühgeborene nur eingeschränkt zu. Die einzelnen Stadien einer Sepsis (Sepsis – schwere Sepsis – septischer Schock – Multiorganversagen) eignen sich nur mäßig für die Beurteilung einer Infektion bzw. des Risikos einer Infektion bei Neonaten. Organveränderungen, die sich in den frühen Stadien des Krankheitsverlaufes entwickeln, können fehlen, und ein fulminanter Verlauf kann sich ohne Vorwarnung manifestieren. Parameter zur eindeutigen Stellung der Diagnose einer Sepsis und zur Beurteilung des Verlaufs würden helfen, eine frühe und effiziente Therapie einzuleiten.

1.2.1 Ätiologie der neonatalen Sepsis

Infektionen können prä-, peri- oder postnatal erworben werden. Frühgeburtlichkeit und niedriges Geburtsgewicht stellen ein stark erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Infektion bzw. Sepsis dar,^{3,43} wobei Frühgeborene im Rahmen ihrer intensivmedizinischen Behandlung häufiger intravenöse Zugänge und endotracheale Tuben benötigen als Termingeborene mit normalem Geburtsgewicht. Daraus resultiert ein zusätzlich erhöhtes Risiko für nosokomiale Infektionen.^{3,44,45} Ungefähr 20% der VLBWs erkranken an einer schweren systemischen Infektion während ihres initialen Krankenhausaufenthaltes.⁴³

Wichtige Krankheitserreger nosokomialer Infektionen sind grampositive Keime (koagulase-negative Staphylokokken/KNS, *Staphylokokkus aureus*, Streptokokken, Enterokokken), gramnegative Bakterien (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* Typ b, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* und *Serratia* Spezies u.a.), Viren, Pilze (*Candida* Spezies) und Parasiten.^{3,34}

Man unterscheidet Early-onset-neonatale-Sepsitiden (EONS; erworben < 72 h post partum) von Late-onset-neonatalen-Sepsitiden (LONS > 72 h),⁴⁶ wobei die Grenze von 72 Stunden in der Literatur variieren kann. Ein Zeitpunkt von 72 Stunden wird u.a. in der Neonatalerhebung in Deutschland verwendet.^{42,47} EONS sind hauptsächlich konnatal erworbene Infektionen, LONS treten überwiegend nosokomial auf.

Eine Very-Late-Onset-Sepsis (VLONS) wird definiert, wenn diese > 60 Tage nach der Geburt auftritt. Sie wird überwiegend bei Frühgeborenen mit zentralen Zugängen, gastrointestinalen Problemen oder chronischen Lungenerkrankungen beobachtet. Sie hat eine bessere Prognose als EONS und LONS.⁴⁶

Bei VLBWs ist ungefähr die Hälfte aller Todesfälle jenseits der zweiten Lebenswoche auf eine Sepsis zurückzuführen.⁴⁸ Gleichzeitige Infektionen mit mehr als einem Organismus sind keineswegs ungewöhnlich. Die Mehrzahl von LONS (70%) wird durch grampositive Bakterien verursacht, wobei KNS für 48% der Infektionen verantwortlich sind.⁴³ Der hohe Anteil an KNS ist vor allem durch Katheter-assoziierte Infektionen zu erklären. Er beruht allerdings auch auf Verunreinigungen durch perkutane venöse Blutentnahmen, was genaue Angaben über die Inzidenz KNS-assoziiierter Morbidität und Mortalität erschwert.⁴⁹

1.2.2 Inzidenz der neonatalen Sepsis

Bei neonataler Sepsis ist die Inzidenz umgekehrt proportional zu Geburtsgewicht und Gestationsalter.^{43,50,51} Bei Termingeborenen beträgt sie ca. 0,1%, bei VLBW Frühgeborenen dagegen ungefähr 20%. LONS treten mehr als zehnfach häufiger auf als EONS.⁴⁶ VLONS sind verhältnismäßig selten und manifestieren sich erst nach längeren Krankenhausaufenthalten (siehe Abbildung 5).

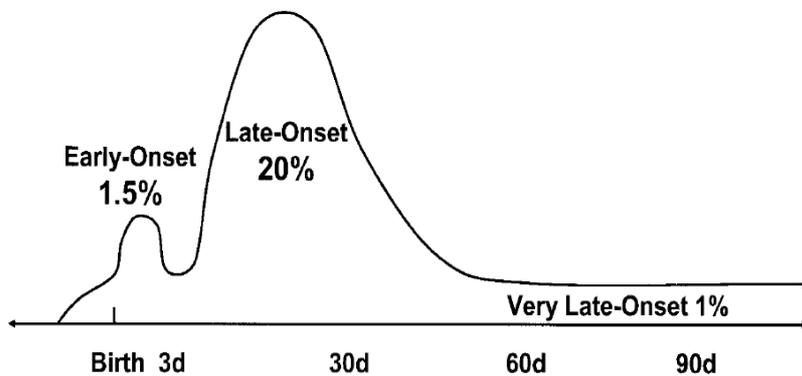


Abb. 5: Reihenfolge systemischer Infektionen bei VLBW Frühgeborenen: Die Prozentzahlen indizieren die ungefähre Anzahl von VLBWs mit einer Sepsis. Bei EONS handelt es sich überwiegend um aufsteigende Amnioninfektionen. LONS werden vor allem horizontal (nosokomial), aber auch vertikal während der Geburt übertragen. Die große Mehrheit der Sepsitiden bei VLBW Frühgeborenen tritt innerhalb der ersten 30 Lebenstage auf. VLBWs, die länger dauernde intensivmedizinische Behandlung benötigen, haben ein erhöhtes Risiko für VLONS jenseits des zweiten Lebensmonats.⁴⁶

