

Aus dem Institut für Experimentelle Endokrinologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Veränderungen im Spurenelementhaushalt
bei Neugeborenen mit konnatalen bakteriellen Infektionen:
Der Kupfer/Zink-Koeffizient als ein neuer Biomarker bei
Neugeborenen mit Early-Onset-Infektionen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Monika Dorota Wiśniewska
aus Będzin

Datum der Promotion: 06.03.2020

Vorwort

Die hier beschriebene klinische Studie wurde zur Erforschung von folgenden drei Themen durchgeführt: „Selen und Selenoprotein P“, „Schilddrüsenhormone“ sowie „Kupfer, Ceruloplasmin, Zink und der Kupfer/Zink-Koeffizient“ bei Neugeborenen mit konnatalen bakteriellen Infektionen. Es waren mehrere Personen an der Durchführung der Studie beteiligt, im Folgenden soll mein Promotionsthema: „Kupfer, Ceruloplasmin, Zink und der Kupfer/Zink-Koeffizient bei Neugeborenen mit konnatalen bakteriellen Infektionen“ dargestellt werden.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits im Rahmen von folgenden Veröffentlichungen publiziert beziehungsweise zur Publikation eingereicht:

[1] Wisniewska, M. †; Cremer, M. †; Wiehe, L. †; Becker, N.P.; Rijntjes, E.; Martitz, J.; Renko, K.; Bühler, C.; Schomburg, L. Copper to zinc ratio as disease biomarker in neonates with early-onset congenital infections. *Nutrients* 2017, 9.

[2] Wiehe, L. †; Cremer, M. †; Wisniewska, M. †; Becker, N.P.; Rijntjes, E.; Martitz, J.; Hybsier, S.; Renko, K.; Bühler, C.; Schomburg, L. Selenium status in neonates with connatal infection. *The British journal of nutrition* 2016, 116, 504-513.

Hackler, J.; Wisniewska, M.; Greifenstein-Wiehe, L.; Minich, W.; Cremer, M.; Bühler, C.; Schomburg, L. Copper and selenium status as diagnostic biomarkers of neonatal infections. submitted 2019.

† gleichberechtigte Erstautoren

Inhaltsverzeichnis

Vorwort.....	2
Inhaltsverzeichnis.....	3
Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	7
Abkürzungsverzeichnis.....	8
Abstrakt (Deutsch).....	10
Abstract (Englisch)	12
1. Einleitung.....	14
1.1. Essentielle Spurenelemente.....	14
1.2. Kupfer und Zink.....	14
1.2.1. Metabolismus.....	15
1.2.2. Funktionen im menschlichen Organismus.....	17
1.2.3. Kupfer, Zink und das Immunsystem	18
1.2.4. Kupfer- und Zink-Mangel.....	20
1.2.5. Kupfer- und Zink-Exzess	21
1.2.6. Veränderungen im Spurenelementhaushalt während akuter Infektions- erkrankungen.....	23
1.3. Neonatale Early-Onset-Infektionen	25
1.3.1. Definition und Epidemiologie.....	25
1.3.2. Diagnostik	26
1.3.3. Therapie.....	26
1.3.4. Prognose.....	27
1.4. Der Kupfer/Zink-Koeffizient als Biomarker.....	28
1.5. Ziel der Studie.....	29
2. Materialien und Methoden	30
2.1. Studiendesign und Studiengruppen	30
2.2. Ein- und Ausschlusskriterien.....	31
2.3. Klinische Abläufe und Patientenrekrutierung.....	33
2.4. Gewinnung und Prozessierung der Blutproben	33

2.5.	Laboranalysen	34
2.5.1.	Spurenelemente	34
2.5.2.	Ceruloplasmin	35
2.5.3.	Interleukin-6 und C-reaktives Protein.....	35
2.6.	Statistische Auswertung	36
3.	Ergebnisse.....	37
3.1.	Studienpopulation	37
3.2.	Kupfer und Ceruloplasmin.....	39
3.2.1.	Korrelation zwischen Kupfer und Ceruloplasmin.....	39
3.2.2.	Infektions- und Kontrollgruppe im Vergleich	41
3.2.3.	Dynamik des Plasma-Kupfers und -Ceruloplasmins vom Tag der Geburt (Tag 1) zu Tag 3 nach der Geburt.....	41
3.2.4.	Korrelation mit den Inflammationsmarkern IL-6 und CRP	42
3.2.5.	Korrelation mit Gestationsalter, Geburtsgewicht und Geschlecht	42
3.3.	Zink.....	46
3.3.1.	Infektions- und Kontrollgruppe im Vergleich	46
3.3.2.	Dynamik des Plasma-Zinks von Tag 1 zu Tag 3.....	46
3.3.3.	Korrelation mit den Inflammationsmarkern IL-6 und CRP	47
3.3.4.	Korrelation mit Gestationsalter, Geburtsgewicht und Geschlecht	47
3.4.	Kupfer/Zink-Koeffizient.....	50
3.4.1.	Assoziation der Spurenelemente Kupfer und Zink miteinander.....	50
3.4.2.	Infektions- und Kontrollgruppe im Vergleich	50
3.4.3.	Dynamik des Kupfer/Zink-Koeffizienten von Tag 1 zu Tag 3.....	50
3.4.4.	Korrelation mit den Inflammationsmarkern IL-6 und CRP	51
3.4.5.	Korrelation mit Gestationsalter, Geburtsgewicht und Geschlecht	52
3.4.6.	Eigenschaften des Cu/Zn-Koeffizienten als Biomarker	54
4.	Diskussion	59
4.1.	Schwächen der Studie	59
4.2.	Der Spurenelementstatus des Neugeborenen.....	59

4.2.1. Ceruloplasmin als Biomarker für den Plasma-Kupfer-Status bereits am Tag der Geburt	63
4.3. Konnatale Infektionen als Disruptoren des Spurenelementhaushaltes bei Neugeborenen.....	64
4.3.1. Kupfer	65
4.3.2. Zink	66
4.4. Potenzielle neue Biomarker bei konnatalen bakteriellen Infektionen	66
4.4.1. Kupfer, Ceruloplasmin und Zink	66
4.4.2. Kupfer/Zink-Koeffizient	67
4.5. Exkurs: mögliche adjuvante Therapiestrategien bei konnatalen bakteriellen Infektionen.....	68
4.6. Zusammenfassung	70
Literaturverzeichnis	72
Eidesstattliche Versicherung	78
Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen.....	79
Lebenslauf.....	81
Publikationsliste.....	82
Danksagung	83

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Der Circulus vitiosus zwischen niedrigem Zink-Status, der beeinträchtigten Immunkompetenz und der Infektion	24
Abbildung 2. Die Korrelation zwischen der Kupferkonzentration (Cu) und dem Ceruloplasmin (CP) im Blutplasma am Tag der Geburt (Tag 1) und Tag 3 nach der Geburt	40
Abbildung 3. Die Plasmakupferkonzentration (Cu) in der Kontroll- und der Infektionsgruppe am Tag der Geburt (Tag 1) und Tag 3 nach der Geburt	41
Abbildung 4. Die Korrelation zwischen Kupfer (Cu), Ceruloplasmin (CP) und den Inflammationsmarkern	44
Abbildung 5. Die Korrelation des Plasma-Kupfers (Cu) mit dem Gestationsalter	45
Abbildung 6. Die Plasmazinkkonzentration (Zn) in der Kontroll- und der Infektionsgruppe am Tag der Geburt (Tag 1) und Tag 3 nach der Geburt	46
Abbildung 7. Die Korrelation des Plasma-Zinks (Zn) mit den Inflammationsmarkern.....	47
Abbildung 8. Die Korrelation des Plasma-Zinks (Zn) mit dem Gestationsalter und dem Geburtsgewicht	49
Abbildung 9. Der Kupfer/Zink (Cu/Zn) - Koeffizient in der Kontroll- und der Infektionsgruppe am Tag der Geburt (Tag 1) und Tag 3 nach der Geburt	50
Abbildung 10. Die Korrelation des Kupfer/Zink (Cu/Zn) - Koeffizienten am Tag der Geburt (Tag 1) und Tag 3 nach der Geburt mit den Inflammationsmarkern in der Infektionsgruppe ...	51
Abbildung 11. Die Korrelation des Kupfer/Zink (Cu/Zn)-Koeffizienten am Tag der Geburt (Tag 1) mit dem Gestationsalter und dem Geburtsgewicht	53
Abbildung 12. Die ROC-Kurve für den Kupfer/Zink (Cu/Zn) - Koeffizienten als Biomarker für konnatale bakterielle Infektionen	55
Abbildung 13. Die Rolle der Spurenelemente Kupfer (Cu) und Zink (Zn) bei konnatalen bakteriellen Infektionen schematisch zusammengefasst	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Ein- und Ausschlusskriterien	32
Tabelle 2. Eigenschaften der Studienpopulation	38
Tabelle 3. Eigenschaften der Infektionsgruppe	39
Tabelle 4. Univariate Analyse für Kupfer als abhängige Variable	43
Tabelle 5. Univariate Analyse für Zink als abhängige Variable	48
Tabelle 6. Multinomiale logistische Regression zur Prüfung der Assoziation des erhöhten Kupfer/Zink-Koeffizienten und der Infektion mit dem Gestationsalter als Kovariate	54
Tabelle 7. Koordinaten der ROC-Kurve (siehe Abbildung 12) für den Kupfer/Zink (Cu/Zn) - Koeffizienten als Biomarker für konnatale bakterielle Infektionen	55
Tabelle 8. Kreuztabellenanalyse: hoher bzw. niedriger Kupfer/Zink (Cu/Zn) - Koeffizient in Abhängigkeit vom Vorliegen einer Infektion	57
Tabelle 9. Kreuztabellenanalyse: Kupfer/Zink (Cu/Zn) - Koeffizient $\geq 0,37$ bzw. $< 0,37$ in Abhängigkeit vom Vorliegen einer Infektion	58
Tabelle 10. Literaturvergleich: Kupfer-Konzentration im Blutplasma / Blutserum am Tag der Geburt	60
Tabelle 11. Literaturvergleich: Zink-Konzentration im Blutplasma / Blutserum am Tag der Geburt	61

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
ATP7B	Membranprotein, Kupfer-transportierende ATPase, auch das Wilson-Protein genannt
β	standardisierter Regressionskoeffizient
CP	Ceruloplasmin
CRP	C-reaktives Protein
Cu	Kupfer
CV	Variationskoeffizient (abgekürzt aus dem Englischen: Coefficient of variation)
EOS	Early-Onset-Sepsis
F-AAS	Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie (abgekürzt aus dem Englischen: flame atomic absorption spectrometry)
Fe	Eisen
GF-AAS	Atomabsorptionsspektrometrie mit Graphitrohrtechnik (abgekürzt aus dem Englischen: graphite furnace atomic absorption spectrometry)
GW	Gestationswochen
hCTR1	humanes Kupfertransportprotein 1 (abgekürzt aus dem Englischen: human copper transport protein 1)
IL-6	Interleukin-6
IQR	Interquartilbereich (abgekürzt aus dem Englischen: interquartile range)
KI	Konfidenzintervall
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OR	Quotenverhältnis (abgekürzt aus dem Englischen: Odds Ratio)

r	Korrelationskoeffizient nach Pearson
ROC-Kurve	Grenzwertoptimierungskurve (abgekürzt aus dem Englischen: Receiver Operating Characteristic)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (abgekürzt aus dem Englischen: reactive oxygen species)
ρ	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman
SLC30	Familie der Zink-exportierenden Proteine (abgekürzt aus dem Englischen: solute carrier 30, siehe auch ZnT)
SLC39A	Familie der Zink-importierender Proteine (abgekürzt aus dem Englischen: solute carrier 39A, siehe auch ZIP)
SD	Standardabweichung (abgekürzt aus dem Englischen: standard deviation)
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (abgekürzt aus dem Englischen: Sodium dodecyl sulfate)
SGA	zu klein bezogen auf das Gestationsalter (abgekürzt aus dem Englischen: small for gestational age)
TBS-T	Pufferlösung mit Tris als Puffersubstanz, Natriumchlorid und Triton X-100 (abgekürzt aus dem Englischen: Tris-buffered saline with Triton X-100)
TXRF	Totalreflexions-Röntgenfluoreszenz-Spektroskopie (abgekürzt aus dem Englischen: total reflection X-ray fluorescence)
WB	Western Blot
ZIP	ZRT-/IRT-ähnliche Proteine, Zink-Importer (siehe auch SLC39A)
Zn	Zink
ZnT	Zn-Transporter, Familie der Zink-exportierenden Proteine (siehe auch SLC30)

Abstrakt

Hintergrund: Kupfer (Cu) und Zink (Zn) sind essentielle Spurenelemente, die eine wichtige Rolle für die menschliche Gesundheit und insbesondere das Immunsystem und eine regelrechte Entwicklung spielen. Ein Cu- und/oder Zn-Mangel haben ein erhöhtes Risiko für Infektionskrankheiten zur Folge. Akute Infektionen führen wiederum zu Veränderungen im Spurenelementhaushalt bei erwachsenen Menschen und Tieren. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der konnatalen bakteriellen Infektionen auf die Plasma-Cu- und -Zn-Konzentrationen sowie den Cu/Zn-Koeffizienten als potentielle diagnostische Marker untersucht.

Methodik: Es wurde eine prospektive Fall-Kontroll-Studie auf den neonatologischen Stationen der Charité - Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Ein positives Votum der Ethikkommission lag vor. Eine Infektion wurde als das Auftreten mindestens eines klinischen Zeichens in Verbindung mit dem laborchemischen Nachweis einer Inflammation definiert. Für die Messungen wurden ausschließlich Restblutproben aus der Routinediagnostik verwendet. Die Plasma-Cu- und -Zn-Konzentrationen wurden mittels Röntgenfluoreszenzspektroskopie und das Plasma-Ceruloplasmin (CP) mittels Western Blot bestimmt.

Ergebnisse: Insgesamt wurden 21 Neugeborene mit Infektion und 23 Neugeborene aus der Kontrollgruppe in die Auswertung eingeschlossen. Die Plasma-Cu-Konzentration aller Neugeborenen betrug am Tag der Geburt (Tag 1) 522,8 [387,1 – 679,7] µg/L (Median [Interquartilbereich]) und die Plasma-Zn-Konzentration 1642,4 ± 438,1 µg/L (Mittelwert ± Standardabweichung). In der Kontrollgruppe korrelierten Cu und Zn signifikant positiv mit dem Gestationsalter. Dieser Zusammenhang bestand bei Neugeborenen mit Infektion nicht. Cu und CP korrelierten signifikant positiv miteinander an Tag 1 bei allen Neugeborenen und an Tag 3 bei Neugeborenen mit Infektion. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Plasma-Cu-Konzentration zwischen der Infektions- und der Kontrollgruppe. Bei Neugeborenen mit Infektion zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Plasma-Cu-Konzentration von Tag 1 zu Tag 3. Die Plasma-Zn-Konzentration war signifikant niedriger bei Neugeborenen mit Infektion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Cu/Zn-Koeffizient war in der Infektionsgruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Bei Neugeborenen mit Infektion zeigte sich keine Korrelation

zwischen dem Plasma-Cu, -Zn, oder dem Cu/Zn-Koeffizienten mit dem Interleukin-6 an Tag 1. Cu und der Cu/Zn-Koeffizient an Tag 1 und Tag 3 korrelierten signifikant positiv mit dem C-reaktiven Protein an Tag 3.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse der Pilotstudie weisen darauf hin, dass konnatale bakterielle Infektionen starke Disruptoren des Spurenelementhaushaltes bei Neugeborenen sind. CP war ein geeigneter Biomarker für den Plasma-Cu-Status bereits in den ersten Tagen nach der Geburt. Der niedrige Zn-Status der Neugeborenen mit Infektion könnte sowohl ein Risikofaktor für Infektionserkrankungen, als auch eine Folge der Inflammation sein. Der Cu/Zn-Koeffizient verbindet die gegensätzlichen Veränderungen der Spurenelemente während der Inflammation und ist ein möglicher neuer Biomarker für konnatale Infektionen.

Abstract

Background: Copper (Cu) and zinc (Zn) are trace elements essential for human health, in particular for the immune system and regular development. Deficiencies result in higher susceptibility to infectious diseases, while acute infections lead to altered trace element homeostasis in humans and animals. In the present work, the impact of connatal bacterial infections on plasma Cu, Zn and the Cu/Zn ratio as potential diagnostic markers were investigated.

Methods: A prospective observational case-control study was conducted on neonatal wards of the Charité - Universitätsmedizin Berlin after approval from the local ethics committee. An infection was defined as the presence of at least one clinical sign of infection combined with laboratory evidence for inflammation. Using residual blood volumes from routine analyses, plasma Cu and Zn concentrations were measured by total reflection X-ray fluorescence spectroscopy and plasma ceruloplasmin (CP) by Western blot analysis.

Results: In total, 21 infected and 23 control newborns were included for final analysis. The plasma Cu concentration of all neonates at birth (day 1) was 522.8 [387.1 – 679.7] µg/L (median [interquartile range]) and the plasma Zn concentration 1642.4 ± 438.1 µg/L (mean ± standard deviation). Cu and Zn were positively correlated with gestational age in the control, but not in the infection group. Cu and CP showed a positive correlation on day 1 in all newborns and on day 3 in infected neonates. There was no significant difference between the plasma Cu concentrations in the infection and the control group. In the infection group Cu increased significantly from day 1 to day 3. Zn was significantly lower in infected than in control neonates. The Cu/Zn ratio was significantly higher in the infection compared with the control group. In infected neonates there was no significant correlation of the plasma Cu, Zn or the Cu/Zn ratio with interleukin 6 on day 1. Cu and the Cu/Zn ratio on day 1 and day 3 correlated positively with C-reactive protein on day 3.

Conclusion: The pilot study indicates that connatal bacterial infections disrupt the newborn's trace element homeostasis. CP may serve as a suitable biomarker of plasma Cu status already in the first days of life. The low Zn status of infected neonates may be

both a risk factor contributing to the infection susceptibility and a consequence of the inflammation. The Cu/Zn ratio combines the opposite alterations of the micronutrients upon inflammation and may constitute a possible new biomarker of connatal infections.

1. Einleitung

1.1. Essentielle Spurenelemente

Essentielle Spurenelemente sind chemische Elemente, die nur in geringen Konzentrationen (Massenanteil $<0,01\%$ [3]) in einem Organismus vorkommen, jedoch für die Erhaltung wichtiger Zellfunktionen und somit für das Überleben und eine regelrechte Entwicklung unentbehrlich sind. Zu den für den Menschen essentiellen Spurenelementen gehören Kupfer (Cu), Zink (Zn), Selen (Se), Eisen (Fe), Iod (I), Chrom (Cr), Cobalt (Co), Mangan (Mn), Molybdän (Mo) [3-5] und laut manchen Autoren auch Vanadium (V) und Fluor (F) [3,6]. Das Wissen über die Spurenelemente stieg dank neuer analytischer Methoden innerhalb der letzten zwei Jahrzehnte bedeutend an. Die Forschungsergebnisse zeigten den zuvor nicht bekannten hohen Stellenwert der Spurenelemente für die menschliche Gesundheit sowie deren Einfluss auf die Entwicklung von Erkrankungen mit großer sozioökonomischer Bedeutung auf [4]. Sowohl eine zu geringe Zufuhr, als auch ein Überschuss dieser Mikroelemente führen zur Entstehung von Erkrankungen. In dieser Arbeit wird die Funktion von Cu und Zn für die menschliche Gesundheit beschrieben und deren Rolle und Konzentrationsveränderungen in einer besonderen Population und einem bisher wenig erforschten Kontext - bei Neugeborenen mit früher Infektion („Early-Onset-Infektion“) - untersucht.