Die meisten VLBW Frühgeborenen erkranken an einer septischen Episode während ihres Krankenhausaufenthaltes. Mehrfache Episoden kommen vor allem bei Frühgeburten mit extrem niedrigen Geburtsgewicht vor, hauptsächlich < 750 g.⁴³

1.2.3 Klinisches Bild und Verlaufsform einer Sepsis

Die Symptome einer Sepsis sind variabel unspezifisch und initial meist sehr diskret. Fokale Infektionen der Haut, des Urogenitaltraktes, der Lungen, des Gastrointestinaltraktes und des ZNS stellen häufige Manifestationsformen einer Sepsis bei Frühgeborenen dar.⁴⁶

Eine gastrointestinale Symptomatik, Apnoen und Trinkunlust gelten als wichtige Anzeichen einer beginnenden Sepsis. Tachykardie und Tachypnoe sind häufig frühe Symptome bei vielen verschiedenen pädiatrischen Erkrankungen. Gewichtsabnahme, Unruhe oder Apathie können erste Zeichen einer Generalisierung sein, ebenso wie ein erhöhter Sauerstoffbedarf und verstärkte Atemunterstützung. Andere mögliche Primärsymptome sind Hautveränderungen, wie ein grünlich marmoriertes Hautkolorit, eine verlängerte Rekapillarierungszeit (> 2 Sekunden) oder z.B. Petechien als Zeichen einer hämorrhagischen Diathese. Temperaturinstabilität (Hypo- oder

Hyperthermie) ist ebenfalls hinweisgebend für eine beginnende Infektion.^{34,51-53} Fieber tritt bei Neugeborenen in der Regel nicht auf, da Veränderungen der Körpertemperatur durch Regulierung der Inkubator Temperatur gegengesteuert werden.⁴² Erbrechen, Durchfall und Ikterus mit Hepatosplenomegalie können im Verlauf einer Sepsis auftreten.^{34,53}

Symptome, die auf einen Fokus hinweisen (Pneumonie, Pyelonephritis oder Meningitis), können zusätzlich bestehen. Auf eine Pneumonie weisen neben Tachydyspnoe z.B. Nasenflügeln, interkostale Einziehungen oder respiratorische Insuffizienz hin. Bei einer Meningitis würde man Zeichen eines erhöhten intrakraniellen Drucks, z.B. eine gespannte Fontanelle, Zunahme des Kopfumfangs oder zerebrale Symptome wie Berührungsempfindlichkeit, Bewusstseinsstörungen oder Krampfanfälle erwarten.^{34,53} Diese Symptome können allerdings auch fehlen.

Zeichen von Organdysfunktionen weisen auf eine zunehmende Kreislaufinsuffizienz hin. Dazu zählen Tachykardie, periphere Durchblutungsstörungen, kalte Extremitäten, Zyanose, Oligo- bzw. Anurie und zentralnervöse Symptome wie Lethargie, Irritabilität, Krampfanfälle oder Koma. Eine schwere Infektion kann bis zum septischen Schock führen, der sich entweder akut oder eher schleichend präsentiert. Bei Fieber und Schmerzen unklarer Genese muss immer an Frühsymptome einer perakuten Sepsis gedacht werden.⁵²

1.2.3.1 Nekrotisierende Enterokolitis (NEC)

Eine besonders schwere Verlaufsform einer Sepsis stellt bei VLBW Frühgeborenen die nekrotisierende Enterokolitis (NEC) dar. Sie umfasst ein Krankheitsbild, bei dem es durch eine Ansammlung von Bakterien in geschädigter Darmschleimhaut zur intestinalen Nekrose kommt.^{54,55} In 20-30% der Fälle ist sie mit einer Bakteriämie verbunden, obwohl man von einem eher lokalen Geschehen ausgeht.⁵⁶ Zu den Symptomen einer NEC zählen ein geblähtes Abdomen, galliges oder blutiges Erbrechen bzw. Aspiration, schleimig-blutige Stühle bzw. fehlender Stuhl und ein allgemein septisches Krankheitsbild. Weiterhin können Darmwanderytheme, eine glänzende oder rote Bauchdecke und fehlende Peristaltik richtungweisend sein.^{53,55} Abhängig vom Ausmaß der Erkrankung und der Unreife der Neugeborenen beträgt die Mortalität bis zu 50%.⁵⁷⁻⁵⁹

1.2.4 Diagnose einer Sepsis

Die Diagnose einer Sepsis kann nur im Zusammenhang von Anamnese und klinischen Befunden gestellt werden. Wichtiger Bestandteil ist die mikrobiologische Diagnostik. Dazu dienen Blutkulturen, Liquor- und Blasenpunktionen. Oft sind mehrere Blutkulturen, aerob und anaerob, nötig, um einen Krankheitserreger zu ermitteln.⁵² Die technischen Gegebenheiten bei Frühgeborenen erschweren die Keimbestimmung. Es bedarf einer ausreichenden Menge an Blut, um einen Keim isolieren zu können. Bei Frühgeborenen stellt dies aufgrund ihrer Größe und ihres Gewichts oft ein Problem dar. Häufig wird nur eine Blutkultur von einem septisch wirkenden Kind gewonnen und ein positiver Befund als Beweis für eine vorliegende bakterielle Infektion gewertet. Im Falle koagulase-negativer Staphylokokken fordern jedoch mehrere Studien die Isolierung eines Keims aus zwei Blutkulturen oder einer Blutkultur plus zusätzliche laborchemische Hinweise auf eine Sepsis. Viele Neonaten, die starke klinische Indikatoren einer Sepsis (Apnoe, Lethargie etc.) und Laborabweichungen aufweisen, haben eine negative Blutkultur.⁴⁶ Zusätzlich können Abstriche (Wunden, Nasen-Rachen), Sekrete (Trachea, Drainagen), Punktionsflüssigkeiten, Spontanurin und Stuhl mikrobiologisch untersucht werden.⁵² Im Virchow Klinikum wird allen direkt aus dem Kreißsaal aufgenommenen Neugeborenen ein Ohrabstrich entnommen. Virus- und Pilzinfektionen können anhand der DNA über die Polymerase Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen werden.⁴⁶

Bildgebende Verfahren wie Sonographie, Computer- oder Kernspintomographie und Röntgendiagnostik können zum Nachweis eines Sepsisherdes eingesetzt werden.⁵² Bei einer Pneumonie würde man z.B. auf infiltrative Veränderungen im Röntgen-Thorax achten, bei einer Meningitis auf Veränderungen in der Schädelsonographie.⁵³ Bei der Diagnose einer NEC sind die radiologischen Zeichen in der Abdomen-übersichtsaufnahme entscheidend. Dazu gehören verdickte Darmwände, Pneumatis intestinalis (Luft- bzw. Gasansammlung in der Darmwand), Luft im Pfortadersystem, ein Pneumoperitoneum und unverändert stehende Darmschlingen (auf zwei Aufnahmen).⁵⁵

Wie bereits erwähnt ist die Labordiagnostik von großer Bedeutung. Sie dient sowohl dem Nachweis von Entzündungsreaktionen als auch der Verlaufskontrolle und der Diagnostik von Organfunktionsstörungen. Wichtige Parameter sind das Differentialblutbild, Leukozyten- und Thrombozytenzahl, IL-6, CrP sowie die I/T-Ratio.^{34,52} Unter I/T-Ratio versteht man das Verhältnis von unreifen neutrophilen Granulozyten zur

Gesamtzahl der Neutrophilen (Immature/Total). Sie spiegelt die Linksverschiebung bei einer akuten Entzündung wieder.

Bei Late-onset-Infektionen ist das CrP von besonders hohem diagnostischem Wert. Für die Verlaufskontrolle einer Sepsis ist es unverzichtbar. Untersuchungen haben ergeben, dass die CrP Konzentration mit zunehmendem Gestationsalter steigt. Bei Frühgeborenen < 35 Schwangerschaftswochen kommt es in der Regel zu noch keinem relevanten Anstieg des CrP.⁶⁰ Daher erfordert ein negativer Befund eine vorsichtige Interpretation.

IL-6 hat zu Beginn einer Infektion die höchste Sensitivität, was es zu einem wertvollen Frühindikator einer Sepsis macht. Bei Geburt ist IL-6 allerdings wenig spezifisch, da postnatal fast immer eine erhöhte Serumkonzentration vorzufinden ist. Eine kombinierte Messung von IL-6 (früh und sensitiv) und CrP (spät und spezifisch) innerhalb der ersten 48 Stunden einer vermuteten Sepsis ist klinisch von hoher Aussagekraft.⁶¹

Von weiterer diagnostischer Bedeutung sind Elektrolyte, Glukose, Laktat, Bilirubin, Transaminasen (AST, ALT), Kreatinin und Gerinnungsparameter sowie eine Blutgasanalyse, über die u.a. der pH-Wert bestimmt werden kann.⁵²

In der Klinik für Neonatologie der Charité, Campus Virchow Klinikum sind folgende Infektionsparameter richtungsweisend:

- Leukozytose, Leukopenie (< 5/nl), I/T-Ratio > 0,20
- Thrombozytenabfall (im Vergleich zu Vorbefunden oder absolut < 50/nl)
- IL-6 > 30 ng/l
- CrP > 1 mg/dl
- Hyperglykämie, Azidose (unspezifisch)

Die Aussagekraft jedes einzelnen Parameters ist jedoch sehr gering und allein nicht ausreichend für eine adäquate Abbildung des Immunstatus eines Patienten.⁴⁸

1.2.5 Pathophysiologie der Sepsis

Nach einer initialen Interaktion zwischen Wirt und Pathogen kommt es zur Aktivierung der angeborenen Immunität mit seinen humoralen und zellulären Komponenten (Abbildung 6).