1.2. Kupfer und Zink

Cu und Zn sind ubiquitär natürlich vorkommende Übergangsmetalle [7,8], die in die 4. Periode des Periodensystems der Elemente eingeordnet werden. Übergangsmetalle haben niedrige Ionisierungsenergien und kommen in mehreren Oxidationszuständen oder als positiv geladene Ionen vor [7].

Die Hauptquellen von Cu und Zn sind Nahrung und Trinkwasser [6,8]. Cu ist unter anderem in Nüssen, Vollgetreide, Samen, dunkler Schokolade und Leber enthalten [6]. Zn-reiche Nahrungsquellen sind tierische Lebensmittel, wie rotes Fleisch, Geflügel, Meeresfrüchte, Milchprodukte sowie Vollkorngetreide, Hülsenfrüchte und Nüsse [6]. Die

Verfügbarkeit der Spurenelemente in der Nahrung wird durch die Konzentration der Mikroelemente im Erdboden beeinflusst, sodass in manchen geographischen Zonen eine Supplementierung der Spurenelemente angeraten wird [6]. Der Vertrieb und die teilweise nicht ärztlich kontrollierte Supplementierung der Spurenelemente in Form von nicht verschreibungspflichtigen Nahrungsergänzungsmitteln nahm in den letzten Jahren deutlich zu, wodurch das Risiko für die Einnahme toxischer Dosen anstieg [9].

Die Festlegung der Grenzwerte für die empfohlene alimentäre Zufuhr der essentiellen Spurenelemente hat eine hohe Priorität und muss sowohl die ernährungswissenschaftlichen Richtwerte zur Vermeidung der Defizienz, als auch die toxikologische Risikobewertung, aber auch verschiedene Aspekte des Metabolismus berücksichtigen [4,9]. Die aktuellen Empfehlungen der Spurenelementzufuhr können mehreren Publikationen entnommen werden: Für Neugeborene und Säuglinge im Alter von 0 bis 6 Monaten wird die Zufuhr von 0,2 mg Cu und 2 mg Zn pro Tag [3] und für Erwachsene die Zufuhr von 0,9 – 2,0 mg Cu [3,6,10] und 8 (für Frauen) – 11 (für Männer) mg Zn pro Tag [3,6] empfohlen.

Cu ist das dritthäufigste Spurenelement im menschlichen Organismus mit einem Gesamtkörperbestand von 80 - 150 mg beim Erwachsenen [3,6]. Die Cu-Konzentration im Blutplasma beträgt bei Erwachsenen 10 – 22 $\mu\text{mol/L}$ (635,5 – 1398 $\mu\text{g/L}$) [11] und bei Neugeborenen 4,6 – 7,2 $\mu\text{mol/L}$ (289,8 – 457,5 $\mu\text{g/L}$) [12-14].

Zn ist nach Fe das zweithäufigste Spurenelement beim Menschen. Der Gesamtkörperzinkbestand beträgt beim Erwachsenen 1,4 – 3,0 g [6,15]. Die normale Zn-Konzentration im Blutplasma beträgt bei Erwachsenen 12 – 18 $\mu\text{mol/L}$ (784,6 – 1176,8 $\mu\text{g/L}$) [11] und bei Neugeborenen 14,2 – 19,7 $\mu\text{mol/L}$ (926,4 – 1288 $\mu\text{g/L}$) [12,14,16,17].

1.2.1. Metabolismus

Die Homöostase von Cu und Zn wird durch mehrere Mechanismen reguliert. Die Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt hängt von der Zusammensetzung der Nahrung ab und wird je nach Spurenelementstatus im Organismus sowie nach physiologischem Bedarf reguliert [1,18,19].

Die Cu-Absorption durch die intestinale Mukosa wird zum Beispiel durch die Zufuhr von Proteinen und Präbiotika (zum Beispiel Inulin) sowie bei Cu-Defizienz gesteigert [8,18] und durch erhöhte enterale Zufuhr von Zn, Phytat und einfachen Zuckern (zum Beispiel Fruktose) vermindert [8]. Die Aufnahme in die Enterozyten erfolgt hauptsächlich durch das humane Kupfertransportprotein 1 (hCTR1) [18]. Auf zellulärer Ebene wird die Cu-Homöostase durch weitere membranständige Import- und Exportproteine sowie durch zytosolische Proteine wie Metallothioneine, Glutathion und Metallochaperone aufrecht erhalten [8,18]. Cu wird hauptsächlich in der Leber gespeichert [8,18]. In Hepatozyten wird Cu teilweise über das transmembranäre ATP7B-Protein im trans-Golgi-Netzwerk in das Ceruloplasmin inkorporiert und in das Blut oder die Galle freigesetzt [18]. Im Blut ist Cu an Ceruloplasmin (40 – 70%), Albumin und andere Plasmaproteine gebunden [20]. Ceruloplasmin (CP) wird in der Leber synthetisiert und ist ein multifunktionales Protein. Als das wichtigste Transportprotein für Cu, ist CP eine zirkulierende Cu-Quelle für Zellen [20]. Des Weiteren ist es als eine Ferroxidase am Eisenstoffwechsel beteiligt und trägt zum antioxidativen Abwehrsystem bei [20,21]. Außer im Blutplasma befindet sich CP auch in zerebrospinalen und intestinalen Flüssigkeiten, Muttermilch und Fruchtwasser [20]. Die Konzentrationen von Cu und CP im Blutserum oder -plasma werden als Biomarker für den Cu-Status eines Organismus verwendet und sind als Akute-Phase-Reaktanten bekannt [1,18,21]. Die Ausscheidung vom überschüssigen Cu erfolgt über biliäre Exkretion und den Stuhl [8,18].

Die Zn-Absorption wird durch Phosphate, Phytat sowie hohe Konzentrationen anderer bivalenten Kationen in der Nahrung gesenkt [19]. Der Import von Zn in das intrazelluläre Zytoplasma erfolgt durch die Transporter der ZIP-Familie (ZRT-/ IRT-ähnliche Proteine, SLC39A, 14 Isoformen) und der Export in den extrazellulären Raum durch die Proteine der ZnT-Familie (Zn-Transporter, SLC30, 10 Isoformen) [7,22]. Die Regulation der Transporter erfolgt unter anderem durch Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Proteolyse sowie auf der transkriptionellen und translationellen Ebene [22].

85% des Gesamtzinkbestandes eines Menschen befindet sich in Muskeln und Knochen sowie 11% in der Haut und Leber [15]. Der größte Teil (ca. 99%) liegt intrazellulär vor [23] und wird dort durch Metallothioneine, die als ein intrazelluläres Zink-Reservoir fungieren, gebunden [7,22]. Im Blutplasma befindet sich nur ca. 1% des Gesamtkörperbestandes von Zn [23], das dort an Albumin, α 2-Makroglobulin und andere große Plasmaproteine gebunden vorliegt [15]. Nach Reduktion der Zn-Zufuhr

bleibt die Plasma-Zn-Konzentration für ca. 4 – 5 Monate stabil [3]. Ein Überschuss an Zn resultiert in verminderter gastrointestinaler Absorption sowie erhöhter Ausscheidung [24]. Die Zn-Exkretion erfolgt über die pankreatischen, biliären und intestinalen Sekrete. Ein großer Teil des endogenen intestinalen Zn wird wieder resorbiert, der Rest wird mit dem Stuhl ausgeschieden [23,25]. Des Weiteren wird Zn über die proximalen Tubuli der Niere mit dem Urin sowie durch Schweiß, Desquamation der Haut und Haarverlust ausgeschieden [23,25].

1.2.2. Funktionen im menschlichen Organismus

Cu und Zn spielen eine wichtige Rolle für die Differenzierung, den Metabolismus und das Überleben der Zellen verschiedener Organsysteme. Sie sind strukturelle, katalytische und co-katalytische Bestandteile zahlreicher Enzyme [3,7,8].

Beide Elemente sind erforderlich für die Zellatmung - Cu als Bestandteil der Cytochrom-c-Oxidase und Zn als ein Teil der Carboanhydrase [7,8]. Cu und Zn sind für die Funktion des antioxidativen Abwehrsystems unentbehrlich. Sie sind notwendig für die Biosynthese der Superoxiddismutase (Cu und Zn), Katalase (Cu) und Metallothioneine (Cu, Zn), die den Schutz gegen radikale Sauerstoffspezies gewährleisten [8,15,21]. Beide Elemente spielen eine wichtige Rolle im zentralen Nervensystem. Cu beeinflusst die synaptische Transmission, indem es die Funktion des GABA_A- und des NMDA-Rezeptors moduliert [26] und ist am Metabolismus von Neurotransmittern und neuroendokrinen Peptiden (zum Beispiel Katecholaminen) beteiligt [8]. Zn hat die Funktion eines Neurotransmitters beziehungsweise Cotransmitters und ist für kognitive Funktionen von großer Bedeutung [7,15]. Die Entstehung des Bindegewebes und des Knochens ist von einer regelrechten Cu- und Zn-Homöostase abhängig: Cu ist am Crosslinking von Kollagen und Elastin beteiligt (Lysyloxidase) [8] und Zn spielt eine wichtige Rolle für die Mineralisierung des Knochens [15].

Die regelrechte Zn-Homöostase ist kritisch für Wachstum, DNA-Synthese, RNA-Transkription und die Regulation der Zellapoptose [3]. Zn ist ein kritischer Bestandteil von Zink-Finger-Proteinen, die eine große Familie von Nukleinsäure-bindenden Proteinen darstellen und eine wichtige Rolle in der Regulation der Transkription sowie für die Struktur der Hormonrezeptoren spielen [3,15]. Der Metabolismus einiger Hormone ist vom Zn-Status abhängig: das Element ist zum Beispiel für die Funktion der Schilddrüse, die Wachstumshormon-Biosynthese in der Hypophyse und die

Testosteron-Sekretion von Bedeutung [15]. Zn spielt eine wichtige Rolle für die Fruchtbarkeit und Fortpflanzung, indem es die Funktion der Prostata und die Produktion der Samenzellen beeinflusst [15].

Cu und Zn sind essentiell für die regelrechte fetale Entwicklung, insbesondere die Differenzierung und Reifung des Nerven- und des Immunsystems [1,15,18,21]. Die außerordentlich wichtige Rolle dieser Elemente für das menschliche Immunsystem wird im folgenden Kapitel dargelegt.

1.2.3. Kupfer, Zink und das Immunsystem

Viele Funktionen des angeborenen und adaptiven Immunsystems sind von der ausreichenden Zufuhr von Cu und Zn abhängig. Zum angeborenen Immunsystem gehören die unspezifischen Abwehrmechanismen: die Haut- und Schleimhautbarriere, das Komplementsystem sowie die phagozytierenden Zellen (zum Beispiel Monozyten/Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile, Basophile und natürliche Killerzellen) [27,28]. Das adaptive Immunsystem umfasst die nach Konfrontation mit Pathogenen entstehenden, also erworbenen und spezifischen Abwehrmechanismen: die T-Lymphozyten und die zellvermittelte Immunantwort sowie die B-Lymphozyten und die Antikörperproduktion [27,28]. Die Interaktion der Bestandteile des angeborenen und adaptiven Immunsystems wird durch dendritische Zellen, Zytokine (zum Beispiel Interleukine, Interferone, koloniestimulierende Faktoren und Tumornekrosefaktoren) und Antikörper (Immunglobuline) vermittelt [29].

Cu spielt eine wichtige Rolle für die Differenzierung und die Funktion von Neutrophilen und Monozyten [30]. Eine häufige Folge der Cu-Defizienz bei Kindern und Erwachsenen ist eine Neutropenie [27,28]. Mögliche Ursachen der verminderten Neutrophilenzahl bei Cu-Mangel sind eine Hemmung der Granulozytenreifung im Knochenmark, eine reduzierte Lebensdauer der zirkulierenden Zellen oder Bildung der Anti-Neutrophilen-Antikörper [27]. Auch die Funktion der Neutrophilen, der Makrophagen und der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) scheint vom Cu-Status abhängig zu sein. Die Fähigkeit dieser Zellen, Superoxidanione zu bilden und phagozytierte Mikroorganismen beziehungsweise pathologische Zellen zu zerstören, war bei Cu-defizienten Tieren reduziert [27,28]. Cu-Mangel führte im Tiermodell zu einer reduzierten T-Lymphozyten-Zahl, wobei vor allem die CD4-positiven Helferzellen

betroffen waren, sowie zu einer verminderten Produktion von Interleukin-2 (IL-2) durch aktivierte T-Zellen, welches wiederum für die regelrechte T-Zell-Proliferation notwendig ist [28]. Die B-Lymphozytenzahl war in Cu-defizienten Tieren erhöht oder unverändert und die Antikörperproduktion in der Milz reduziert [28].

Ähnlich wie Cu ist Zn ebenfalls für die Differenzierung und Funktion der Zellen sowohl der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort, aber auch für andere schnell proliferierende Zellen von großer Bedeutung [7,30]. Zn spielt eine große Rolle für die Erhaltung der epithelialen Barrierefunktion der Haut, der Schleimhäute sowie für die Wundheilung [15,30]. Es stabilisiert und reguliert immunologisch relevante Transkriptionsfaktoren [19]. Zn ist an der Reifung der Phagosomen und Endosomen beteiligt und beeinflusst die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies durch Phagozyten [7]. Daraus resultiert die Reduktion der Phagozytose-Aktivität und der Destruktion der phagozytierten Pathogene bei Zn-Defizienz [7,19]. Zn moduliert die Differenzierung und Zytotoxizität der NK-Zellen [7]. Ein Zn-Mangel kann zu unspezifischer Aktivierung der NK-Zellen führen, weil deren Inhibition Zn-abhängig abläuft [19]. Zn ist wichtig für die Biosynthese und die Signaltransduktion proinflammatorischer Zytokine (Interleukin-1 β , Interleukin-6, Tumornekrosefaktor- α und Interferon- γ) [7,19]. Es moduliert die Reifung dendritischer Zellen und die nachfolgende Aktivierung des adaptiven Immunsystems [7,19]. Die T-Lymphozyten reagieren besonders vulnerabel auf einen Zn-Mangel. Zn ist ein essentieller Co-Faktor für das Hormon Thymulin, das durch das Thymus-Epithel sezerniert wird und die T-Zell-Differenzierung und -Proliferation beeinflusst [19,30]. Das Element ist essentiell für die Balance zwischen den Typ 1- und Typ 2-T-Helferzellen und viele zytokinvermittelte T-Zell-Funktionen [3,7]. Eine Zn-Defizienz führt zur Thymusatrophie, T-Zell-Lymphozytopenie und zu einer beeinträchtigten T-Zell-Funktion [7]. Erhöhte Zn-Spiegel resultieren wiederum in einer Inhibition der T-Zell-Funktion, was eine Rolle in der Hemmung der Alloreaktivität spielt [19]. B-Lymphozyten reagieren in einem geringen Ausmaß auf die Änderungen des Zn-Haushaltes [7]. Ein Zn-Mangel führt zu einer reduzierten B-Zell-Zahl und beeinflusst die Antikörperproduktion [7].

Insgesamt führt eine Cu- und Zn-Defizienz zu einer Beeinträchtigung der Immunkompetenz und damit zu einer erhöhten Suszeptibilität für infektiöse Erkrankungen [1,7,18,21,31].

1.2.4. Kupfer- und Zink-Mangel

Eine erworbene Cu- und Zn-Defizienz ist ein häufiges und unterdiagnostiziertes Problem in der Gesamtpopulation in einem deutlich größeren Ausmaß als ein Exzess dieser Mikroelemente [8,18]. Der Cu- und Zn-Mangel ist assoziiert mit Erkrankungen mit großer sozioökonomischer Bedeutung.

Circa 25% der Population zwischen dem Adoleszenz- und dem Seniorenalter erreicht nicht die empfohlene diätetische Cu-Zufuhr [8]. Ein Cu-Mangel ist assoziiert mit einem verändertem Glucose-Metabolismus und Diabetes mellitus [21,28]. Dies ist möglicherweise auf die gestörte Ferroxidase-Aktivität und die daraus resultierende Fe-Akkumulation im Pankreas zurückzuführen [21]. Veränderungen im Cu-Haushalt tragen zur Entstehung kardiovaskulärer und hämatologischer Erkrankungen bei [28]. Das Herz und die Blutgefäße reagieren sensibel auf einen Cu-Mangel, der zu Vergrößerung der Myozyten, Störung der mitochondrialen Zellatmung, Veränderungen der Kontraktilität des Herzmuskels, Pathologien der Architektur der elastischen Fasern der Blutgefäße und verändertem Lipid-Stoffwechsel führen kann [21]. Cu-Defizienz und eine gestörte Funktion der Cu-abhängigen Enzyme resultieren in hypertropher Kardiomyopathie, Veränderungen im Elektrokardiogramm, Rissen und Ruptur der Aorta sowie Blutdruckveränderungen [21]. Ein niedriger Cu-Status spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Anämien, Knochenveränderungen [28] und Beeinträchtigungen verschiedener Bestandteile des Immunsystems (siehe Abschnitt 1.2.3. *Kupfer, Zink und das Immunsystem*). Ein Cu-Mangel während der Schwangerschaft kann zum embryonalem Tod, strukturellen Anomalien und bleibenden neurologischen und immunologischen Veränderungen führen [21].

Eine Zn-Defizienz betrifft schätzungsweise über 25% der Weltbevölkerung [7]. Laut eines Berichts der World Health Organization (WHO) aus dem Jahr 2009 stand der Zn-Mangel auf dem zehnten Platz der Rangliste der wichtigsten Gesundheitsrisikofaktoren in Ländern mit geringem Einkommen [32]. Eine der wichtigsten Folgen einer chronischen, schweren und unbehandelten Zn-Defizienz ist die Immunschwäche (siehe Abschnitt 1.2.3. *Kupfer, Zink und das Immunsystem*), die zu fatal verlaufenen Infektionen führen kann [7]. Bei Kindern unter dem 5. Lebensjahr ist die Zn-Defizienz geschätzt für ca. 13% der Infekte des unteren Respirationstraktes, 10% der Malaria-

Episoden und 8% der Diarrhö-Episoden weltweit verantwortlich [32]. Ein chronischer Zn-Mangel führt außerdem zu Wachstumsstörungen, Appetitlosigkeit, Diarrhö, Gewichtsverlust, Alopezie, Dermatitis, Gerinnungsstörungen und beeinträchtigter Wundheilung [3,7]. Weitere Folgen sind emotionale und neurosensorische Veränderungen, beeinträchtigte kognitive Funktion und Hypogonadismus [3]. Patienten mit Zn-Defizienz sind prädisponiert, neoplastische und autoimmune Erkrankungen zu entwickeln [3]. Die erhöhte Biosynthese proinflammatorischer Mediatoren auf Grund chronischer Zn-Mangelzustände fördert Autoimmunprozesse und beeinflusst damit den Verlauf einiger inflammatorischer Erkrankungen, wie zum Beispiel der rheumatoiden Arthritis [7]. Ein niedriger Zn-Status ist assoziiert mit erhöhter Prävalenz von Arteriosklerose, koronarer Herzkrankheit, Insulinresistenz und Diabetes mellitus [15]. Niedrige Plasma-Zn-Werte während der Schwangerschaft sind mit einem erhöhten Risiko für Frühgeburtlichkeit und Abort verbunden [19].

1.2.5. Kupfer- und Zink-Exzess

Eine Cu-Toxizität wird selten beobachtet. Unter normalen Bedingungen sind die Cu-Mengen in der Nahrung und im Wasser relativ gering, sodass die Kontrollmechanismen der Cu-Homöostase einen Cu-Exzess durch verminderte Resorption oder erhöhte Exkretion verhindern können [33]. Die Cu-Toxizität kann jedoch aus exzessiver Zufuhr durch Unfälle oder in suizidaler Absicht, aus Umweltverschmutzung, aus Akkumulation in Organen durch angeborene Störungen des Cu-Metabolismus (Morbus Wilson, Menkes-Syndrom) oder aus einer Nebenniereninsuffizienz resultieren [18,21,33]. Die toxische Wirkung bei Cu-Exzess wird auf die Beteiligung des Elements an Redox-Reaktionen und die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zurückgeführt [8,21]. Übersteigt die Produktion der ROS die Kompensationsmechanismen des antioxidativen Abwehrsystems, kommt es zur Modifikation von Proteinen, Peroxidierung von Lipiden und DNA-Schädigung, die wiederum zu Gewebeschäden und zur Entstehung von degenerativen und malignen Erkrankungen führen können [33]. Eine einmalige hohe orale Dosis von Cu verursacht gastrointestinale Symptome wie Übelkeit, Erbrechen und Diarrhö [4,18]. Bei exzessiv hohen Dosen sind weitere Folgen wie zum Beispiel Kopfschmerzen, Lethargie, Tachykardie, Atemstörung, hämolytische Anämie, Leber- und Nierenfunktionsstörung sowie der Tod möglich [21]. Ein chronischer Cu-Überschuss führt zur Leberschädigung und Entstehung einer Leberzirrhose und

beeinflusst negativ den Zn-Status des Organismus [3,8,18]. Das am besten erforschte Beispiel der Toxizität durch einen schweren Cu-Exzess ist der Morbus Wilson, eine autosomal-rezessive Erkrankung, die durch eine Mutation des ATP7B-Gens verursacht wird [18,21]. Die Erkrankung ist durch eine Cu-Akkumulation in der Leber, im Gehirn und in der Hornhaut (Kayser-Fleischer-Ring) sowie durch geringe Cu- und CP-Spiegel im Blutplasma charakterisiert [18]. Die von Morbus Wilson betroffenen Personen leiden unter einer chronischen Leber- und Nierenfunktionsstörung, neurologischen und psychiatrischen Symptomen sowie Veränderungen des hämatologischen und skelettalen Systems [18].

Die toxischen Wirkungen bei Zn-Überschuss sind bisher nicht ausreichend erforscht [3]. Die akute Toxizität von Zn wird beim Menschen nur selten beobachtet. Die bisher bekannten Fälle resultierten aus Verzehr von Nahrungsmitteln, die in verzinkten Gefäßen aufbewahrt wurden, aus akzidenteller Einnahme exzessiver Zn-Mengen oder aus Inhalation von Zinkoxiddämpfen [24]. Wenn die Kapazität der Kontrollmechanismen der Zn-Homöostase überschritten wird, wirkt die Akkumulation der Zn-Ionen durch deren Einfluss auf das Redox-System und die Interaktion mit verschiedenen Proteinen schädigend auf die Zellen, beeinflusst die Membranpermeabilität und führt zur Aktivierung der Apoptose [3,7,15]. Eine einmalige hohe orale Dosis von Zn verursacht ähnlich wie bei Cu gastrointestinale Symptome [4]. Ein chronischer Zn-Überschuss führt zur sideroblastischen Anämie, zur beeinträchtigten Immunfunktion mit Leukopenie sowie zu Veränderungen im Lipoprotein-Metabolismus [7,24]. Bei Arbeitern der Zn-schmelzenden Industrie wurde die Entwicklung einer Myeloneuropathie mit Parästhesien, taktiler Allodynie und taktilen Halluzinationen beobachtet [3]. Im Rahmen mehrerer Studien wurde die Rolle des Zn in der Entwicklung der Alzheimer-Demenz diskutiert [3]. Des Weiteren führt ein chronischer Zn-Exzess zu einer sekundären Cu-Defizienz und einer verminderten Aktivität Cu-abhängiger Enzyme [4,24].

1.2.6. Veränderungen im Spurenelementhaushalt während akuter Infektionserkrankungen

Akute Infektionserkrankungen führen zu Veränderungen im Spurenelementhaushalt im Rahmen der Akute-Phase-Reaktion. Cu und Zn zeigen dabei gegenläufige Veränderungen. Die Plasma-Cu-Konzentration steigt [18,34,35] und die Plasma-Zn-Konzentration sinkt [11,15,21,36,37] während einer akuten Inflammation bei erwachsenen Menschen und Tieren.

Die Ursache für die steigenden Plasma-Cu-Konzentrationen ist die erhöhte CP-Biosynthese in der Leber und dessen Freisetzung in den Blutkreislauf [34,35]. Das nicht an CP gebundene freie Cu im Blutserum zeigte während einer Inflammation bei Raten nur geringfügige Veränderungen [34]. Bei chronischer Inflammation zeigte sich im Tierversuch trotz der erhöhten Produktion und Freisetzung des CP in den Blutkreislauf keine Cu-Depletion in der Leber und anderen Geweben [34].

Während einer Inflammation ist die Leber ebenfalls das Hauptorgan der Zn-Regulation [24,38]. Es kommt zur Redistribution des Zn vom Blutplasma in die Leber, die am ehesten durch Interleukin-1 und durch Glucocorticoide vermittelt wird [38]. Es kommt zur Induktion der Zn-Metallothioneine, die Zn mit hoher Affinität binden und für dessen Speicherung und Freisetzung verantwortlich sind [24,38]. Die Senkung des Plasma-Zn im Rahmen der negativen Akute-Phase-Reaktion führt zur verminderten Verfügbarkeit des Zn für die Immunzellen. Auf Grund der oben beschriebenen Auswirkungen des Zn-Mangels auf die Immunkompetenz (siehe Kapitel 1.2.3. *Kupfer, Zink und das Immunsystem*), kann dies zur Entstehung eines Circulus vitiosus zwischen niedrigem Zn-Status, der Infektsuszeptibilität und der Infektion führen [1] (Abbildung 1).

Die oben beschriebenen Studienergebnisse zu Veränderungen im Spurenelementhaushalt während inflammatorischer Erkrankungen liegen bisher nur für erwachsene Menschen und Tiere vor. Für Neugeborene existieren hierzu bislang kaum wissenschaftliche Daten.

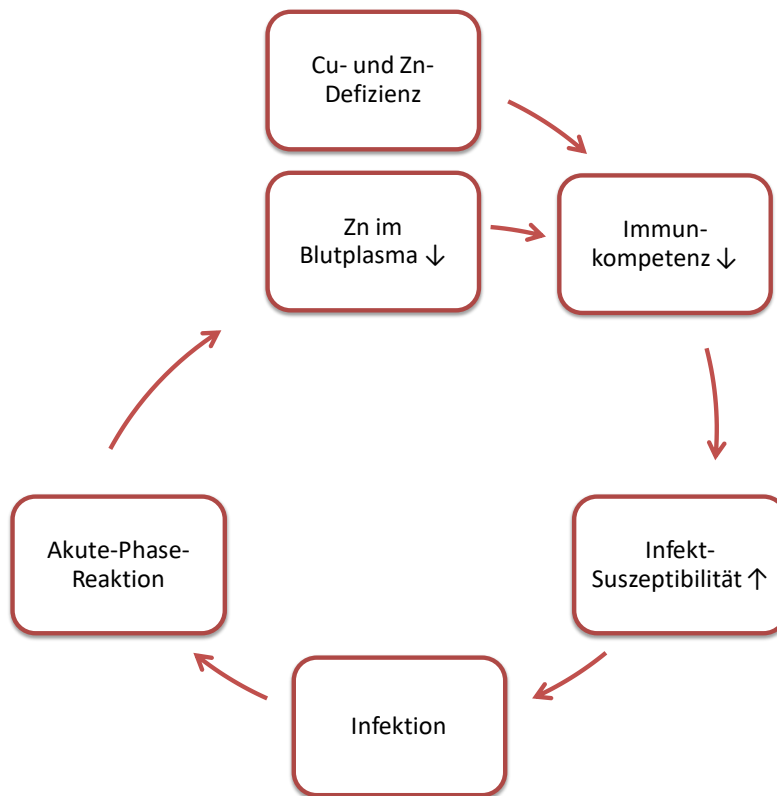


Abbildung 1. Der Circulus vitiosus zwischen niedrigem Zink-Status, der beeinträchtigten Immunkompetenz und der Infektion. Eine Defizienz der essentiellen Spurenelemente Kupfer (Cu) und Zink (Zn) führt zur Beeinträchtigung des angeborenen und adaptiven Immunsystems und damit zur erhöhten Infektusstabilität. Die dadurch begünstigt auftretenden Infektionen lösen eine Akute-Phase-Reaktion aus, die bei erwachsenen Menschen und Tieren wiederum zur Redistribution des Zn vom Blutplasma in die Leber und somit zu sinkenden Plasma-Zn-Konzentrationen führt. Die dadurch verminderte Verfügbarkeit von Zn für die Immunzellen kann zur Entstehung eines selbstverstärkenden Kreislaufes zwischen niedrigem Zn-Status, der beeinträchtigten Immunkompetenz und der Infektion führen. Neu- und Frühgeborene haben ein erhöhtes Risiko für eine Cu- und Zn-Defizienz. Für diese Gruppe liegen jedoch bisher kaum Studienergebnisse zu Veränderungen im Spurenelementhaushalt während akuter Infektionen vor.

Neugeborene und insbesondere Frühgeborene stellen eine besonders vulnerable Gruppe dar, die durch ein erhöhtes Risiko für die Cu- und Zn-Defizienz auf Grund des schnellen Wachstums und des dadurch erhöhten Bedarfes an diesen Spurenelementen charakterisiert ist [1,12,18]. Cu akkumuliert erst kurz vor der Geburt in der kindlichen Leber, um eine Reserve des Elements zu bilden, sodass die Cu-Defizienz bei Frühgeborenen besonders häufig auftritt [3]. Auf Grund des oben geschilderten Einflusses der Spurenelementhomöostase auf das Immunsystem und die Entstehung von Infektionen (siehe Kapitel 1.2.3. *Kupfer, Zink und das Immunsystem*), könnten diese Beobachtungen eine wichtige Rolle für die Pathogenese, die Diagnostik und möglicherweise auch die adjuvante Therapie der neonatalen Infektionen spielen.

1.3. Neonatale Early-Onset-Infektionen

1.3.1. Definition und Epidemiologie

Die vorliegende Arbeit untersucht den Spurenelementhaushalt bei Neugeborenen mit bakteriellen Early-Onset-Infektionen. Diese sind definiert als Infektionen, die innerhalb der ersten 72 Stunden nach der Geburt symptomatisch werden [39]. Sie resultieren aus der vertikalen Transmission von Bakterien von der Mutter auf das Kind, die durch Aszension vom anogenitalen Trakt der Mutter mit Kontamination der Zervix, der Amnionflüssigkeit oder der Plazenta erfolgt [40,41]. Die Übertragung der Pathogene kann entweder während des Geburtsvorganges nach dem Blasensprung oder bereits intrauterin auf Grund einer Chorioamnionitis stattfinden [40].

Zu den Risikofaktoren für die Entwicklung einer Early-Onset-Infektion beim Neugeborenen zählen eine vaginale Kolonisation der Mutter mit B-Streptokokken, ein vorzeitiger Blasensprung (≥ 18 Stunden vor Geburt), eine Frühgeburt (< 37 Gestationswochen), Fieber der Mutter während der Geburt ($> 38^\circ\text{C}$), erhöhte Entzündungswerte der Mutter (C-reaktives Protein (CRP) > 20 mg/L, Leukozyten $> 15.000/\text{mm}^3$) und eine antibiotische Behandlung der Mutter während oder im Zeitraum von 24 h vor oder nach der Geburt [40-45].

Trotz der Einführung der intrapartalen Antibiotika-Prophylaxe sind die Streptokokken der Gruppe B noch immer die häufigste Ursache der Early-Onset-Sepsis (EOS). In Frühgeborenen mit Sepsis ist *Escherichia coli* das häufigste Pathogen [41]. Die B-Streptokokken und *Escherichia coli* zusammen verursachen insgesamt ca. 70% aller EOS-Fälle [40,41]. Zu den weiteren Erregern der EOS zählen *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, Enterokokken, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa* [41,46]. Polymikrobielle Infektionen sind selten (1,6% aller EOS-Fälle) [46].

Die Inzidenz der EOS mit Erregernachweis im Blut oder Liquor beträgt in Europa und in den USA 0,05 bis 0,12 % aller Lebendgeburten [40,43,47,48]. Besonders gefährdet sind Frühgeborene mit einem sehr niedrigem Geburtsgewicht < 1500 g (vom Englischen: very low birth weight, abgekürzt VLBW), für diese Gruppe beträgt die Inzidenz ca. 1,5 %

[43]. In Südasien, Südamerika und Subsahara-Afrika wurden im Rahmen einer Metaanalyse im Jahr 2012 insgesamt ca. 6,9 Millionen Fälle von schweren bakteriellen Infektionen bei Neugeborenen angenommen, was einer kumulativen Inzidenz von 7,6% entspricht [49].

1.3.2. Diagnostik

In dem aktuellen diagnostischen Algorithmus werden mütterliche und kindliche Risikofaktoren (siehe Abschnitt 1.3.1. *Definition und Epidemiologie*) sowie klinische Indizien berücksichtigt.

Die Symptome einer Infektion bei Neugeborenen sind unspezifisch [41], sodass die Diagnosestellung häufig schwierig ist. Dazu gehören: Lethargie, Fütterstörungen, Störung der Temperaturregulation (Hypothermie, seltener Fieber), respiratorische Symptome mit Apnoe, Tachypnoe, interkostalen Einziehungen, Nasenflügeln und Knorksen (expiratorischem Stöhnen) sowie kardiale Symptome mit verlängerter Rekapillarierungszeit, arterieller Hypotonie, Bradykardie und Zyanose [40].

Zu den etablierten Laboruntersuchungen gehören die Bestimmung des Differentialblutbildes (insbesondere Leukozytenzahl, Neutrophilenzahl und Verhältnis der unreifen zu Gesamtneutrophilen), der Inflammationsmarker Interleukin-6 (IL-6) und C-reaktives Protein (CRP) sowie die Abnahme der Blutkulturen [41,50,51]. Die Möglichkeit der Isolation der Bakterien aus den Blutkulturen wird durch die geringen verfügbaren Blutvolumina und die zum Teil geringe Bakteriämie limitiert [1,41,51], sodass die Sensitivität und Spezifität der Blutkulturen als diagnostisches Mittel gering sind [45]. Ein Erregernachweis ist deswegen zur Diagnosestellung einer Early-Onset-Infektion nicht zwingend erforderlich [52]. Insgesamt erlauben die bisher zur Verfügung stehenden diagnostischen Mittel keine ausreichende Spezifität [51], sodass die empirische antibiotische Therapie häufig unnötig eingeleitet werden muss.

1.3.3. Therapie

Zurzeit besteht die therapeutische Strategie aus frühzeitiger empirischer Gabe von Antibiotika bereits bei klinischem Verdacht einer neonatalen Infektion [1,53]. Als kalkulierte Antibiose wird häufig die Kombination von Ampicillin und Gentamicin eingesetzt [40]. Bei der Wahl der Therapie ist jedoch immer die individuelle Anamnese

(insbesondere die antibiotische Vorbehandlung der Mutter) sowie die aktuelle ortsspezifische Epidemiologie zu berücksichtigen, sodass keine einheitliche Empfehlung ausgesprochen werden kann [43].

Einerseits kann jede Verzögerung der Therapie und jede inadäquate Behandlung bei vorliegender Infektion zu einer raschen Progredienz mit Entwicklung einer Meningitis und eines septischen Schocks führen [43]. Andererseits führen die empirische Gabe von Breitspektrum-Antibiotika sowie der Einsatz von Reserve-Antibiotika bereits bei der kalkulierten Therapie zur Förderung der Vermehrung einiger pathogenen Bakterien- und Pilz-Spezies sowie zur Entwicklung resistenter Keime [53]. Antibiotika beeinträchtigen die Darmflora und damit die regelrechte Entwicklung des Immunsystems des Neugeborenen [45]. Des Weiteren werden die meisten Antibiotika im Rahmen des Off-Label-Use eingesetzt [1]. Es mangelt an klinischen Studien bezüglich der Pharmakokinetik, Pharmakodynamik und der Therapiesicherheit bei Neugeborenen [53]. Bezogen auf die Inzidenz der EOS (0,05 - 0,12 %) erhalten ca. zehnfach so viele Neugeborene eine empirische und häufig unnötige antibiotische Therapie [48].

Zurzeit mangelt es an etablierten diagnostischen Mitteln, die eine schnelle und zuverlässige Diagnose ermöglichen und damit unnötige Medikamentengaben reduzieren. Als Reaktion auf dieses Problem werden in der Literatur Risikorechner für die neonatale Sepsis vorgeschlagen, die unnötige empirische Antibiotikagaben theoretisch um mehr als 50% reduzieren könnten [48]. Ein neuer Biomarker der neonatalen bakteriellen Infektionen mit einer hohen Spezifität wäre eine weitere Möglichkeit, die Diagnosesicherheit zu erhöhen, sodass der Suche nach einem solchen Parameter und seiner Identifikation eine hohe klinischer Relevanz zukommt.

1.3.4. Prognose

Trotz der antipathogenen und supportiven Behandlung sind die aktuellen Therapieergebnisse nicht zufriedenstellend. An Infektionen sterben jährlich weltweit ca. 1,4 Millionen Neugeborene [43]. Die EOS mit Erregernachweis ist verantwortlich für bis zu 16% der gesamten Neugeborenensterblichkeit [45]. Für die EOS wurde eine Mortalität von 11% aller Erkrankten und Folgeschäden bei 6,3% der Betroffenen berichtet [46]. Zu den Spätkomplikationen konnataler Infektionen zählen vor allem die Schädigung des zentralen Nervensystems und deren Folgen [1,54].

Die Mechanismen der zellulären Dysfunktion und des Organversagens wurden bis jetzt nicht vollständig erforscht und werden zurzeit selten in diagnostischen und therapeutischen Schemata berücksichtigt. Zu den möglichen Folgen von schweren Infektionserkrankungen tragen unter anderem oxidative Schäden der Mitochondrien und Dysbalancen im intrazellulären Redox-System bei [53]. Die erhaltene Spurenelementhomöostase ist für den antioxidativen Schutz und die Redox-Homöostase von großer Bedeutung, was auf die mögliche Rolle von Zn und Cu für den Verlauf der konnatalen Infektionen hinweist.

1.4. Der Kupfer/Zink-Koeffizient als Biomarker

Veränderungen des Cu- und Zn-Haushaltes und deren Rolle in verschiedenen Erkrankungen wurden im Rahmen von zahlreichen Publikationen beschrieben. In mehreren Studien zeigte sich dabei der Cu/Zn-Koeffizient als ein besserer Indikator für oxidativen Stress, Infektion, Inflammation, Ernährungsstatus und Prognose von Erkrankungen als Cu oder Zn separat betrachtet [55-57].

Bei Patienten mit peritonealer Dialyse war der Cu/Zn-Koeffizient mit erhöhtem oxidativen Stress, Inflammation, Beeinträchtigung des Immunsystems und Malnutrition assoziiert [55]. Bei urämischen Patienten mit Demenz war der Cu/Zn-Koeffizient höher im Vergleich mit dem Koeffizienten bei nicht dementen Hämodialyse-Patienten [58]. In einer italienischen Kohorte von über 70-Jährigen zeigte sich der Cu/Zn-Koeffizient als ein Prädiktor für die Gesamtmortalität und war mit dem Ernährungsstatus, den Inflammationsmarkern sowie kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert [59]. Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 wurde der Cu/Zn-Koeffizient als ein Marker für das Vorliegen kardiovaskulärer Komplikationen identifiziert [56]. Der Cu/Zn-Koeffizient wurde als hilfreich in der Differentialdiagnose bei Patienten mit tumorverdächtigen Verschattungen in Röntgenaufnahmen des Thorax beschrieben und zeigte eine signifikant positive Korrelation mit den Tumorstadien bei Patienten mit Lungenkarzinom [60]. Bei Kindern mit malignen Lymphomen zeigte sich ein erhöhter Cu/Zn-Koeffizient. Dieser korrelierte mit der Schwere und Aktivität der Erkrankung und normalisierte sich im Laufe einer erfolgreichen Behandlung [61]. Der Cu/Zn-Koeffizient war erhöht bei Kindern mit Tuberkulose [62] und parasitären Erkrankungen wie Giardiasis und Amöbenruhr [63] und normalisierte sich nach erfolgreicher Therapie, was auf die

Qualität des Cu/Zn-Koeffizienten als diagnostischer und prognostischer Parameter hindeutet.