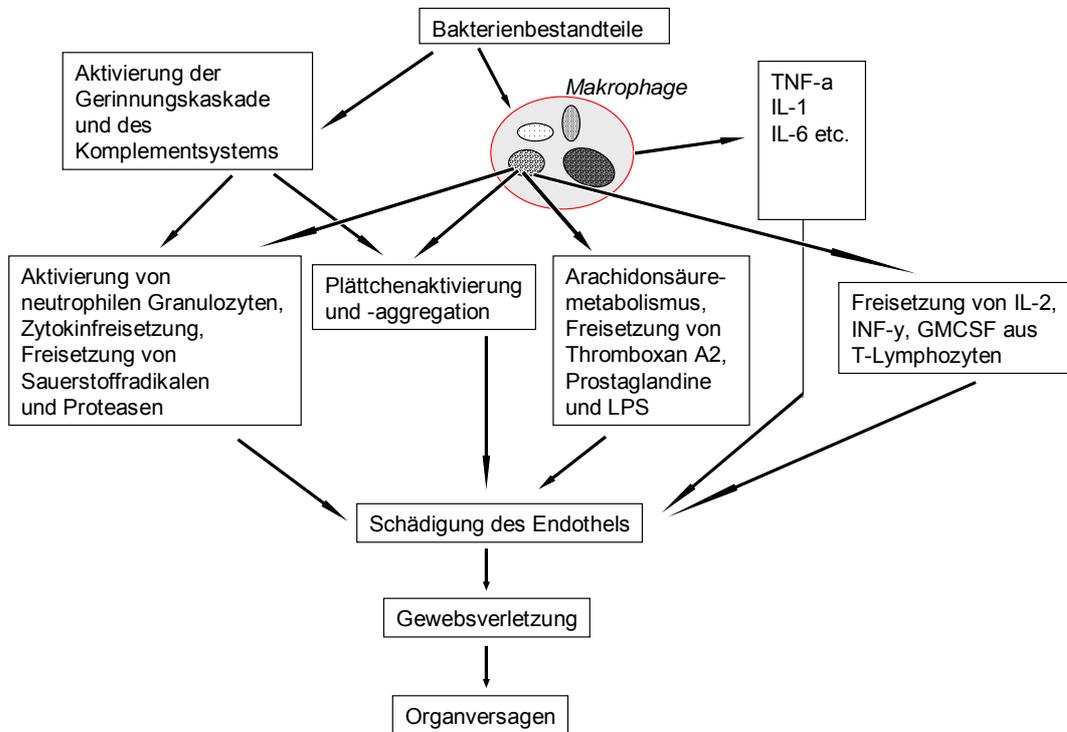


Abb. 6: Sepsis Kaskade: Zum einen werden die Gerinnungskaskade und das Komplementsystem aktiviert, zum anderen die Abwehzellen unseres Körpers. Aktivierte Makrophagen produzieren die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und die Interleukine IL-1 und IL-6, aktivieren weitere Abwehzellen und die Freisetzung von Botenstoffen und Enzymen, führen zur Plättchenaktivierung und -aggregation sowie zur Aktivierung des Arachidonsäuremetabolismus. Daraus resultieren Endothelschädigungen und Gewebsverletzungen, wobei es zum Multiorganversagen kommen kann (Leber- und Nierenversagen, akutes Atemnotsyndrom, hypoxische Schädigung intestinaler Organe und des ZNS), nach Bone et al.⁶²

Mit steigender Unreife eines Neugeborenen wächst das Ausmaß der Endothelschädigung und dementsprechend des septischen Geschehens.

Um einer überschießenden Reaktion vorzubeugen und damit die Homeostase zu erhalten, werden neben proinflammatorischen Zytokinen gleichzeitig auch antiinflammatorische Zytokine produziert (z.B. IL-10). Ist die proinflammatorische Immunantwort zu stark, kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-

inflammatorischen Zytokinen, was zu schwersten Verlaufsformen einer Sepsis mit Multiorganversagen führen kann. Andersherum kann es im Falle einer zu starken anti-inflammatorischen Reaktion zu einer verminderten Immunantwort mit Immunparalyse kommen.^{63,64}

Die Abfolge der einzelnen Ereignisse während eines septischen Verlaufs lässt sich gut anhand einer Pyramide nach Bone et al. (Abb. 7) verdeutlichen. Jede Ebene spiegelt einen höheren Grad der Endothelschädigung wider.