Auf Grund der beschriebenen Studienergebnisse werden die Veränderungen im Cu- und Zn-Haushalt während konnataler bakterieller Infektionen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht nur separat, sondern auch kombiniert in Form des Cu/Zn-Koeffizienten analysiert.

1.5. Ziel der Studie

Die Spurenelemente Cu und Zn sind essentiell für zahlreiche Körperfunktionen. Defizienzen stellen Risikofaktoren für Infektionserkrankungen dar, während akute Infektionen zur Disruption des Spurenelementhaushaltes führen. Dieser Zusammenhang spielt möglicherweise eine wichtige Rolle in der bisher wenig erforschten Pathophysiologie von akuten Infektionserkrankungen bei Neugeborenen und könnte eine Bedeutung für deren Management haben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss der neonatalen Early-Onset-Infektionen auf die Blutplasmakonzentration von Cu, CP, Zn und den Cu/Zn-Koeffizienten untersucht werden. Es sollen potenzielle neue Biomarker mit diagnostischer, therapeutischer und prognostischer Relevanz identifiziert werden. Insbesondere der Cu/Zn-Koeffizient zeigte bisher in mehreren Studien vielversprechende Ergebnisse als Indikator für Infektion, Inflammation, und Prognose von Erkrankungen und soll in dieser Arbeit in Bezug auf seine Qualitäten als diagnostischer Biomarker für konnatale bakterielle Infektionen untersucht werden.

2. Materialien und Methoden

Vor Beginn der klinischen Studie wurde eine Genehmigung der Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin eingeholt (Antragsnummer EA2/092/12). Es erfolgte keine Intervention in den Behandlungsverlauf der teilnehmenden Neugeborenen. Für unsere Analysen wurden ausschließlich die aus den Patientenakten extrahierten Daten sowie Restblutproben aus medizinisch indizierten Blutentnahmen nach Durchführung der vom behandelnden Arzt angeordneten Laboranalysen verwendet, sodass keines der studienteilnehmenden Neugeborenen Risiken oder Nachteile durch die Studie erfuhr. Vor der Durchführung der Analysen wurden die Eltern oder die Sorgerechtsinhaber über Ziele und Abläufe der Studie aufgeklärt und um eine schriftliche Einwilligung gebeten. Die Grundsätze und Empfehlungen der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden eingehalten. Materialien und Methoden dieser Studie wurden bereits in Publikationen beschrieben [1,2].

2.1. Studiendesign und Studiengruppen

Die Studie wurde in Form einer prospektiven Beobachtungsstudie (Fall-Kontroll-Studie) im Zeitraum von Februar 2013 bis April 2014 auf den neonatologischen Stationen der Charité -Universitätsmedizin Berlin (Campus CCM und CVK, Stationen 107i, 108i, 32i, 40i und 62) durchgeführt. Es wurden zwei Studiengruppen definiert: Neugeborene mit einer Early-Onset-Infektion (zusammengefasst als „Infektionsgruppe“) sowie eine Kontrollgruppe, in der keine Infektionserkrankung vorlag. Im Rahmen meines Promotionsvorhabens wurden die Gruppen in Bezug auf den Spurenelementstatus (Cu, Zn und Cu/Zn-Koeffizient) sowie auf die Plasma-CP-Werte unter Berücksichtigung möglicher Confounder miteinander verglichen. Es wurde der Einfluss des Gestationsalters, des Geburtsgewichtes sowie des Geschlechts auf den Spurenelementstaus von Neugeborenen untersucht. Der Cu/Zn-Koeffizient wurde in Bezug auf seine Qualitäten als Biomarker für konnatale bakterielle Infektionen analysiert.

2.2. Ein- und Ausschlusskriterien

Die Ein- und Ausschlusskriterien für beide Studiengruppen wurden in Anlehnung an den aktuellen Literaturstand zu diagnostischen Kriterien und Therapiealgorithmen bei neonatalen Infektionen festgelegt [52,64-66]. Die zum Zeitpunkt der Studienvorbereitung noch nicht aktualisierte Leitlinie der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin (GNPI), der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie (DGPI), der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin (DGKJ) und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) zum Thema „*Bakterielle Infektionen bei Neugeborenen*“ wurde am 30. April 2018 in überarbeiteter Form veröffentlicht [43].

Wie im Abschnitt *Einleitung* bereits ausführlich beschrieben, ist die Diagnose einer Early-Onset-Infektion bei Neugeborenen und somit die sichere Zuordnung zur Infektionsgruppe durch mehrere Faktoren wie unspezifische Symptome und das geringe für Laboranalysen und Blutkultur zur Verfügung stehende Blutvolumen erschwert und damit nicht mit der gleichen Sicherheit wie bei Infektionserkrankungen des Erwachsenen möglich. Die Ein- und Ausschlusskriterien sind in der Tabelle 1. dargestellt und wurden bereits publiziert [2].

Tabelle 1. Ein- und Ausschlusskriterien (modifiziert aus *Table 1* in [2])

Infektionsgruppe	Kontrollgruppe
Einschlusskriterien	
Gestationsalter ≥ 30 Schwangerschaftswoche	
Geburtsgewicht ≥ 1000 g	
<p>Mindestens eins der folgenden klinischen Zeichen:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Atemstörung: <ul style="list-style-type: none"> • Tachypnoe (>50/min) • Dyspnoe (interkostale Einziehungen, Nasenflügeln, Knorksen) • Respiratorische Insuffizienz (Einsatz von CPAP, High-Flow-Atemunterstützung oder konventioneller Beatmung) 2. Kardiovaskuläre Dysfunktion: <ul style="list-style-type: none"> • Rekapillarierungszeit >2 Sekunden • Arterielle Hypotonie (systolischer Blutdruck <65mmHg) 3. Temperaturregulationsstörung: <ul style="list-style-type: none"> • Temperatur $>38,5^{\circ}\text{C}$ oder $<36^{\circ}\text{C}$ 4. Neurologische Auffälligkeiten <ul style="list-style-type: none"> • muskuläre Hypotonie • Trinkschwäche 5. Gerinnungsstörung <ul style="list-style-type: none"> • INR >2 • Thrombozytopenie (<80/nL) 	
<p>Laborchemischer Nachweis einer Inflammation:</p> <ul style="list-style-type: none"> • IL-6 >100 pg/mL oder CRP >10 mg/L am Tag der Geburt 	<p>Blutentnahme aus medizinischer Indikation im Rahmen der Routinediagnostik und kein laborchemischer Nachweis einer Inflammation</p> <ul style="list-style-type: none"> • IL-6 <100 pg/mL und CRP <10 mg/L 48 h vor oder nach der Entnahme der in der Studie verwendeten Blutprobe
Antibiotische Behandlung für mindestens 3 Tage	Keine antibiotische Behandlung zum Zeitpunkt der Blutentnahme
Zweite Blutentnahme 48 h nach Diagnosestellung (Zeitpunkt der Routinekontrolle des Gentamicinspiegels im Blut)	
$\geq 20\mu\text{l}$ Restblutplasma zu beiden Entnahmezeitpunkten (Tag der Geburt / Zeitpunkt der Diagnosestellung und 48h nach der Diagnosestellung)	$\geq 20\mu\text{l}$ Restblutplasma (vom Tag der Geburt)
Geburt an der Charité - Universitätsmedizin Berlin und Aufnahme des Patienten auf eine der neonatologischen Stationen an den Campi CCM und CVK (107i, 108i, 32i, 40i, 62)	
Ausschlusskriterien	
<p>Gestationsalter <30 Schwangerschaftswochen Geburtsgewicht <1000 g Genetische Erkrankung Schwere kongenitale Fehlbildung Parenterale Zufuhr von Spurenelementen Geburt außerhalb der Charité - Universitätsmedizin Berlin</p>	

2.3. Klinische Abläufe und Patientenrekrutierung

Die elektronischen und papierbasierten Patientenakten der oben genannten neonatologischen Stationen wurden in Bezug auf die Erfüllung der Ein- und Ausschlusskriterien studiert und bei Vorliegen aller Anforderungen sowie der schriftlichen Einwilligung der Sorgerechtsinhaber den Studiengruppen zugeordnet.

Bei Neugeborenen mit klinischen Zeichen einer Early-Onset-Infektion (siehe Tabelle 1) wurde unabhängig von der Studie durch den betreuenden Arzt eine Blutentnahme durchgeführt. Bei laborchemischem Nachweis einer Inflammation wurde eine Blutkultur angesetzt (BacT/ALERT, Organon Teknika, Eppelheim) und die Neugeborenen wurden antibiotisch mit Ampicillin und Gentamicin intravenös behandelt. 48 h nach der Diagnosestellung wurde eine zweite Routine-Blutentnahme zur Bestimmung des CRP sowie des Gentamicin-Talspiegels durchgeführt, sodass jeweils zwei Restblutproben (Tag der Geburt - entsprechend Tag 1 - sowie Tag 3 nach der Geburt) vorlagen. Die antibiotische Behandlung wurde für mindestens drei Tage fortgeführt.

Neugeborene aus der Kontrollgruppe erhielten eine Blutentnahme aus medizinischer Indikation am Tag der Geburt und es zeigte sich kein laborchemischer Nachweis einer Inflammation, sodass keine systemische antibiotische Behandlung und keine zweite Blutabnahme an Tag 3 erfolgte.

Keines der studienteilnehmenden Neugeborenen erhielt eine parenterale Zufuhr von Spurenelementen. Die Neugeborenen wurden mit Muttermilch ernährt. Bei zu geringer Zufuhr von Muttermilch (unter 30 ml/kg Körpergewicht pro Tag) wurden sie zusätzlich mit kommerzieller Säuglingsnahrung (Pre-HA, Milupa GmbH, Bad Homburg, Deutschland) mit einem Gehalt von 0,04 mg Kupfer und 0,5 mg Zink pro 100 mg ernährt.

2.4. Gewinnung und Prozessierung der Blutproben

Die Restblutproben wurden nach Durchführung der durch den behandelnden Arzt angeordneten Analysen im Labor Berlin aufbewahrt. Sie wurden innerhalb von einem

bis vier Tagen nach Blutentnahme zur weiteren Prozessierung und Analyse zu Studienzwecken abgeholt. Die Vollblutproben wurden mit 2000 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten zentrifugiert und Plasma wurde gewonnen. Alle Blutplasmaproben wurden bis zur Durchführung der Analysen bei -80°C eingefroren.

2.5. Laboranalysen

2.5.1. Spurenelemente

Die Cu- und Zn-Konzentration im Blutplasma wurde mittels der Totalreflexions-Röntgenfluoreszenz-Spektroskopie (TXRF, abgekürzt aus dem Englischen: total reflection X-ray fluorescence) bestimmt. Die Methode wurde bereits ausführlich in der Publikation von Stosnach [67] beschrieben. Zusammengefasst wurden 10 µl von jeder Plasmaprobe mit 10 µl einer Gallium-Standardlösung (mit einer Konzentration von 550 µg Gallium/L, Sigma-Aldrich, Steinheim) verdünnt. 8 µl von jeder so vorbereiteten Probe wurden auf einen Quarzglasträger pipettiert. Dies wurde im Rahmen einer Zweifachbestimmung für jede Probe wiederholt. Die Proben wurden bei 37°C getrocknet und in Zweifachbestimmung mithilfe eines TXRF-Spektrometers (S2 PICOFOX, Bruker Nano GmbH, Berlin) vermessen. Der intra-assay Variationskoeffizient (CV, abgekürzt aus dem Englischen: Coefficient of variation) betrug in der Studie für alle Proben $\leq 15\%$ und der inter-assay CV $< 10\%$ [1]. Die für eine genaue und zuverlässige Messung benötigten Probenvolumina sind für TXRF sehr gering, was insbesondere für Neugeborene als Studienpopulation in der vorliegenden Arbeit von besonderer Bedeutung ist. Des Weiteren erlaubt TXRF eine rasche Ergebnisermittlung und eignet sich deswegen zur Bestimmung eines potenziellen neuen Biomarkers für konnatale Infektionen, der bei Verdacht auf Vorliegen dieser Erkrankung zur Unterstützung einer sicheren Diagnosestellung und Therapieentscheidung zügig vorliegen muss [1]. Überdies liefert die TXRF neben Cu und Zn eine Reihe weiterer Metallkonzentrationen, über die eine Güteabschätzung der Einzelmessung und Plausibilitätsbetrachtung der gewonnenen Messwerte ermöglicht wird.

2.5.2. Ceruloplasmin

Das Plasma-CP wurde mithilfe von Western Blots (WB) analysiert. Es wurden insgesamt vier WB durchgeführt: drei davon mit Plasmaproben von Neugeborenen sowohl aus der Kontrollgruppe (Tag 1), als auch aus der Infektionsgruppe (Tag 1 und Tag 3) sowie ein WB mit Plasmaproben ausschließlich aus der Infektionsgruppe (Tag 3), die anhand der jeweiligen CRP-Werte ausgewählt wurden.

Die Proben (jeweils 0,2 µL Plasma) wurden mit zweifach destilliertem Wasser (Biochrom AG, Berlin) sowie 4x Pufferlösung (200 mM Tris-HCl, pH 7,5; 50% Glycerin; 4% SDS; 0,04% Bromphenolblau und 125 mM DTT) verdünnt. Die Polypeptide der so vorbereiteten Proben wurden mittels einer Natrium-Dodecylsulfat(SDS)-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese nach Größe aufgetrennt und im weiteren Schritt auf eine Nitrozellulose-Membran (Optitran, Schleicher & Schuell, Dassel) übertragen. Die Membran wurde zur Verminderung unspezifischer Antikörperbindungen für 60 min mithilfe einer Milchproteinlösung blockiert und nachfolgend für 60 min mit dem Anti-Ceruloplasmin-Antikörper (Verdünnung 1:2000, Abcam, Cambridge, England) inkubiert. Die nicht gebundenen Antikörper wurden in drei Waschschrritten mit einem TBS-T-Puffer (Pufferlösung mit Tris als Puffersubstanz, Natriumchlorid und Triton X-100, abgekürzt aus dem Englischen: Tris-buffered saline with Triton X-100) entfernt. Die Membran wurde nachfolgend mit dem an eine Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper für 60 min inkubiert und anschließend in drei Waschschrritten mit dem TBS-T-Puffer gespült. Die gebundenen Sekundärantikörper wurden mittels Chemilumineszenz unter Verwendung des WesternBright Chemilumineszenz-Substrats Sirius (Peroxidasesubstrat; Biozym Scientific, Oldendorf) und des Fluor Chem FC2-Detektionssystems (Biozym Scientific, Oldendorf) visualisiert. Die WB-Signale wurden mithilfe von ImageJ (NIH, USA) quantifiziert.

2.5.3. Interleukin-6 und C-reaktives Protein

Die Konzentrationen von IL-6 und CRP wurden aus den elektronischen Patientenakten extrahiert. Diese wurden vom Labor Berlin - Charité Vivantes GmbH bestimmt. Die IL-6-Konzentration wurde mittels eines elektrochemischen Lumineszenz-Immunoassay (COBAS 8000, Roche Diagnostics, Mannheim) und die CRP-Konzentration mithilfe

eines turbidimetrischen Immunoassays (COBAS 6000, Roche Diagnostics, Mannheim) ermittelt.

2.6. Statistische Auswertung

Die erfassten Daten wurden pseudonymisiert und in Microsoft Excel 2007 gespeichert. Für die Durchführung statistischer Analysen wurde IBM SPSS Statistics 21 verwendet. Die Daten wurden bezüglich Normalverteilung mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests evaluiert. Bei Vorliegen einer Normalverteilung wurde zum Mittelwertvergleich der zweiseitige T-Test für abhängige und unabhängige Stichproben verwendet, die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD, abgekürzt aus dem Englischen: standard deviation) dargestellt. Zur Prüfung der Korrelationen wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet. Für nicht normalverteilte Daten sowie für alle quantifizierten WB-Ergebnisse wurde zum Vergleich der zentralen Tendenzen für unabhängige Stichproben der Mann-Whitney-U-Test und für abhängige Stichproben der Wilcoxon-Test verwendet, die Ergebnisse wurden als Median [Interquartilbereich (IQR, abgekürzt aus dem Englischen: interquartile range)] dargestellt. Zur Prüfung der Korrelationen wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman berechnet.

Zwecks genauerer Untersuchung der Korrelationen wurden lineare Regressionskoeffizienten (auch als Beta-Werte bezeichnet) berechnet. Um den Einfluss von möglichen Confoundern auf die Ergebnisse zu untersuchen, wurden univariate Analysen und multinomiale logistische Regressionen durchgeführt.

Die Grafiken wurden mithilfe von GraphPad Prism 5, Microsoft PowerPoint 2007 und IBM SPSS Statistics 21 und die Tabellen mittels Microsoft Word 2007 erstellt.

Ergebnisse mit einem p-Wert von niedriger als 0,05 wurden als statistisch signifikant bezeichnet und wie folgt gekennzeichnet: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***). Zur Berechnung der p-Werte wurden zweiseitige Tests verwendet.

3. Ergebnisse

Teile der im Folgenden dargestellten Ergebnisse dieser Studie wurden bereits in Publikationen beschrieben [1,2].

3.1. Studienpopulation

Basierend auf dem klinischen Erscheinungsbild wurden Patientenakten von insgesamt 108 Neugeborenen hinsichtlich der Erfüllung der oben genannten Ein- und Ausschlusskriterien überprüft. Für die Studienteilnahme qualifizierten sich hiervon 72 Neugeborene. Die jeweiligen Sorgerechtsinhaber erteilten eine schriftliche Einwilligungserklärung zur Teilnahme an der Studie für 44 dieser Neugeborenen, von denen 21 in die Infektionsgruppe und 23 in die Kontrollgruppe eingeschlossen wurden. Die Studiengruppen unterschieden sich signifikant bezüglich des durchschnittlichen Gestationsalters und Geburtsgewichtes (Tabelle 2). In der Infektionsgruppe waren 62% der Teilnehmenden Reifgeborene, in der Kontrollgruppe betrug dieser Anteil 26%. Des Weiteren wiesen die Studiengruppen eine unterschiedliche Geschlechtsverteilung auf: in der Infektionsgruppe waren 29% der Neugeborenen weiblich, in der Kontrollgruppe betrug dieser Anteil 60%. In der Kontrollgruppe kamen mehr Neugeborene durch eine Kaisergeburt zur Welt (70%), als in der Infektionsgruppe (52%). Die klinischen und laborchemischen Eigenschaften der gesamten Studienpopulation sind in der Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2. Eigenschaften der Studienpopulation (modifiziert aus *Table 1* in [1]).

	Kontrollgruppe	Infektionsgruppe	P-Wert (zweiseitiger Test)
Studienteilnehmer	n=23	n=21	-
Weiblich	n=15	n=6	-
Gestationsalter [Wochen]	34,9 [33,9 – 37,1]	38,4 [35,1 – 39,8]	0,003
Reifgeborene	n=6	n=13	-
Frühgeborene	n=17	n=8	-
Geburtsgewicht [g]	2452,3 ± 694,1	3119,7 ± 733,7	0,003
Vaginale Geburt	n=7	n=10	-
Zwillinge	n=7	n=1	-
APGAR 1 min	9,0 [6,0 – 9,0]	8,0 [4,5 – 9,0]	0,505
APGAR 5 min	9,0 [8,0 – 10,0]	9,0 [7,5 – 10,0]	0,951
pH-Wert Nabelschnurarterie	7,25 [7,2 – 7,29]	7,23 [7,19 – 7,3]	0,655
pH-Wert bei Aufnahme	7,33 [7,27 – 7,38]	7,33 [7,26 – 7,37]	0,673
Basenüberschuss bei Aufnahme	-2,15 [(-3,75) – (-0,9)]	-2,8 [(-5,32) – (-1,28)]	0,283
IL-6 [pg/mL], Tag 1	5,8 [4,2 – 17,0]	498,5 [203,6 – 2523,0]	<0,001

Angegeben sind der Mittelwert ± Standardabweichung oder Median [Interquartilbereich] oder die Gesamtanzahl (n).

Frühgeborene: <37 Gestationswochen.

APGAR: Score zur standardisierten Beurteilung des klinischen Zustandes eines Neugeborenen (in der Tabelle 1 min und 5 min nach der Geburt) anhand 5 Kategorien: Atmung, Puls, Grundtonus, Aussehen und Reflexe; maximal erreichbare Punktzahl: 10 Punkte.

pH-Wert / Basenüberschuss: bei Aufnahme auf die neonatologische Station.

IL-6: Interleukin-6.

In der Infektionsgruppe waren die Atemstörung (43%) und die kardiovaskuläre Dysfunktion (29%) die häufigsten klinischen Auffälligkeiten. Neurologische Auffälligkeiten kamen in 14% und eine Temperaturregulationsstörung in 10% der Fälle vor. Eine Gerinnungsstörung wurde bei keinem der Studienteilnehmer festgestellt. Die durchschnittliche IL-6-Konzentration an Tag 1 und die mittlere CRP-Konzentration an Tag 3 lagen deutlich oberhalb des Referenzbereiches (Tabelle 3). Die durchschnittliche Dauer der antibiotischen Behandlung betrug 5 Tage. Bei keinem der Neugeborenen war das Ergebnis der Blutkultur positiv. Alle Neugeborenen überlebten. Die klinischen und

laborchemischen Eigenschaften der Infektionsgruppe sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3. Eigenschaften der Infektionsgruppe (modifiziert aus Table 2 in [1]).

	Infektionsgruppe
Anzahl der Studienteilnehmer	n=21
Atemstörung	n=9
Kardiovaskuläre Dysfunktion	n=6
Temperaturregulationsstörung	n=2
Neurologische Auffälligkeiten	n=3
Gerinnungsstörung	n=0
IL-6 [pg/mL], Tag 1	498,5 [203,6 – 2523,0]
CRP [mg/L], Tag 3	12,1 ± 7,8
Positive Blutkultur	n=0
Dauer der antibiotischen Behandlung [Tage]	5,0 [3,0 – 5,0]

Angegeben sind der Mittelwert ± Standardabweichung oder Median [Interquartilbereich] oder die Gesamtanzahl (n).

IL-6: Interleukin-6, oberer Referenzbereich für Neugeborene (Tag der Geburt): 20 bis 100 pg/mL [64,68,69].

CRP: C-reaktives Protein, oberer Referenzbereich für Neugeborene: 6 bis 10 mg/L [64,70-73].

3.2. Kupfer und Ceruloplasmin

3.2.1. Korrelation zwischen Kupfer und Ceruloplasmin

Die mediane Plasma-Cu-Konzentration aller in die Studie eingeschlossenen Neugeborenen betrug an Tag 1 522,8 [387,1 – 679,7] µg/L (Median [IQR]). Es zeigte sich eine signifikant positive Korrelation zwischen der Cu-Konzentration und dem CP im Blutplasma an Tag 1. Die Korrelation wurde in separaten Analysen von drei CP-WB bestätigt (WB 1: $\rho=0,976$, $p<0,001$, $\beta=0,956$; WB 2: $\rho=0,741$, $p=0,047$, $\beta=0,903$; WB 3: $\rho=0,964$, $p<0,001$, $\beta=0,918$; Abbildung 2A-D). In der Infektionsgruppe konnte ebenfalls an Tag 3 eine signifikant positive Korrelation zwischen Cu und CP gezeigt werden ($\rho=0,944$, $p<0,001$, $\beta=0,901$; Abbildung 2E).

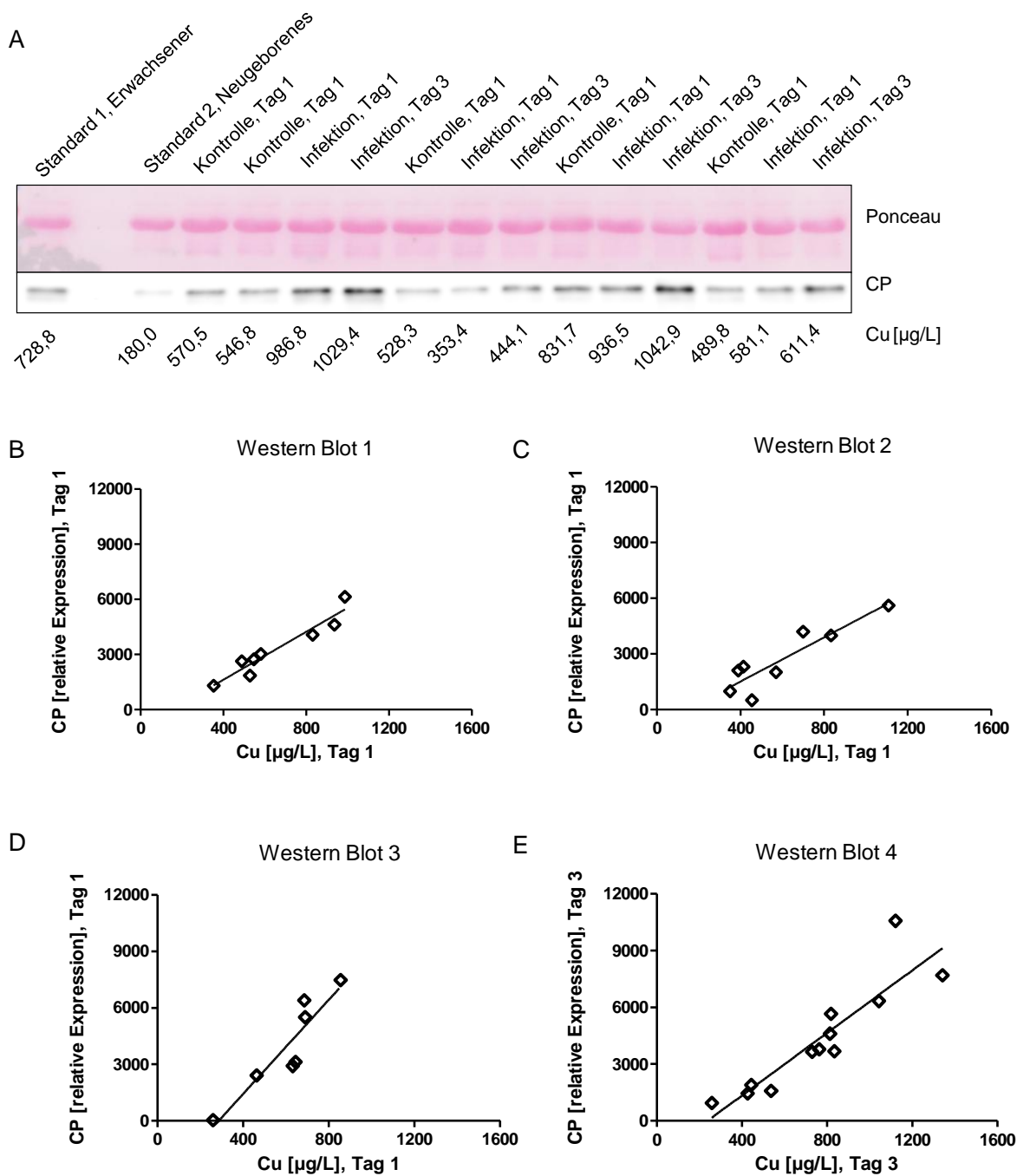


Abbildung 2. Die Korrelation zwischen der Kupferkonzentration (Cu) und dem Ceruloplasmin (CP) im Blutplasma am Tag der Geburt (Tag 1) und Tag 3 nach der Geburt. Teile modifiziert aus *Figure 3* in [1]. Wie in dem repräsentativen Western Blot (WB) 1 (A) dargestellt, entspricht die optische Dichte im CP-WB den gemessenen Plasma-Cu-Werten. Es zeigt sich ein Anstieg der optischen Dichte der CP-Banden in der Infektionsgruppe von Tag 1 zu Tag 3. In (B - D) ist die Korrelation zwischen der Cu-Konzentration und den quantifizierten CP-Signalen an Tag 1 in der Kontroll- und Infektionsgruppe aus drei separat analysierten WB dargestellt: (B) WB 1 (siehe A): $\rho=0,976^{***}$, $\beta=0,956$, (C) WB 2: $\rho=0,741^*$, $\beta=0,903$, (D) WB 3: $\rho=0,964^{***}$, $\beta=0,918$. In (E) ist die Korrelation zwischen der Cu-Konzentration und den quantifizierten CP-Signalen an Tag 3 (nur Infektionsgruppe) dargestellt: $\rho=0,944^{***}$, $\beta=0,901$. Relative Expression: quantifizierte WB-Signale ρ : Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman, β : standardisierter Regressionskoeffizient, $p<0,05$ (*), $p<0,001$ (***)

3.2.2. Infektions- und Kontrollgruppe im Vergleich

Die mediane Plasma-Cu-Konzentration war in der Kontrollgruppe (489,7 [386,2 – 627,3] µg/L) niedriger als in der Infektionsgruppe (644,9 [371,6 – 843,8] µg/L), dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test: $U=184$; $Z= -1,351$; $p=0,177$; Abbildung 3A). Es zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen dem Plasma-CP in der Kontroll- und der Infektionsgruppe (Mann-Whitney-U-Test: WB 1: $U=5,0$; $Z= -0,866$; $p=0,386$; WB 2: $U=4,0$; $Z= -1,155$; $p=0,248$, WB 3: $U=4,0$; $Z= -0,707$; $p=0,48$).

3.2.3. Dynamik des Plasma-Kupfers und -Ceruleplasmins vom Tag der Geburt (Tag 1) zu Tag 3 nach der Geburt

In der Infektionsgruppe zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Plasma-Cu von Tag 1 (627,9 ± 282,5 µg/L (Mittelwert ± SD)) zu Tag 3 (777,1 ± 270,2 µg/L) ($p<0,001$; Abbildung 3B). Im CP-WB wurde korrespondierend dazu ein Anstieg der optischen Dichte der CP-Banden in der Infektionsgruppe von Tag 1 zu Tag 3 beobachtet (Abbildung 2A). Für die Kontrollgruppe konnte keine Analyse der Dynamik des Plasma-Cu und -CP von Tag 1 zu Tag 3 durchgeführt werden, weil für diese Gruppe keine Blutplasmaproben von Tag 3 zur Verfügung standen.

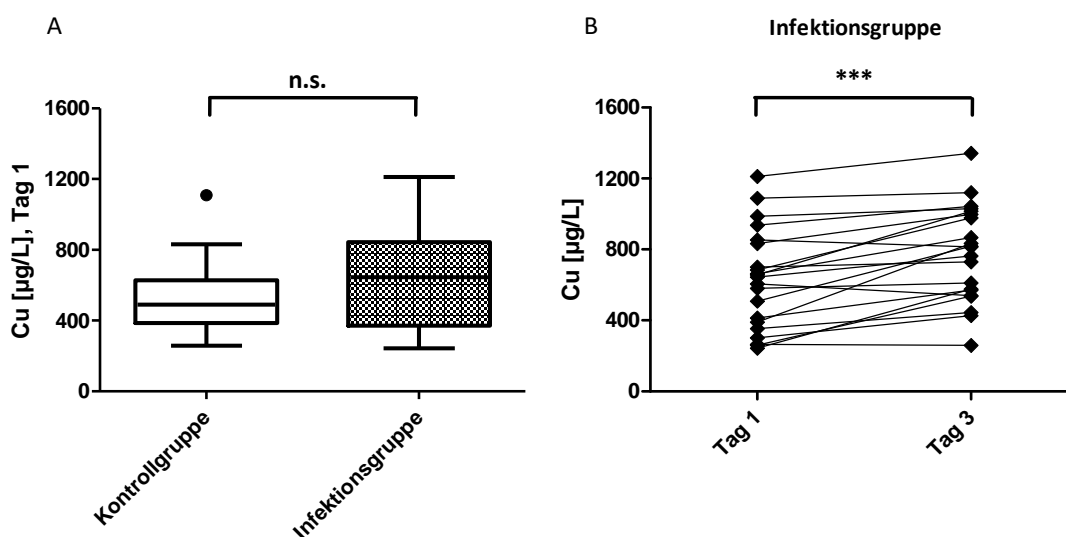


Abbildung 3. Die Plasmakupferkonzentration (Cu) in der Kontroll- und der Infektionsgruppe am Tag der Geburt (Tag 1) und Tag 3 nach der Geburt. Modifiziert aus *Figure 1* und *4* in [1]. (A) Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Cu-Werte zwischen den Gruppen an Tag 1 (Mann-Whitney-U-Test: $U=184$; $Z= -1,351$; $p=0,177$). Box-and-Whisker-Plot nach Tukey. (B) Die mittlere Plasma-Cu-Konzentration in der Infektionsgruppe ist von Tag 1 zu Tag 3 signifikant angestiegen (Tag 1: 627,9 ± 282,5 µg/L, Tag 3: 777,1 ± 270,2 µg/L). n.s.: nicht signifikant, $p<0,001$ (***)).

3.2.4. Korrelation mit den Inflammationsmarkern IL-6 und CRP

In der Infektionsgruppe zeigte sich keine Korrelation der Plasma-Cu-Konzentration an Tag 1 mit dem frühen Inflammationsmarker IL-6 ($\rho = -0,020$, $p = 0,935$, $\beta = -0,117$; Abbildung 4A). Das Plasma-Cu an Tag 1 ($r = 0,720$, $p < 0,001$, $\beta = 0,720$) und an Tag 3 ($r = 0,765$, $p < 0,001$, $\beta = 0,765$) korrelierte jedoch mit dem späten Inflammationsmarker CRP an Tag 3 (Abbildung 4B-C). Im CP-WB mit Plasmaproben aus der Infektionsgruppe von Tag 3 zeigte sich ein korrespondierendes Ergebnis. Die optische Dichte der CP-Banden war höher für Proben mit einer mittleren oder hohen CRP-Konzentration als für Proben mit einer geringen CRP-Konzentration (Abbildung 4E). Die Analyse nach Quantifizierung der Banden ergab eine signifikant positive Korrelation zwischen CP und CRP an Tag 3 ($\rho = 0,650$, $p = 0,022$, $\beta = 0,586$; Abbildung 4D).

3.2.5. Korrelation mit Gestationsalter, Geburtsgewicht und Geschlecht

Zur Detektion von möglichen Confoundern wurde eine univariate Analyse durchgeführt. Diese ergab, dass sowohl das Gestationsalter als auch das Geschlecht einen signifikanten Einfluss auf die Plasma-Cu-Konzentration haben (Tabelle 4).

Die signifikant positive Korrelation des Plasma-Cu mit dem Gestationsalter in der gesamten Studienpopulation an Tag 1 ($\rho = 0,495$, $p = 0,001$, $\beta = 0,505$) ist in der Abbildung 5A dargestellt. Nach der separaten Analyse der Studiengruppen zeigte sich diese Korrelation in der Kontrollgruppe ($\rho = 0,568$, $p = 0,005$, $\beta = 0,560$; Abbildung 5C), aber nicht in der Infektionsgruppe ($r = 0,409$, $p = 0,066$, $\beta = 0,409$; Abbildung 5D). Die Plasma-Cu-Werte waren an Tag 1 bei Frühgeborenen (<37 Gestationswochen; $461,4 \pm 160,5 \mu\text{g/L}$) signifikant niedriger als bei termingerecht Geborenen (≥ 37 Gestationswochen; $715,8 \pm 254,0 \mu\text{g/L}$) der gesamten Studienpopulation ($p = 0,001$; Abbildung 5B).

Bei der Analyse der gesamten Studienpopulation zeigte sich eine signifikante Korrelation des Plasma-Cu mit dem Geburtsgewicht an Tag 1 ($\rho = 0,355$, $p = 0,018$, $\beta = 0,292$). Bei der separaten Analyse der Studiengruppen zeigte sich diese Korrelation jedoch weder in der Kontrollgruppe ($\rho = 0,352$, $p = 0,1$, $\beta = 0,356$), noch in der Infektionsgruppe ($r = 0,135$, $p = 0,56$, $\beta = 0,135$).

Die Cu-Konzentration an Tag 1 betrug bei weiblichen Neugeborenen der gesamten Studienpopulation $492,5 \pm 155,1 \mu\text{g/L}$ und bei männlichen Neugeborenen $643,2 \pm 281,9 \mu\text{g/L}$. Der Unterschied war statistisch signifikant ($p = 0,033$). Bei der Interpretation dieser

Ergebnisse muss jedoch die unterschiedliche Geschlechtsverteilung in den Studiengruppen berücksichtigt werden (siehe Kapitel 3.1. *Studienpopulation*). Nach der separaten Analyse der Studiengruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Plasma-Cu-Konzentration weder in der Kontrollgruppe an Tag 1 (weiblich: $491,6 \pm 144,1$ $\mu\text{g/L}$, männlich: $572,0 \pm 247,5$ $\mu\text{g/L}$, $p=0,332$) noch in der Infektionsgruppe an Tag 1 (weiblich: $494,8 \pm 195,1$ $\mu\text{g/L}$, männlich: $681,1 \pm 195,1$ $\mu\text{g/L}$, $p=0,178$) oder an Tag 3 (weiblich: $688,86 \pm 231,51$ $\mu\text{g/L}$, männlich: $812,4 \pm 283,71$ $\mu\text{g/L}$, $p=0,357$).

Tabelle 4. Univariate Analyse für Kupfer als abhängige Variable.