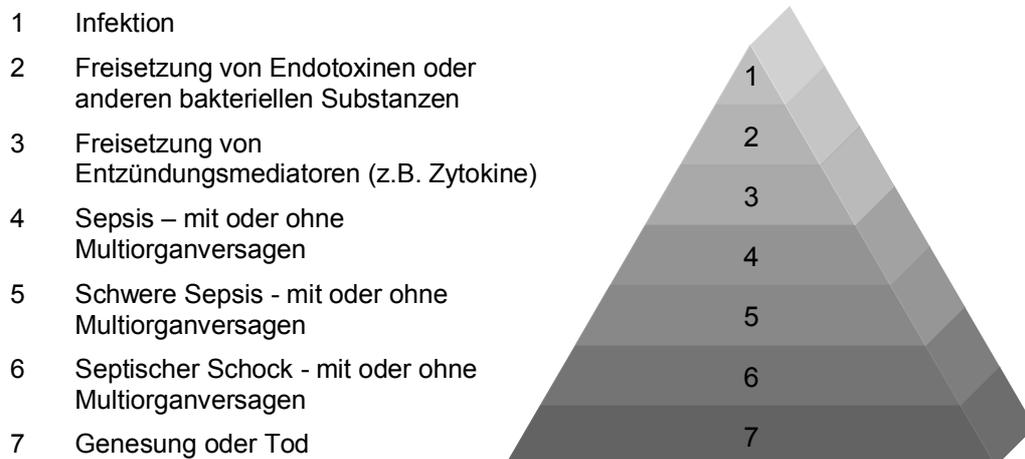


Abb. 7: Sepsispyramide - nach Bone et al.⁶²

1.3 Das Immunsystem VLBW Frühgeborenen

1.3.1 Angeborenes und erworbenes Immunsystem

Die angeborene Immunität ist die phylogenetisch ältere und ist für die frühe Abwehr von Krankheitserregern zuständig. Sie ist unspezifisch und somit gegen eine Vielzahl von Pathogenen gerichtet. Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten bilden die zelluläre Abwehr des angeborenen Immunsystems. Sie besitzen verschiedene mikrobielle Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, so genannte Pattern Recognition Receptors (PRRs), wie die Toll-like-Rezeptoren, z.B. TLR-4 und CD-14. Sie erkennen häufig vorkommende molekulare Strukturen von Krankheitserregern - Pathogen-associated Molecular Patterns (PAMPs), zu denen u.a. Lipopolysaccharide (LPS) auf gramnegativen Bakterien gehören.⁶⁵ In den letzten Jahren wurden 10 menschliche TLR beschrieben und als wichtige Sensoren der angeborenen Immunität erkannt. Über die Reifung der Toll-like Rezeptoren während der fetalen Entwicklung ist jedoch bis jetzt wenig bekannt.²

Die wichtigsten humoralen Faktoren sind das Komplementsystem und eine Reihe von Proteinen mit opsonisierender Funktion.⁶⁶ Zu dieser Gruppe zählt auch das MBL, ein entwicklungsgeschichtlich sehr alter Bestandteil unseres Immunsystems.²³ Im Vergleich zum klassischen Akute-Phase-Protein CrP, bei dem es zu einem vielfachen Anstieg während einer Entzündung kommt, steigen die MBL Serumspiegel nur um das etwa Zweifache an.⁶⁷ Die Vernichtung von Pathogenen geschieht entweder auf direktem Weg durch Opsonophagozytose oder durch Aktivierung des Komplementsystems.⁶⁸

Die erworbene Immunität ist spezifisch gegen Antigene eines bestimmten Erregers gerichtet und wird von Lymphozyten vermittelt. Wichtiger Bestandteil sind die von Plasmazellen gebildeten Immunglobuline, die als Antikörper fungieren. Bei erstmaligem Kontakt mit einem bisher unbekanntem Antigen ist das spezifische Immunsystem noch nicht einsatzbereit, da die Bildung spezifischer Antikörper Tage bis Wochen dauern kann. An der Ausführung der erworbenen Immunantwort sind die Zellen und Faktoren des angeborenen Immunsystems beteiligt, insbesondere Phagozyten und Komplementfaktoren. Dabei stehen die angeborene und erworbene Immunität in enger Wechselbeziehung.³⁶ MBL unterstützt die Interaktionen der beiden Abwehrsysteme, indem es das Komplementsystem aktiviert. Die folgende Abbildung fasst das Zusammenspiel der angeborenen und erworbenen Immunität zusammen.

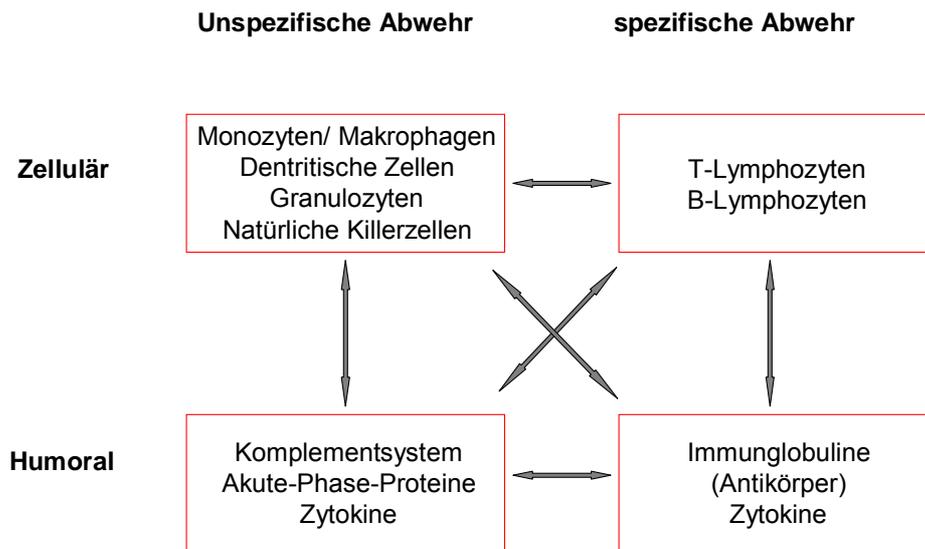


Abb. 8: Interaktion von unspezifischen und spezifischen Abwehrmechanismen zellulärer und humoraler Art in einem komplexen Funktionssystem ⁶⁹