Parameter	df	Quadratischer Mittelwert	F	Signifikanz
Infektion/Kontrolle	1	46621,520	1,182	0,284
Gestationsalter	1	628838,353	15,943	<0,001
Geschlecht	1	280559,029	7,113	0,011
Infektion/Kontrolle*Geschlecht	1	51041,072	1,294	0,262

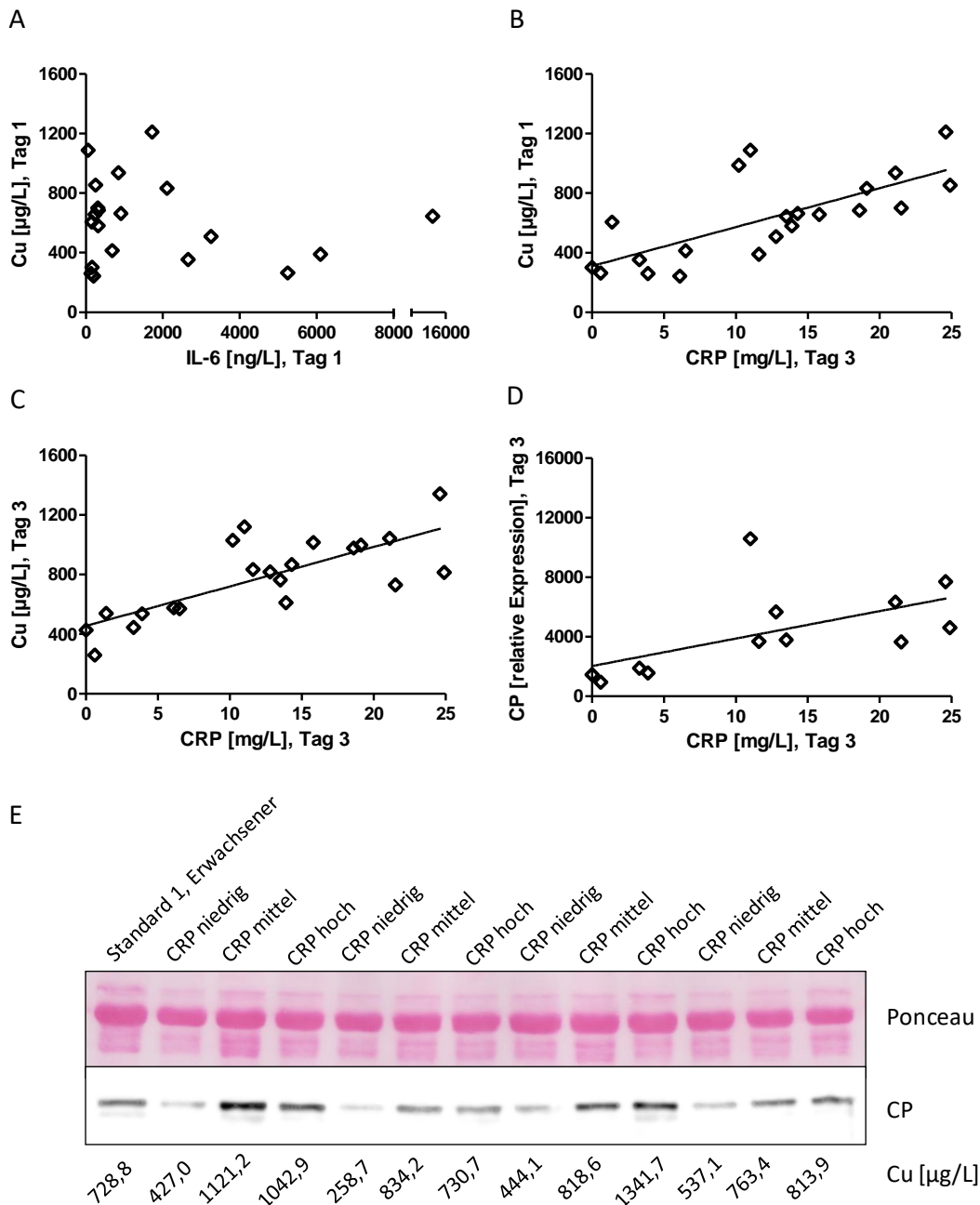


Abbildung 4. Die Korrelation zwischen Kupfer (Cu), Ceruloplasmin (CP) und den Inflammationsmarkern. Modifiziert aus Figure 4 in [1]. Wie in (A) dargestellt, zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen dem Plasma-Cu und dem IL-6 am Tag der Geburt (Tag 1): $\rho = -0,020$, $p = 0,935$, $\beta = -0,117$. Die Cu-Konzentration an Tag 1 korrelierte jedoch signifikant mit der CRP-Konzentration an Tag 3 nach der Geburt (B: $r = 0,720^{***}$, $\beta = 0,720$). Das Plasma-Cu an Tag 3 korrelierte ebenfalls signifikant mit dem CRP an Tag 3 (C: $r = 0,765^{***}$, $\beta = 0,765$). Die Abbildung (E) zeigt einen CP-Western Blot (WB) mit Plasmaproben aus der Infektionsgruppe von Tag 3. Die optische Dichte der CP-Banden ist für Proben mit einer mittleren oder hohen CRP-Konzentration höher als für Proben mit einer niedrigen CRP-Konzentration. CRP $< 5\text{mg/L}$ = niedrig, $10\text{-}15\text{mg/L}$ = mittel, $> 20\text{mg/L}$ = hoch. Die signifikante Korrelation der quantifizierten CP-Signale aus diesem WB (E) mit den CRP-Werten an Tag 3 wird in Abbildung (D) dargestellt: $\rho = 0,650^*$, $\beta = 0,586$. Relative Expression: quantifizierte WB-Signale, r: Korrelationskoeffizient nach Pearson, ρ : Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman, β : standardisierter Regressionskoeffizient, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

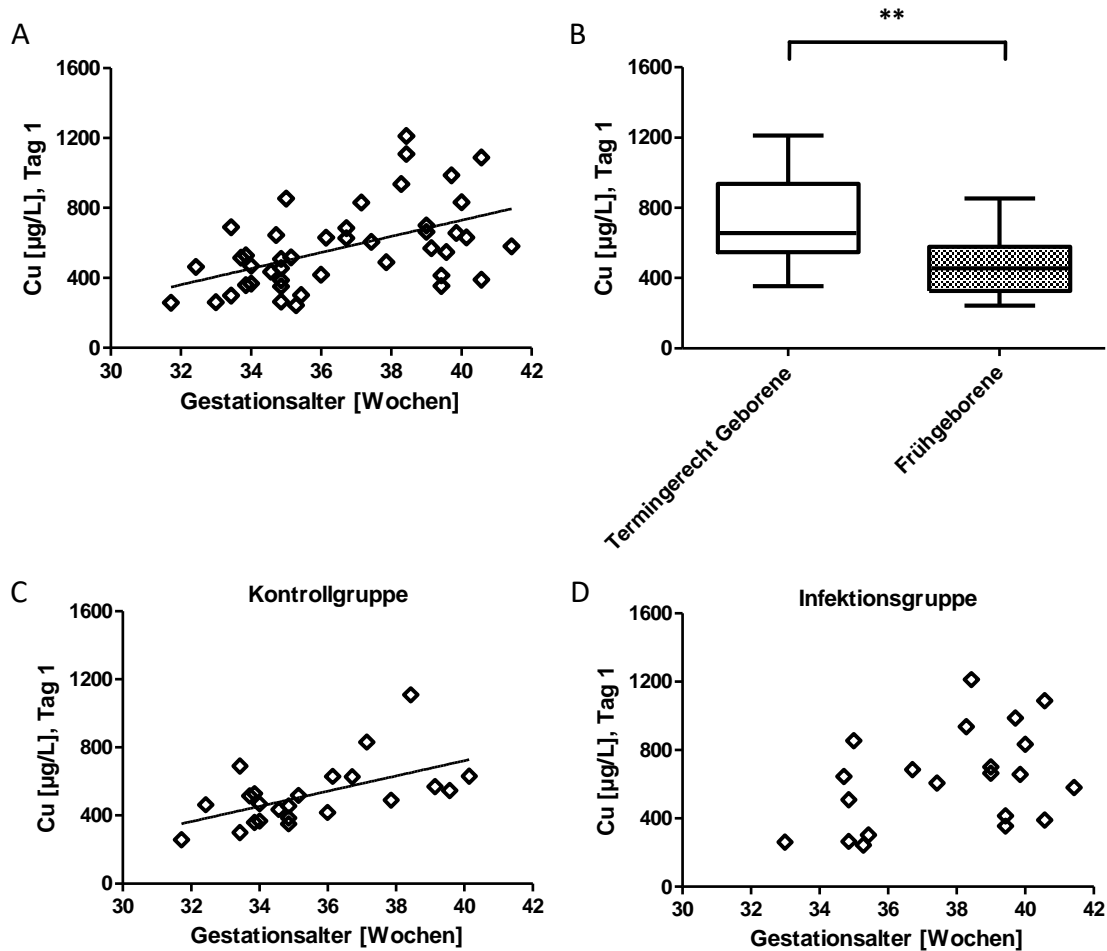


Abbildung 5. Die Korrelation des Plasma-Kupfers (Cu) mit dem Gestationsalter. Modifiziert aus Figure 2 in [1]. In der gesamten Studienpopulation zeigte sich eine signifikante Korrelation des Plasma-Cu mit dem Gestationsalter (A: $\rho=0,495^{**}$, $\beta=0,505$). Wie in (B) dargestellt, war die Cu-Konzentration bei termingerecht Geborenen (≥ 37 Gestationswochen) signifikant höher im Vergleich zu Frühgeborenen (< 37 Gestationswochen) der gesamten Studienpopulation. Box-and-Whisker-Plot nach Tukey. Bei der separaten Analyse der Studiengruppen war die signifikante Korrelation des Plasma-Cu mit dem Gestationsalter in der Kontrollgruppe vorhanden (C: $\rho=0,568^{**}$, $\beta=0,560$), sie bestand jedoch nicht in der Infektionsgruppe (D: $r=0,409$, $p=0,066$, $\beta=0,409$). r : Korrelationskoeffizient nach Pearson, ρ : Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman, β : standardisierter Regressionskoeffizient, $p < 0,01$ (**).

3.3. Zink

3.3.1. Infektions- und Kontrollgruppe im Vergleich

Die mittlere Plasma-Zn-Konzentration am Tag der Geburt (Tag 1) in der gesamten Studienpopulation betrug $1642,4 \pm 438,1 \mu\text{g/L}$ (Mittelwert \pm SD). In der Infektionsgruppe war das Plasma-Zn an Tag 1 ($1464,8 \pm 439,3 \mu\text{g/L}$) signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ($1804,6 \pm 377,0 \mu\text{g/L}$) ($p=0,009$; Abbildung 6A).

3.3.2. Dynamik des Plasma-Zinks von Tag 1 zu Tag 3

In der Infektionsgruppe zeigte sich keine signifikante Veränderung der Plasma-Zn-Konzentration von Tag 1 ($1464,8 \pm 439,3 \mu\text{g/L}$) zu Tag 3 ($1311,6 \pm 279,0 \mu\text{g/L}$) ($p=0,181$; Abbildung 6B).

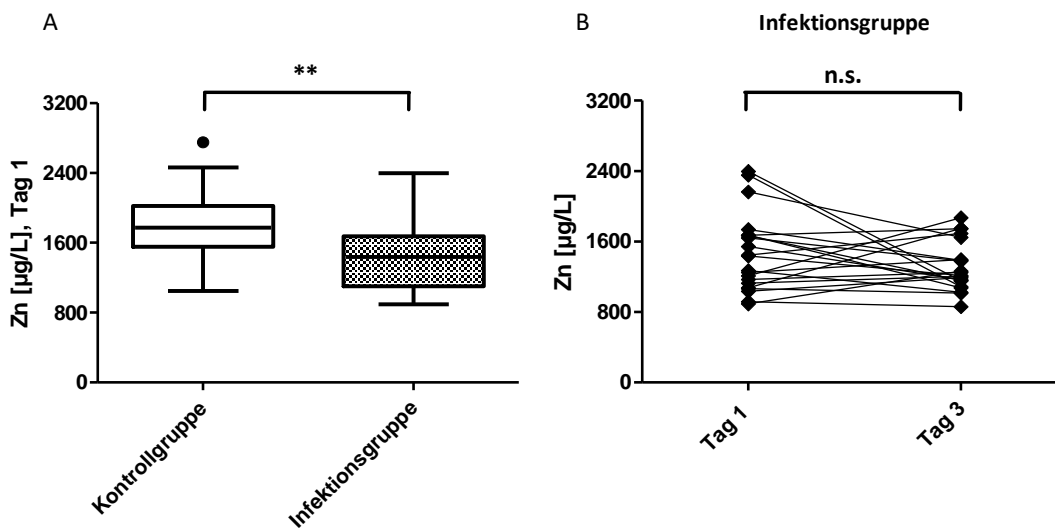


Abbildung 6. Die Plasmazinkkonzentration (Zn) in der Kontroll- und der Infektionsgruppe am Tag der Geburt (Tag 1) und Tag 3 nach der Geburt. Teile modifiziert aus *Figure 1* in [1]. (A) Die mittlere Zn-Konzentration war in der Kontrollgruppe signifikant höher als in der Infektionsgruppe. Box-and-Whisker-Plot nach Tukey. (B) In der Infektionsgruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der mittleren Zn-Konzentration an Tag 1 ($1464,8 \pm 439,3 \mu\text{g/L}$) und Tag 3 ($1311,6 \pm 279,0 \mu\text{g/L}$). n.s.: nicht signifikant. $p < 0,01$ (**).

3.3.3. Korrelation mit den Inflammationsmarkern IL-6 und CRP

In der Infektionsgruppe korrelierte die Plasma-Zn-Konzentration an Tag 1 nicht mit dem IL-6 an Tag 1 ($\rho = -0,192$, $p = 0,416$, $\beta = -0,174$; Abbildung 7A) oder dem CRP an Tag 3 ($r = -0,164$, $p = 0,477$, $\beta = -0,164$; Abbildung 7B). Auch das Plasma-Zn an Tag 3 korrelierte nicht mit dem CRP an Tag 3 ($r = 0,036$, $p = 0,875$, $\beta = 0,036$; Abbildung 7C).

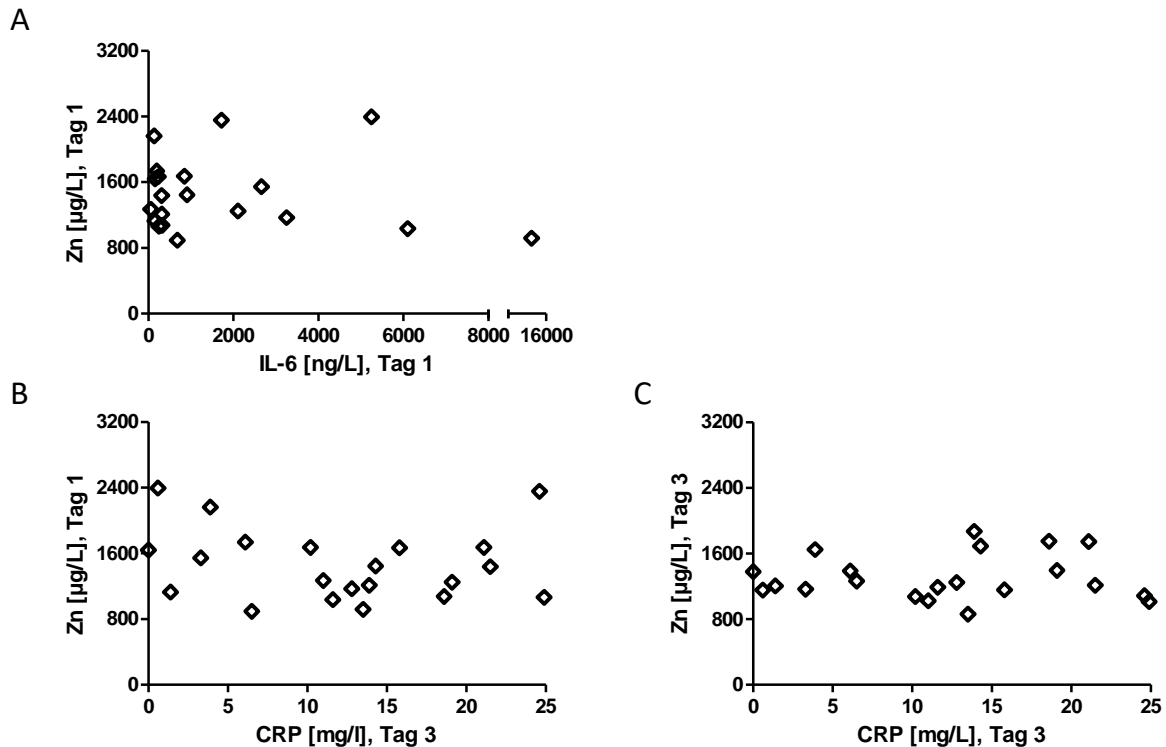


Abbildung 7. Die Korrelation des Plasma-Zinks (Zn) mit den Inflammationsmarkern. Teile modifiziert aus *Figure 5* in [1]. Die Zn-Konzentration am Tag der Geburt korrelierte weder mit dem IL-6 am Tag der Geburt (Tag 1, A: $\rho = -0,192$, $p = 0,416$, $\beta = -0,174$), noch mit dem CRP an Tag 3 (B: $r = -0,164$, $p = 0,477$, $\beta = -0,164$). Es zeigte sich keine Korrelation zwischen dem Plasma-Zn an Tag 3 und dem CRP an Tag 3 (C: $r = 0,036$, $p = 0,875$, $\beta = 0,036$). ρ : Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman, r : Korrelationskoeffizient nach Pearson, β : standardisierter Regressionskoeffizient.

3.3.4. Korrelation mit Gestationsalter, Geburtsgewicht und Geschlecht

Die univariate Analyse zeigte keinen Einfluss des Gestationsalters oder des Geschlechtes auf die Plasma-Zn-Konzentration (Tabelle 5).

Bei der Analyse der gesamten Studienpopulation zeigte sich keine Korrelation des Plasma-Zn mit dem Gestationsalter ($\rho = -0,167$, $p = 0,279$, $\beta = -0,121$) oder dem Geburtsgewicht ($r = -0,081$, $p = 0,602$, $\beta = -0,081$) an Tag 1. Bei der separaten

Betrachtung der Studiengruppen korrelierte die Zn-Konzentration an Tag 1 in der Kontrollgruppe signifikant positiv sowohl mit dem Gestationsalter ($r=0,418$, $p=0,047$, $\beta=0,418$; Abbildung 8B) als auch mit dem Geburtsgewicht ($r=0,584$, $p=0,003$, $\beta=0,584$; Abbildung 8D). In der Infektionsgruppe bestand diese Korrelation weder für das Gestationsalter ($r= -0,253$, $p=0,268$, $\beta= -0,253$, Abbildung 8C) noch für das Geburtsgewicht ($r= -0,320$, $p=0,157$, $\beta= -0,320$, Abbildung 8E). Die Plasma-Zn-Konzentration war zwischen den Frühgeborenen ($1661,8 \pm 404,2 \mu\text{g/L}$) und den termingerecht Geborenen ($1616,9 \pm 489,4 \mu\text{g/L}$) der gesamten Studienpopulation an Tag 1 nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,740$; Abbildung 8A).

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Plasma-Zn-Konzentration bei weiblichen ($1616,4 \pm 351,3 \mu\text{g/L}$) und männlichen ($1666,2 \pm 511,6 \mu\text{g/L}$) Neugeborenen der gesamten Studienpopulation an Tag 1 ($p=0,711$). Auch bei der separaten Analyse der Studiengruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Plasma-Zn-Konzentration zwischen den Geschlechtern weder in der Kontrollgruppe an Tag 1 (weiblich: $1739,4 \pm 316,2 \mu\text{g/L}$, männlich: $1926,8 \pm 469,7 \mu\text{g/L}$, $p=0,266$) noch in der Infektionsgruppe an Tag 1 (weiblich: $1308,9 \pm 234,3 \mu\text{g/L}$, männlich: $1527,2 \pm 491,4 \mu\text{g/L}$, $p=0,316$) oder an Tag 3 (weiblich: $1375,61 \pm 260,41 \mu\text{g/L}$, männlich: $1286,06 \pm 290,71 \mu\text{g/L}$, $p=0,520$).