Die entscheidenden Komponenten beider Immunsysteme entwickeln sich bereits in der frühen Schwangerschaft. Abbildung 9 stellt die fetale Entwicklung der Komponenten des Immunsystems dar. Ab einem Gestationsalter von 23 Schwangerschaftswochen besitzt der Fetus Lymphozyten, Leukozyten, Monozyten und Makrophagen sowie die Fähigkeit, alle Komponenten des Immunsystems zu synthetisieren.⁷⁰ Allerdings sind die Anzahl und die Aktivität neutrophiler Granulozyten und Monozyten zu diesem Zeitpunkt noch gering, und auch das Knochenmark hat nur eine eingeschränkte Speicherkapazität. Die Konzentration von Komplementfaktoren ist umso niedriger, je geringer das Gestationsalter des Kindes ist.^{2,46} Obwohl der Fetus frühzeitig in der Lage ist, Immunglobuline zu produzieren, werden bis zum Zeitpunkt der Geburt nur wenige Antikörper synthetisiert. IgG ist das einzige Immunglobulin, das die Plazenta passieren kann. Damit stellt es den Hauptanteil an fetalem Immunglobulin dar. Mit zunehmender Schwangerschaft steigt der IgG Spiegel des Feten stetig an. Dementsprechend spiegelt die neonatale IgG Konzentration den Grad der Reife bzw. Unreife des Neugeborenen wider.⁷¹ Die Hauptpassage an mütterlichem IgG findet ab der 32. SSW statt.^{46,72} Da die endogene Synthese erst ca. 24 Wochen postnatal einsetzt,³⁵ fällt die neonatale IgG Serumkonzentration nach der Geburt kontinuierlich ab. Die Anfälligkeit Frühgeborener

für Infektionen steht in direktem Zusammenhang mit den niedrigen Spiegeln an mütterlichem IgG. Je geringer das Gestationsalter ist, desto niedriger ist die Quantität der Immunglobuline.⁷⁰

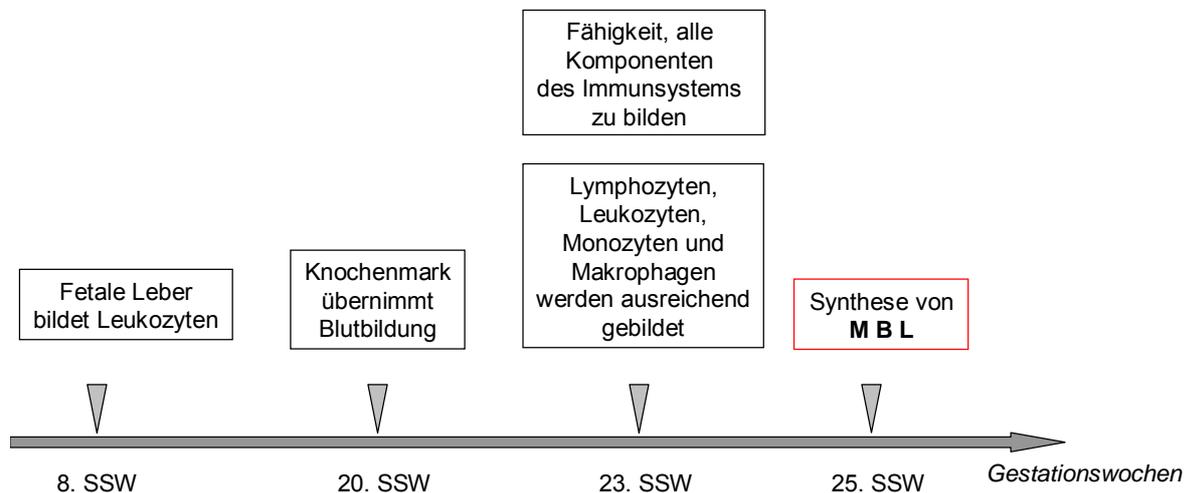


Abb. 9: Entwicklung einzelner Komponenten des Immunsystems bei Feten

In den ersten Lebensmonaten kommt daher den Komponenten der angeborenen Immunabwehr, vor allem dem Komplementsystem, eine entscheidende Bedeutung zu. Ihre Abwehr setzt früh, schnell und unspezifisch ein, weshalb sie auch als „First-Line“ Abwehr bezeichnet wird.³⁶ Eine adäquate Serumkonzentration an Komplementkomponenten, insbesondere auch an MBL, ist eine Voraussetzung für eine adäquate „First-Line“ Abwehr. Eine Defizienz der angeborenen Immunität prädisponiert wahrscheinlich zur Entwicklung schwerer Infektionen, weil die schnelle Vervielfältigung von pathogenen Keimen im frühen Stadium einer Infektion nicht inhibiert wird. Da MBL ab der 25. SSW gebildet wird,⁷ ist anzunehmen, dass es bereits bei Frühgeborenen seine Wirkung entfaltet. Defiziente MBL Spiegel führen zu einer geschwächten Immunantwort und könnten daher für eine erhöhte Suszeptibilität VLBW Frühgeborener bestimmten Erkrankungen gegenüber mitverantwortlich sein. Ein MBL Mangel könnte in direktem Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko einer Neugeborenen Sepsis stehen.

1.3.2 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem nimmt eine wichtige Rolle bei der angeborenen und erworbenen Immunität ein. Es handelt es sich um ein hoch entwickeltes Kaskadensystem, das sich aus mehr als 30 in der Leber synthetisierten Proteinen zusammensetzt. Das Komplementsystem aktiviert Leukozyten und Makrophagen mittels Chemotaxis, erkennt und vernichtet aber auch eindringende Keime und atypische Wirtszellen durch Opsonisierung und Lyse. Seine Komponenten finden sich sowohl in gelöster Form im Serum als auch an Zellmembranen gebunden.^{12,73} Sie aktivieren sich in einer vorgegebenen Reihenfolge. Die drei Wege der Komplementaktivierung sind in Abbildung 10 (aus Carcillo et al.⁷⁴) dargestellt.

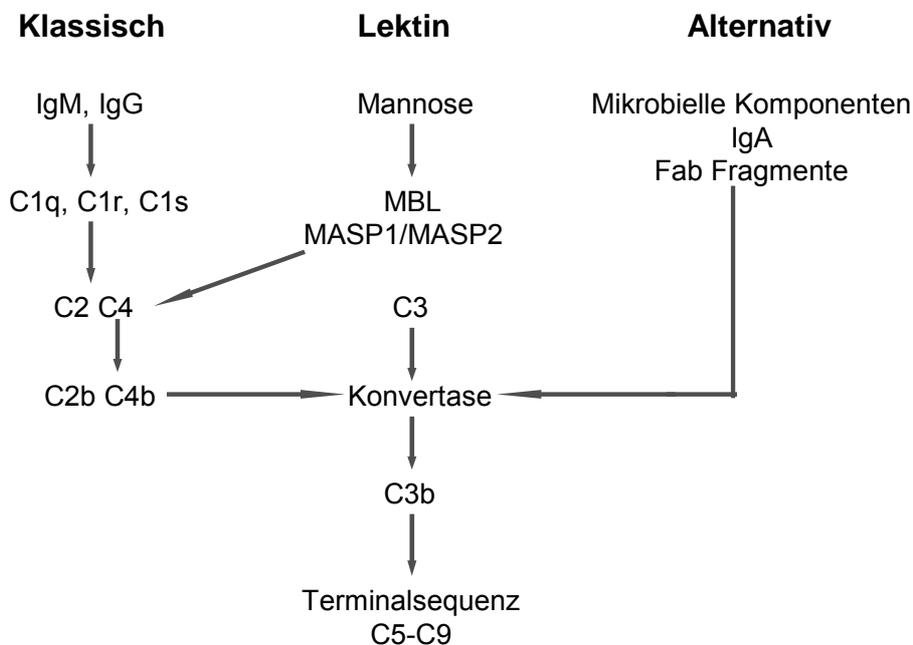


Abb. 10: Es gibt drei Wege der Komplementaktivierung: den klassischen Weg, den Lektinweg und den alternativen Weg. Erkennung durch die beiden ersteren führt zur Aktivierung einer Kaskade von Proteasen und Spaltung der Komplementkomponenten C2 und C4 in den Komplex C4b2a. Dieser fungiert als C3 Konvertase und spaltet C3 in C3a und C3b. C3b fungiert als Opsonin für Phagozyten und trägt zur Bildung einer C5 Konvertase bei. Diese leitet die Terminalsequenz ein, die aus den Komponenten C5-C9 besteht. Sie führt zur Porenbildung auf der Oberfläche der Zielzellen und somit zum Zelltod. Der alternative Weg der Komplementaktivierung wird durch einen unterschiedlichen Mechanismus ausgelöst. Er reagiert auf Fremdkörper, die keine Zuckermoleküle auf ihrer Oberfläche tragen und somit nicht vom Lektinweg erkannt werden können. Er kann sowohl mit als auch ohne Antikörper aktiviert werden.^{12,75}

1.3.2.1 MBL und seine Bedeutung für das Komplementsystem

Die Erkennungseinheit des Lektinweges ist das MBL, welches strukturelle Ähnlichkeit mit der Erkennungseinheit des klassischen Weges C1(q) aufweist. MBL aktiviert das Komplementsystem mittels Bindung von Kohlenhydratstrukturen auf einer Reihe von Mikroorganismen wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten.^{12,22,76} Dafür bildet MBL einen Komplex mit Proenzymen, den so genannten MASPs/MBL-associated Serine Proteases (siehe Abb. 11). MASPs ähneln in ihrer Struktur C1r und C1s und stammen von zwei *MASP* Genen ab (*MASP-1/3* Gen und *MASP-2* Gen).^{73,77}

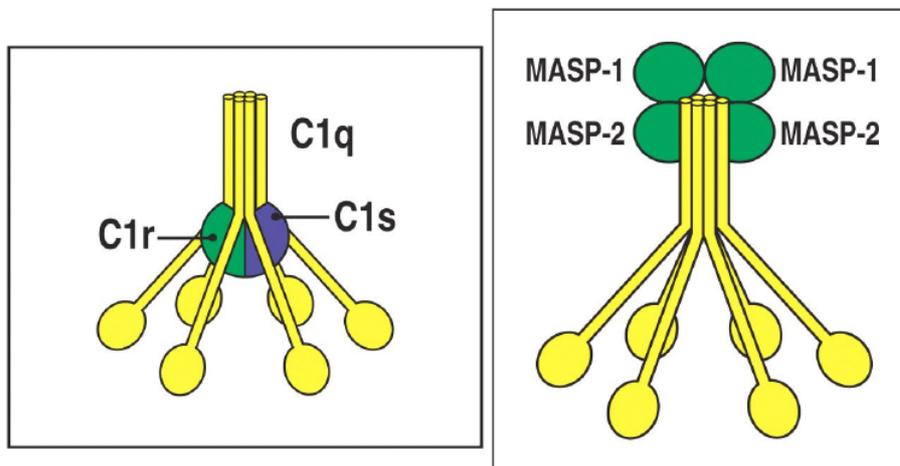


Abb. 11: MBL und MASPs⁷⁸

Durch Bindung von MBL an eine Zielzelle kommt es zur Aktivierung von MASP-1 und MASP-2. MASP-2 führt zur Spaltung von C4 und C2, wodurch die C3 Konvertase C4b2a entsteht. MASP-1 ist dagegen in der Lage, C3 direkt zu spalten.^{9,73} Bei der Aktivierung des Komplementsystems hat MASP-2 eine größere Bedeutung verglichen mit MASP-1.⁷⁹ In Abbildung 12 ist die Aktivierung des Komplementsystem über den Lektinweg dargestellt.