Tabelle 5. Univariate Analyse für Zink als abhängige Variable

Parameter	df	Quadratischer Mittelwert	F	Signifikanz
Infektion/Kontrolle	1	1567095,748	9,364	0,004
Gestationsalter	1	71675,440	0,428	0,517
Geschlecht	1	431629,822	2,579	0,116
Infektion/Kontrolle*Geschlecht	1	4732,764	0,028	0,867

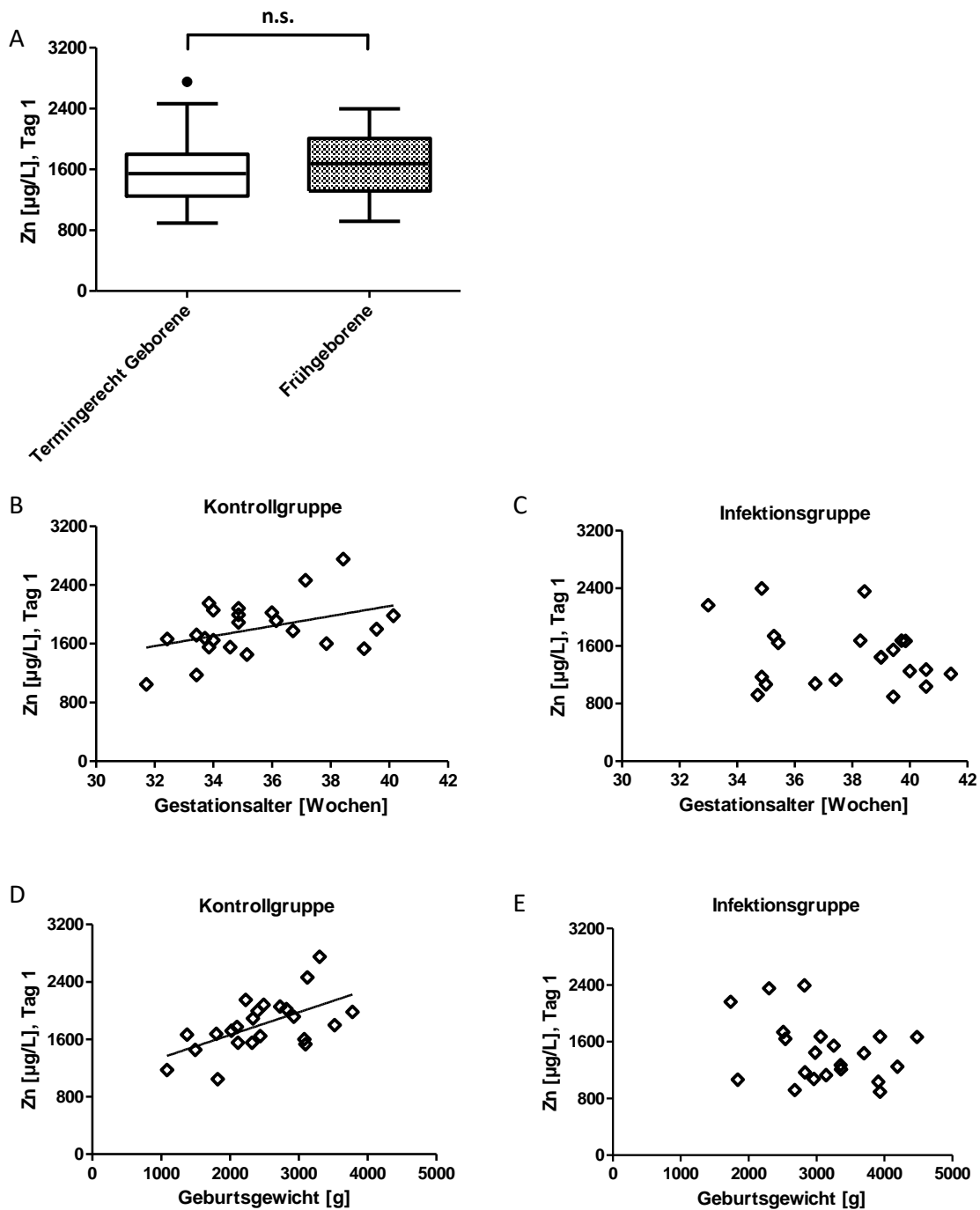


Abbildung 8. Die Korrelation des Plasma-Zinks (Zn) mit dem Gestationsalter und dem Geburtsgewicht. Teile modifiziert aus *Figure 5* in [1]. (A) Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Zn-Konzentration zwischen den termingerecht Geborenen (≥ 37 Gestationswochen) und den Frühgeborenen (< 37 Gestationswochen) der gesamten Studienpopulation am Tag der Geburt (Tag 1, $p=0,740$). Box-and-Whisker-Plot nach Tukey. In der Kontrollgruppe zeigte sich an Tag 1 eine signifikante Korrelation des Plasma-Zn mit dem Gestationsalter (B: $r=0,418^*$, $\beta=0,418$) und dem Geburtsgewicht (D: $r=0,584^{**}$, $\beta=0,584$). In der Infektionsgruppe bestand eine solche Korrelation weder für das Gestationsalter (C: $r= -0,253$, $p=0,268$, $\beta= -0,253$) noch für das Geburtsgewicht (E: $r= -0,320$, $p=0,157$, $\beta= -0,320$). r : Korrelationskoeffizient nach Pearson, β : standardisierter Regressionskoeffizient, $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**).

3.4. Kupfer/Zink-Koeffizient

3.4.1. Assoziation der Spurenelemente Kupfer und Zink miteinander

Das Plasma-Zn und das Plasma-Cu waren an Tag 1 weder in der Kontrollgruppe ($p=0,196$, $p=0,371$), noch in der Infektionsgruppe ($r= -0,084$, $p=0,718$) miteinander korreliert. Es zeigte sich jedoch eine signifikant positive Korrelation dieser Spurenelemente in der Infektionsgruppe an Tag 3 ($r= 0,550$, $p=0,007$).

3.4.2. Infektions- und Kontrollgruppe im Vergleich

Der Cu/Zn-Koeffizient war in der Infektionsgruppe (0,48 [0,30–0,61], Median [IQR]) signifikant höher als in der Kontrollgruppe (0,28 [0,23–0,34]) (Mann-Whitney-U-Test: $U=118$; $Z=-2,902$; $p=0,004$, Abbildung 9A).

3.4.3. Dynamik des Kupfer/Zink-Koeffizienten von Tag 1 zu Tag 3

In der Infektionsgruppe zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Cu/Zn-Koeffizienten von Tag 1 ($0,46 \pm 0,22$, Mittelwert \pm SD) zu Tag 3 ($0,62 \pm 0,27$), $p=0,002$, (Abbildung 9B).

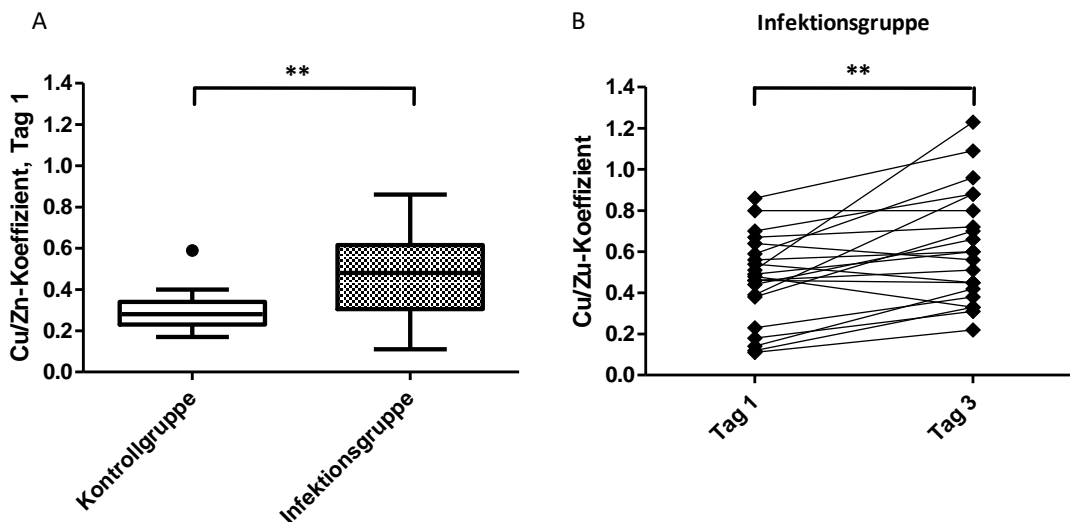


Abbildung 9. Der Kupfer/Zink (Cu/Zn) - Koeffizient in der Kontroll- und der Infektionsgruppe am Tag der Geburt (Tag 1) und Tag 3 nach der Geburt. (A) modifiziert aus *Figure 6* in [1]. Der Cu/Zn-Koeffizient war in der Kontrollgruppe signifikant niedriger als in der Infektionsgruppe. Box-Whisker-Plot nach Tukey. (B) In der Infektionsgruppe zeigte sich ein signifikanter Anstieg des mittleren Cu/Zn-Koeffizienten von Tag 1 ($0,46 \pm 0,22$) zu Tag 3 ($0,62 \pm 0,27$). $p<0,01$ (**).

3.4.4. Korrelation mit den Inflammationsmarkern IL-6 und CRP

In der Infektionsgruppe zeigte sich keine Korrelation des Cu/Zn-Koeffizienten an Tag 1 mit dem IL-6 ($\rho = -0,039$, $p = 0,870$, $\beta = 0,073$, Abbildung 10A). Der Cu/Zn-Koeffizient an Tag 1 war jedoch mit dem CRP an Tag 3 signifikant positiv korreliert ($r = 0,643^{**}$, $p = 0,002$, $\beta = 0,643$, Abbildung 10B). Der Cu/Zn-Koeffizient an Tag 3 korrelierte ebenfalls signifikant positiv mit dem CRP an Tag 3 nach der Geburt ($r = 0,612$, $p = 0,003$, $\beta = 0,612$, Abbildung 10C).

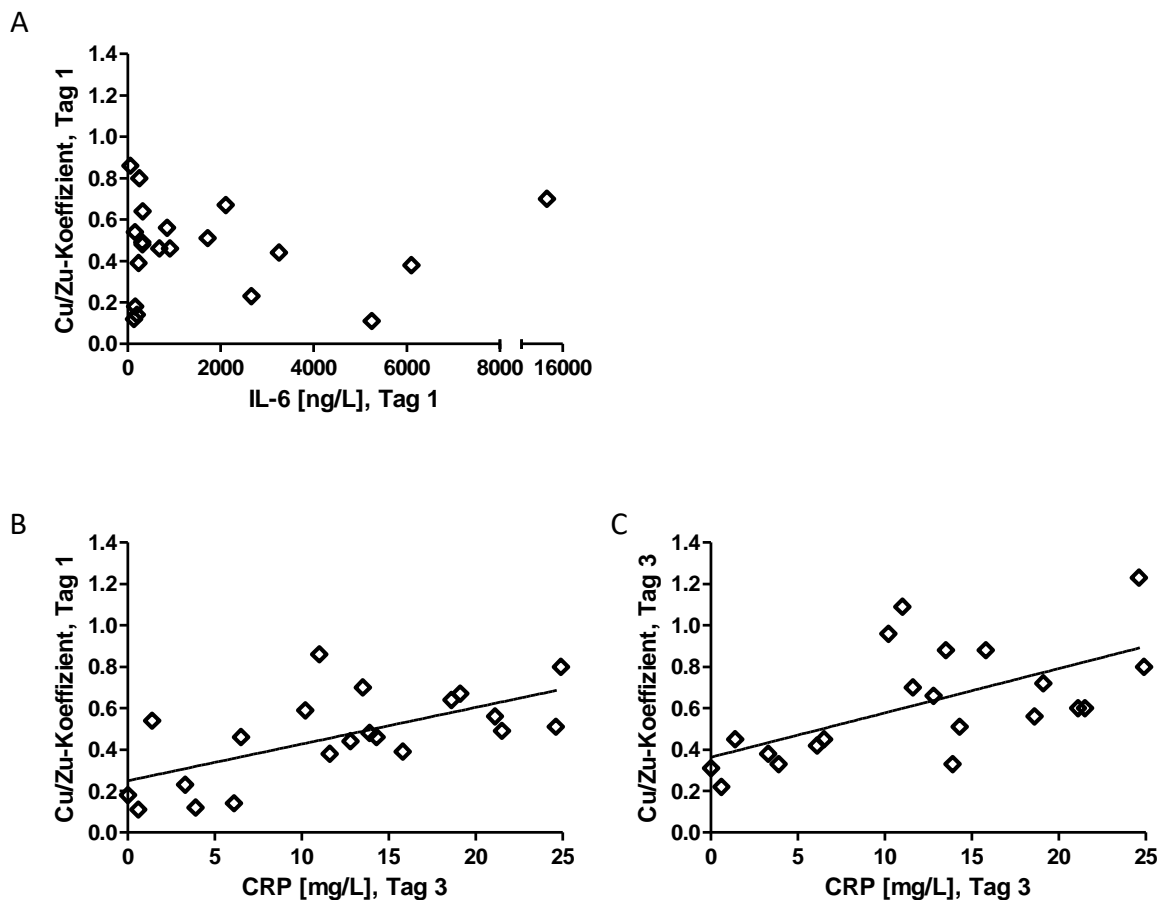


Abbildung 10. Die Korrelation des Kupfer/Zink (Cu/Zn) - Koeffizienten am Tag der Geburt (Tag 1) und Tag 3 nach der Geburt mit den Inflammationsmarkern in der Infektionsgruppe. Modifiziert aus Figure 6 in [1]. Der Cu/Zn-Koeffizient an Tag 1 korrelierte nicht mit dem IL-6 an Tag 1 (A: $\rho = -0,039$, $p = 0,870$, $\beta = 0,073$), jedoch zeigte sich eine signifikante Korrelation mit dem CRP an Tag 3 (B: $r = 0,643^{**}$, $\beta = 0,643$). Der Cu/Zn-Koeffizient an Tag 3 korrelierte ebenfalls signifikant positiv mit dem CRP an Tag 3 (C: $r = 0,612^{**}$, $\beta = 0,612$). ρ : Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman, r : Korrelationskoeffizient nach Pearson, β : standardisierter Regressionskoeffizient, $p < 0,01$ (**).

3.4.5. Korrelation mit Gestationsalter, Geburtsgewicht und Geschlecht

In der gesamten Studienpopulation zeigte sich eine signifikant positive Korrelation des Cu/Zn-Koeffizienten an Tag 1 mit dem Gestationsalter ($\rho=0,502$, $p=0,001$, $\beta=0,443$) und dem Geburtsgewicht ($\rho=0,387$, $p=0,01$, $\beta=0,271$). Der Cu/Zn-Koeffizient war bei Frühgeborenen (<37 Gestationswochen; 0,25 [0,17]) signifikant niedriger als bei termingerecht Geborenen (≥ 37 Gestationswochen; 0,46 [0,20]) der gesamten Studienpopulation (Mann-Whitney-U-Test: $U=101,0$; $Z=-3,23$; $p=0,001$, Abbildung 11A). Bei der separaten Analyse der Studiengruppen war in der Kontrollgruppe die Assoziation des Cu/Zn-Koeffizienten mit dem Gestationsalter vorhanden ($\rho=0,417$, $p=0,048$, $\beta=0,275$, Abbildung 11B), nicht jedoch mit dem Geburtsgewicht ($\rho=0,105$, $p=0,634$, $\beta=-0,122$, Abbildung 11D). In der Infektionsgruppe zeigte sich an Tag 1 weder eine Korrelation des Cu/Zn-Koeffizienten mit dem Gestationsalter ($r=0,332$, $p=0,141$, $\beta=0,332$, Abbildung 11C) noch mit dem Geburtsgewicht ($r=0,181$, $p=0,431$, $\beta=0,181$, Abbildung 11E). An Tag 3 zeigte sich in der Infektionsgruppe ebenfalls keine signifikante Korrelation zwischen dem Cu/Zn-Koeffizienten und dem Gestationsalter ($r=0,293$, $p=0,198$, $\beta=0,293$) oder dem Geburtsgewicht ($r=0,159$, $p=0,492$, $\beta=0,159$). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Cu/Zn-Koeffizienten bei weiblichen (0,31 [0,14]) und männlichen (0,45 [0,34]) Neugeborenen der gesamten Studienpopulation (Mann-Whitney-U-Test: $U=170,0$; $Z=-1,68$; $p=0,093$). Auch bei der separaten Analyse der Studiengruppen zeigte sich weder ein signifikanter Unterschied des Cu/Zn-Koeffizienten zwischen den Geschlechtern in der Kontrollgruppe an Tag 1 (weiblich: $0,28 \pm 0,06$, männlich: $0,31 \pm 0,14$, $p=0,552$) noch in der Infektionsgruppe an Tag 1 (weiblich: $0,4 \pm 0,18$, männlich: $0,5 \pm 0,23$, $p=0,368$) oder Tag 3 (weiblich: $0,51 \pm 0,2$, männlich: $0,67 \pm 0,29$, $p=0,265$).

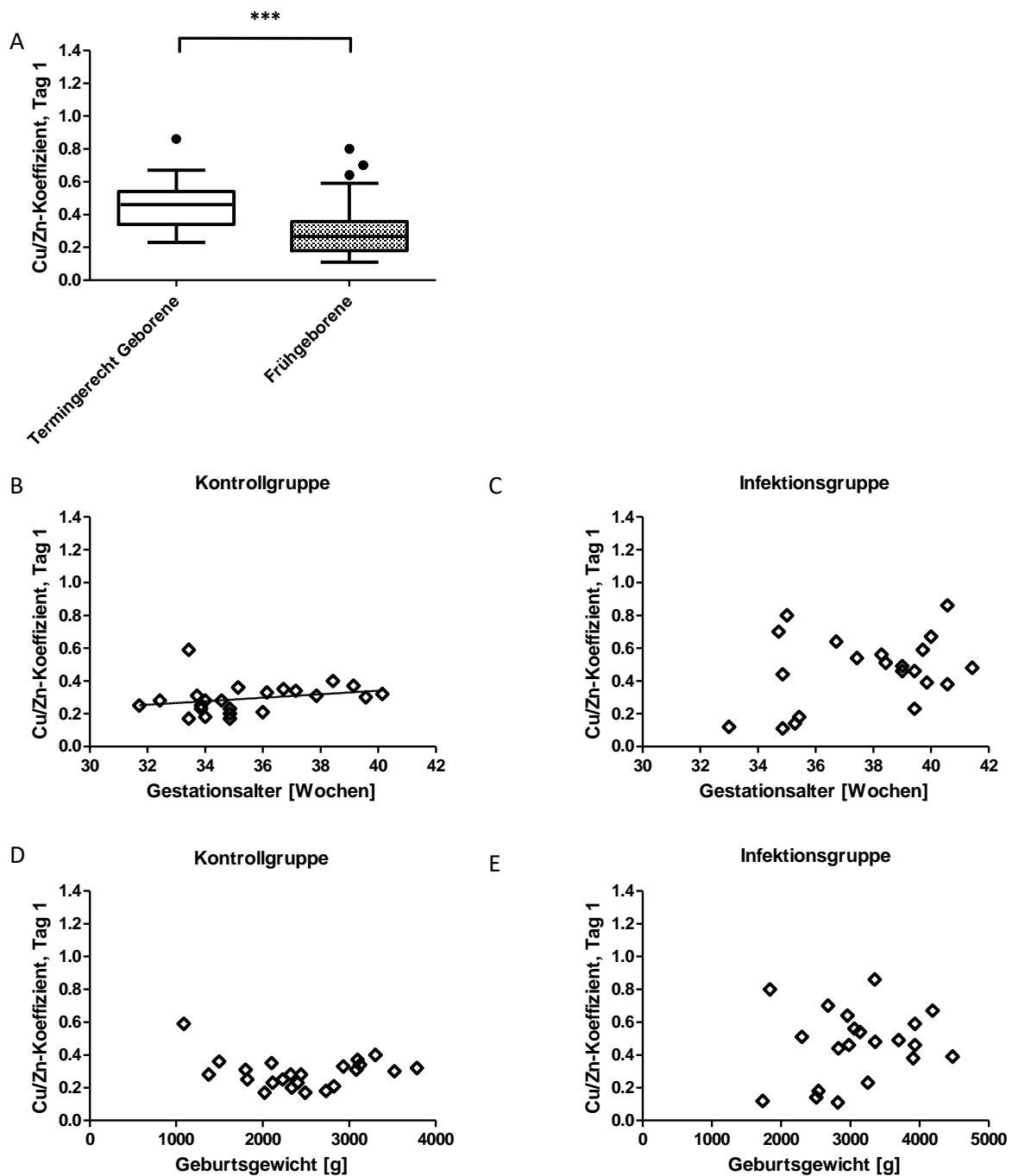


Abbildung 11. Die Korrelation des Kupfer/Zink (Cu/Zn) - Koeffizienten am Tag der Geburt (Tag 1) mit dem Gestationsalter und dem Geburtsgewicht. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem medianen Cu/Zn-Koeffizienten bei termingerechtere Geborenen (≥ 37 Gestationswochen) und Frühgeborenen (< 37 Gestationswochen) der gesamten Studienpopulation an Tag 1 (A: Mann-Whitney-U-Test: $U=101,0$; $Z=-3,23$). In der Kontrollgruppe korrelierte der Cu/Zn-Koeffizient signifikant mit dem Gestationsalter (B: $\rho=0,417^*$, $\beta=0,275$), nicht jedoch mit dem Geburtsgewicht (C: $\rho=0,105$, $\beta=-0,122$). In der Infektionsgruppe zeigte sich keine Korrelation des Cu/Zn-Koeffizienten mit dem Gestationsalter (D: $r=0,332$, $p=0,141$, $\beta=0,332$) oder mit dem Geburtsgewicht (E: $r=0,181$, $p=0,431$, $\beta=0,181$). ρ : Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman, r : Korrelationskoeffizient nach Pearson, β : standardisierter Regressionskoeffizient, $p < 0,05$ (*), $p < 0,001$ (***)

3.4.6. Eigenschaften des Cu/Zn-Koeffizienten als Biomarker

3.4.6.1. Confounder (Konfundierungseffekt)

Auf Grund der unterschiedlichen Verteilung des Gestationsalters in den Studiengruppen und der Korrelation des Cu/Zn-Koeffizienten mit dem Gestationsalter in der Kontrollgruppe wurde in Hinsicht auf einen möglichen konfundierenden Effekt die multinomiale logistische Regression mit Gestationsalter als Kovariate durchgeführt. Das Gestationsalter zeigte dabei keinen signifikanten Effekt ($p=0,079$) auf die Assoziation eines erhöhten Cu/Zn-Koeffizienten mit der Infektion ($p=0,034$) (Tabelle 6).