Kürzlich wurde eine dritte MBL-assoziierte Serinprotease, MASP-3, gefunden, welche durch alternatives Spleißen des *MASP-1/3* Gens entsteht.⁸⁰ Seine physiologische Aktivität muss noch untersucht werden.^{9,73}

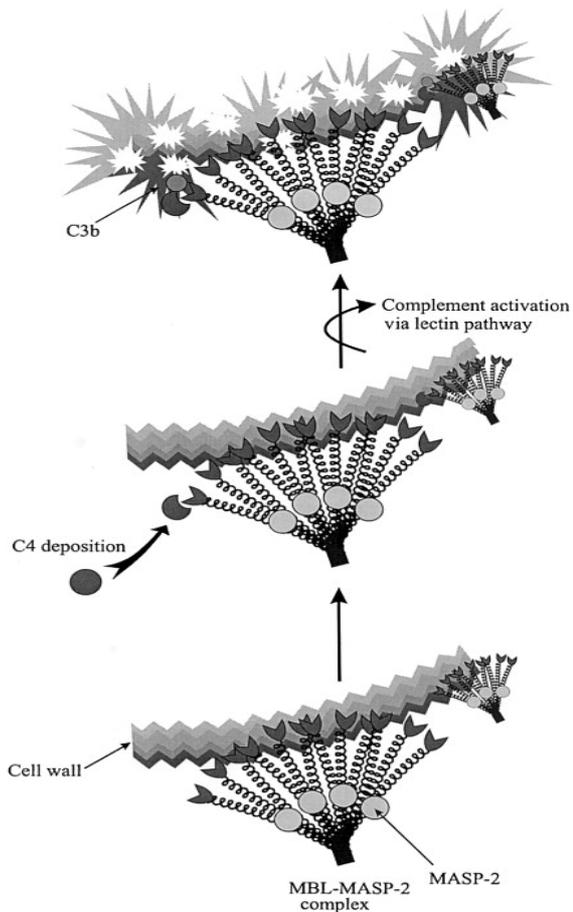


Abb. 12: MBL und MASP-2 bilden einen Komplex, der an Kohlenhydrat-Einheiten auf der Oberfläche von Mikroorganismen bindet. Durch die Anlagerung von C4 kommt es zur Aktivierung des Komplementsystems über den Lektinweg, was zur Bildung der Komplementkomponente C3b und letztendlich zur Vernichtung des Mikroorganismus führt.¹⁶

Komplementproteine werden bereits in der frühen Schwangerschaft (erstes Trimenon) synthetisiert.^{72,81} Sie sind nicht plazentagängig. Zum Zeitpunkt der Geburt liegt der Serumspiegel der Komplementkomponenten zwischen 50% und 75% des mütterlichen Spiegels.⁸¹ Bei Frühgeborenen ist die Komplementaktivität geringer,⁸² was Ursache für die verminderte opsonisierende Serumaktivität ist.

Die Elimination Sepsis-auslösender Erreger sowie vieler anderer Pathogene ist entscheidend vom Komplementsystem abhängig. Eine unzureichende Aktivierung führt zu einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen. Gerade bei ungenügendem Schutz durch das erworbene Immunsystem erlangt MBL seine Bedeutung bei der Aktivierung des Komplementsystems. In in-vitro- und Tierexperimenten wurde gezeigt, dass eine

fehlerhafte Komplementaktivierung über den Lektinweg mittels MBL starke Auswirkungen auf die angeborene Immunität hat.²⁶

MBL fungiert als Ante-Antibody, d.h., dass es das Eindringen von Mikroorganismen kontrolliert, bevor es zur Bildung spezifischer Antikörper und zur Aktivierung der zellulären Abwehr kommt.^{13,41,83} Damit übernimmt MBL vermutlich eine entscheidende Rolle bei der Immunabwehr VLBW Frühgeborener.

1.4 Genetik der Sepsis

Zahlreiche klinische Studien und Kandidatengenstudien weisen darauf hin, dass genetische Faktoren bei einer Sepsis wahrscheinlich eine entscheidende Rolle spielen.^{4,64,84,85} Kandidatengene sind Gene, die aufgrund ihrer Funktion oder ihres Expressionsmusters die Pathogenese einer Erkrankung beeinflussen oder eine Krankheit auslösen können. So könnten funktionelle Varianten in Genen der angeborenen Immunität die Entwicklung und den Verlauf einer Sepsis maßgeblich beeinflussen. Bei genetischen Varianten findet sich meistens ein Austausch einzelner Basenpaare - SNP (Single Nucleotide Polymorphism).

Von den Kandidatengen, die im Rahmen einer Sepsis von Bedeutung sind, ist das *MBL2* Gen am besten untersucht. Obwohl die Ergebnisse nicht immer eindeutig sind, konnte gezeigt werden, dass variante *MBL2* Genotypen Auswirkungen auf die Entstehung und den Verlauf verschiedener inflammatorischer Erkrankungen haben.^{14,86}