Tabelle 6. Multinomiale logistische Regression zur Prüfung der Assoziation des erhöhten Kupfer/Zink-Koeffizienten und der Infektion mit dem Gestationsalter als Kovariate. Modifiziert aus *Table 3.* in [1]. KI: Konfidenzintervall.

Parameter	Signifikanz	Odds Ratio	95% KI
Gestationsalter	0,079	1,310	0,969 – 1,770
Cu/Zn-Koeffizient	0,034	164,224	1,457 – 18506,693

3.4.6.2. ROC-Kurve

Um die Qualität des Cu/Zn-Koeffizienten als Biomarker zu untersuchen, wurde die Grenzwertoptimierungskurve (ROC-Kurve, abgekürzt aus dem Englischen: Receiver Operating Characteristic) berechnet (Abbildung 12). Es zeigte sich ein statistisch signifikantes Ergebnis mit einer Fläche unter der Kurve von 0,756. Anhand der Koordinaten der ROC-Kurve (Tabelle 7) kann ein Grenzwert für den Cu/Zn-Koeffizienten von $\geq 0,37$ (positiv beziehungsweise auffällig, wenn $\geq 0,37$) festgelegt werden. Für diesen Wert beträgt die Sensitivität 0,762 und die Spezifität 0,913.

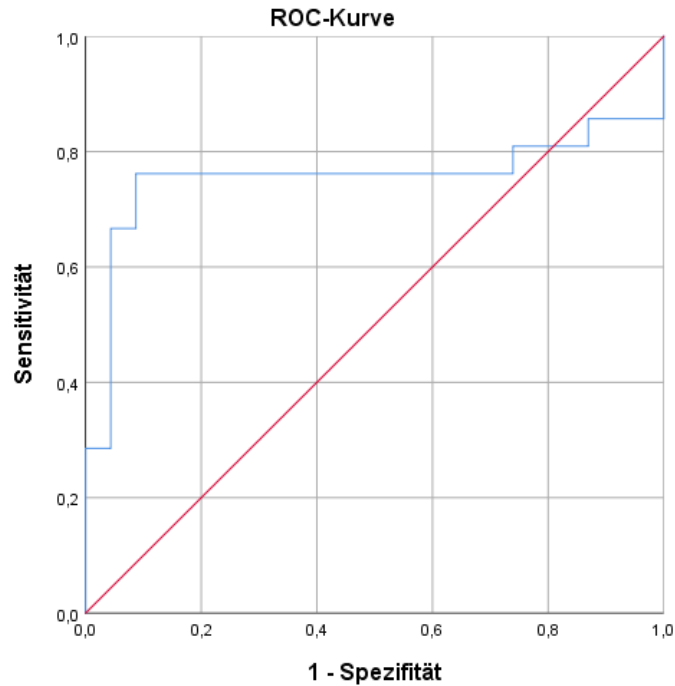


Abbildung 12. Die ROC-Kurve für den Kupfer/Zink (Cu/Zn) - Koeffizienten als Biomarker für konnatale bakterielle Infektionen. Die rote Linie stellt die Referenz-Diagonale dar (entsprechend einer Zufallswahrscheinlichkeit). Die blaue Linie entspricht der ROC-Kurve für den Cu/Zn-Koeffizienten. Fläche unter der Kurve: 0,756, Standardfehler: 0,087, asymptotische Signifikanz: 0,004, asymptotisches 95% Konfidenzintervall: 0,585 – 0,926.

Tabelle 7. Koordinaten der ROC-Kurve (siehe Abbildung 12) für den Kupfer/Zink (Cu/Zn) - Koeffizienten als Biomarker für konnatale bakterielle Infektionen. Markiert ist der ausgewählte Grenzwert für den Cu/Zn-Koeffizienten mit der dazugehörigen Sensitivität und Spezifität.

Positiv, wenn größer oder gleich	Sensitivität	1 - Spezifität
0,0000	1,000	1,000
0,1153	0,952	1,000
0,1302	0,905	1,000
0,1544	0,857	1,000
0,1713	0,857	0,957
0,1765	0,857	0,913
0,1814	0,857	0,870
0,1940	0,810	0,870
0,2053	0,810	0,826
0,2173	0,810	0,783
0,2284	0,810	0,739

0,2303	0,762	0,739
0,2388	0,762	0,696
0,2460	0,762	0,652
0,2624	0,762	0,609
0,2793	0,762	0,565
0,2821	0,762	0,522
0,2941	0,762	0,478
0,3050	0,762	0,435
0,3070	0,762	0,391
0,3133	0,762	0,348
0,3237	0,762	0,304
0,3332	0,762	0,261
0,3455	0,762	0,217
0,3545	0,762	0,174
0,3641	0,762	0,130
0,3745	0,762	0,087
0,3852	0,714	0,087
0,3986	0,667	0,087
0,4194	0,667	0,043
0,4470	0,619	0,043
0,4606	0,571	0,043
0,4711	0,524	0,043
0,4832	0,476	0,043
0,5005	0,429	0,043
0,5251	0,381	0,043
0,5478	0,333	0,043
0,5731	0,286	0,043
0,5884	0,286	0,000
0,6137	0,238	0,000
0,6524	0,190	0,000
0,6842	0,143	0,000
0,7520	0,095	0,000
0,8295	0,048	0,000
1,0000	0,000	0,000

3.4.6.3. Odds Ratio

Zur Berechnung des Quotenverhältnisses (Odds Ratio, abgekürzt OR) wurden Kreuztabellenanalysen durchgeführt. In der ersten Kreuztabellenanalyse (Tabelle 8) wurden anhand des Cu/Zn-Koeffizienten zwei Gruppen gebildet: die erste mit einem Cu/Zn-Koeffizienten >50. Perzentile (definiert als hoch, entsprechend einem Cu/Zn-Koeffizienten ab 0,34) sowie die zweite mit einem Cu/Zn-Koeffizienten <50. Perzentile (definiert als niedrig, entsprechend einem Cu/Zn-Koeffizienten bis einschließlich 0,33). Anhand dieser Tabelle wurde ein OR von 9,067 berechnet:

$$OR = \frac{16 \div 6}{5 \div 17} = 9,067$$

Das 95%-Konfidenzintervall beträgt dabei 2,306 – 35,650. Demnach bedeutet ein hoher Cu/Zn-Koeffizient (>50. Perzentile) eine höhere Chance für das Vorliegen einer Infektion als ein niedriger Cu/Zn-Koeffizient (<50. Perzentile).

Tabelle 8. Kreuztabellenanalyse: hoher bzw. niedriger Kupfer/Zink (Cu/Zn) - Koeffizient in Abhängigkeit vom Vorliegen einer Infektion.

	Hoher Cu/Zn-Koeffizient (>50. Perzentile)	Niedriger Cu/Zn-Koeffizient (<50. Perzentile)	n
Infektion	16 (72,7%)	5 (22,7%)	21
Keine Infektion (Kontrolle)	6 (27,3%)	17 (77,3%)	23
n	22 (100%)	22 (100%)	44

In der zweiten Kreuztabellenanalyse (Tabelle 9) wurden die Gruppen anhand des in der ROC-Analyse festgelegten Grenzwertes für den Cu/Zn-Koeffizienten gebildet: die erste Gruppe mit einem Cu/Zn-Koeffizienten $\geq 0,37$ sowie die zweite mit einem Cu/Zn-Koeffizienten <0,37. Anhand dieser Tabelle wurde ein OR von 21,3 berechnet:

$$OR = \frac{16 \div 3}{5 \div 20} = 21,3$$

Das 95%-Konfidenzintervall beträgt dabei 4,416 – 103,066. Ein Cu/Zn-Koeffizient $\geq 0,37$ bedeutet demnach eine höhere Chance für das Vorliegen einer Infektion.

Tabelle 9. Kreuztabellenanalyse: Kupfer/Zink (Cu/Zn) - Koeffizient $\geq 0,37$ bzw. $< 0,37$ in Abhängigkeit vom Vorliegen einer Infektion.

	Cu/Zn-Koeffizient $\geq 0,37$	Cu/Zn-Koeffizient $< 0,37$	n
Infektion	16 (76,2%)	5 (23,8%)	21
Keine Infektion (Kontrolle)	3 (13%)	20 (87%)	23
n	19 (43,2%)	25 (56,8%)	44

4. Diskussion

Die Pilotstudie verschafft neue Einblicke in den Spurenelementstatus des Neugeborenen sowie in die Pathophysiologie der Early-Onset-Infektion in Bezug auf die Mikroelementhomöostase und die Veränderung der Statusbiomarker. Es wird ein neuer Biomarker der konnatalen bakteriellen Infektion als Ergänzung des bisherigen diagnostischen Algorithmus mit hoher klinischer Relevanz identifiziert und vorgeschlagen.

4.1. Schwächen der Studie

Zu den Schwächen der Studie gehören die geringe Fallzahl sowie die signifikant unterschiedliche Verteilung des durchschnittlichen Gestationsalters, des Geburtsgewichts sowie des Geschlechts zwischen den Gruppen. Für die Studie wurden ausschließlich Restblutproben verwendet, was einen wichtigen Einfluss auf die Rekrutierung ausübte. Für die Kontrollgruppe konnte eine begrenzte Anzahl gesunder Reifgeborener rekrutiert werden, weil bei diesen nur selten eine routinemäßige Blutentnahme erfolgt. Dies bedingt den höheren Anteil Frühgeborener in der Kontrollgruppe, bei denen Laboranalysen insgesamt häufiger nötig werden. Ebenfalls auf Grund der Verwendung von ausschließlich Restblutproben lagen für die Kontrollgruppe keine Blutproben von Tag 3 nach der Geburt zur Analyse vor, sodass die Dynamik des Spurenelementhaushaltes in den ersten Tagen des Lebens zwischen der Kontroll- und der Infektionsgruppe nicht verglichen werden konnte.

4.2. Der Spurenelementstatus des Neugeborenen

Bis jetzt wurden nur wenige Publikationen über die Referenzwerte für Spurenelemente bei Neugeborenen veröffentlicht. Die Kenntnis des Cu- und Zn-Status des Neugeborenen ist von großer Relevanz, da diese Mikroelemente unter anderem essentiell für Wachstum und die Entwicklung des zentralen Nervensystems sind [12]. Insbesondere bei Frühgeborenen ist auf Grund der inadäquaten Spurenelement-Speicher zum Zeitpunkt der Geburt das Risiko für Defizienzen erhöht, sodass eine

frühzeitige Diagnose und häufig eine nutritive Intervention notwendig sind, um die Folgen eines Mangels an essentiellen Spurenelementen zu vermeiden [74,75].

Im Vergleich zu den bisher publizierten Plasma-Cu-Werten (Tabelle 10) und Plasma-Zn-Werten (Tabelle 11) bei Geburt zeigten sich in der vorliegenden Studie insbesondere in der Infektionsgruppe und bei Reifgeborenen hohe Plasma-Cu-Konzentrationen und insbesondere in der Kontrollgruppe und bei Reifgeborenen hohe Plasma-Zn-Konzentrationen. Diese Unterschiede könnten durch die unterschiedlichen Messmethoden bedingt sein. Im Vergleich zu den Referenzwerten für Erwachsene (Cu: 10 – 22 $\mu\text{mol/L}$ = 635,5 – 1398,0 $\mu\text{g/L}$; Zn: 12 – 18 $\mu\text{mol/L}$ = 784,6 – 1176,84 $\mu\text{g/L}$ [11]), waren die Plasma-Cu-Werte bei Neugeborenen in der vorliegenden Arbeit niedriger und die Plasma-Zn-Konzentrationen höher [1]. Dies stimmt mit den bislang publizierten Forschungsergebnissen überein [13,14].

Tabelle 10. Literaturvergleich: Kupfer-Konzentration im Blutplasma / Blutserum am Tag der Geburt

Studie (Jahr); Messmethode	Größe der Studien- population	Gesamt	Frühgeborene	Reifgeborene
Wisniewska et al. (2017) [1]; TXRF	Kontrolle: 23 Infektion: 21	519,5 \pm 185,0 $\mu\text{g/L}$ 627,9 \pm 282,5 $\mu\text{g/L}$	457,1 \pm 118,8 $\mu\text{g/L}$ 470,5 \pm 236,5 $\mu\text{g/L}$	696,5 \pm 233,8 $\mu\text{g/L}$ 724,7 \pm 271,5 $\mu\text{g/L}$
Finch et al. (2015) [74]	Review, Referenzbereich		30 – 40 $\mu\text{g/dL}$ (300 – 400 $\mu\text{g/L}$)	9 – 46 $\mu\text{g/dL}$ (90 – 460 $\mu\text{g/L}$)
Galinier et al. (2005) [76]; F-AAS	197 245		4,5 \pm 2,0 $\mu\text{mol/L}$ (286 \pm 127,1 $\mu\text{g/L}$)	6,7 \pm 2,1 $\mu\text{mol/L}$ (425,8 \pm 133,4 $\mu\text{g/L}$)
Perveen et al. (2002) [77]; AAS	9 (34 – 37 GW) 11		25,7 \pm 13,9 $\mu\text{g/dL}$ (257 \pm 139 $\mu\text{g/L}$)	36,0 \pm 7,7 $\mu\text{g/dL}$ (360 \pm 77 $\mu\text{g/L}$)
Lombeck et al. (1994) [12]; GF-AAS	129			6,1 \pm 2,2 $\mu\text{mol/L}$ (387,6 \pm 139,8 $\mu\text{g/L}$)
Higashi et al. (1982) [14]; AAS	21 20			0,34 \pm 0,07 $\mu\text{g/mL}$ (340 \pm 70 $\mu\text{g/L}$) 0,37 \pm 0,09 $\mu\text{g/mL}$ (370 \pm 90 $\mu\text{g/L}$)

TXRF: Totalreflexions-Röntgenfluoreszenz-Spektroskopie

AAS: Atomabsorptionsspektrometrie

F-AAS: Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie

GF-AAS: AAS mit Graphitrohrtechnik

GW: Gestationswochen

Tabelle 11. Literaturvergleich: Zink-Konzentration im Blutplasma / Blutserum am Tag der Geburt

Studie (Jahr); Messmethode	Größe der Studien- population	Gesamt	Frühgeborene	Reifgeborene
Wisniewska et al. (2017) [1]; TXRF	Kontrolle: 23 Infektion: 21	1804,6 ± 377,0 µg/L 1464,8 ± 439,3 µg/L	1728,2 ± 311,6 µg/L 1520,8 ± 552,1 µg/L	2021,0 ± 488,7 µg/L 1430,3 ± 374,7 µg/L
Finch et al. (2015) [74]	Review, Empfehlung für Referenzbereich		74 – 146 µg/dL (740 – 1460 µg/L)	
Galinier et al. (2005) [76]; F-AAS	202 240		20,4 ± 3,8 µmol/L (1333,8 ± 248,4 µg/L)	18,9 ± 3,1 µmol/L (1235,7 ± 202,7 µg/L)
Perveen et al. (2002) [77]; AAS	9 (34 – 37 GW) 11		89,4 ± 14,9 µg/dL (894 ± 149 µg/L)	87,0 ± 9,5 µg/dL (870 ± 95 µg/L)
Lombeck et al. (1994) [12]; GF-AAS	129			14,2 ± 3,1 µmol/L (928,4 ± 202,6 µg/L)
Vigi et al. (1984) [17]; F-AAS	14 14			1,10 ± 0,048 µg/mL (1100 ± 48 µg/L) 1,05 ± 0,038 µg/mL (1050 ± 38 µg/L)
Higashi et al. (1982) [14]; AAS	21 20			0,95 ± 0,19 µg/mL (950 ± 190 µg/L) 1,07 ± 0,23 µg/mL (1070 ± 230 µg/L)

TXRF: Totalreflexions-Röntgenfluoreszenz-Spektroskopie

AAS: Atomabsorptionsspektrometrie

F-AAS: Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie

GF-AAS: AAS mit Graphitrohrtechnik

GW: Gestationswochen

In der Kontrollgruppe zeigte sich am Tag der Geburt keine Korrelation zwischen den Konzentrationen von Plasma-Cu und -Zn, was mit bisherigen Forschungsergebnissen bei Frühgeborenen ohne Infektionszeichen [78] beziehungsweise bei gesunden Früh- und Reifgeborenen [77] übereinstimmt. In der Infektionsgruppe korrelierten Cu und Zn signifikant positiv miteinander an Tag 3 nach der Geburt. Eine Literaturrecherche ergab hierzu keine vergleichbaren Forschungsergebnisse.

In der vorliegenden Studie zeigte sich eine signifikant positive Korrelation der Plasma-Cu-Konzentration mit dem Gestationsalter in der Kontrollgruppe sowie signifikant niedrigere Cu-Werte bei Frühgeborenen im Vergleich zu Reifgeborenen. Dies ist im Einklang mit den bisher publizierten Daten [74,76]. Intrauterin ist ein Fetus vom mütterlichen Cu-Status abhängig, und ein Großteil der intrauterinen Cu-Akkumulation findet erst im dritten Trimenon statt [74].

In der Kontrollgruppe waren die Plasma-Zn-Werte ebenfalls signifikant positiv mit dem Gestationsalter korreliert. Laut Finch et al. werden zwei Drittel des Gesamtzinkbestandes eines Reifgeborenen innerhalb der letzten 10 bis 12 Schwangerschaftswochen von der Mutter in den kindlichen Organismus übertragen [74], was die positive Korrelation des kindlichen Zn mit dem Gestationsalter in der vorliegenden Arbeit erklären könnte. In der Literatur wurden jedoch auch gegenteilige Ergebnisse mit signifikant negativer Korrelation der Serum-Zn-Konzentration mit dem Gestationsalter beschrieben [76-78]. Möglicherweise unterscheidet sich die Dynamik der Zn-Konzentration im Blutplasma in einzelnen spezifischen Gestationsstadien. In der Arbeit von Galinier et al. zeigte sich beispielsweise ein biphasischer Verlauf der Zn-Werte mit signifikant negativer Korrelation mit dem Gestationsalter zwischen der 26. und 34. Gestationswoche und fehlender Korrelation in höheren Gestationsstadien [76]. In der Kontrollgruppe der vorliegenden Arbeit wurden Blutproben von Neugeborenen zwischen der 31. und der 40. Gestationswoche untersucht.

Das Geschlecht zeigte nach separater Analyse der Studiengruppen keine Korrelation mit den Plasma-Cu- und -Zn-Werten. Dies stimmt mit bisherigen Ergebnissen bei gesunden Reifgeborenen überein [12]. In der Literatur wurden erst für ältere Kinder und für Erwachsene geschlechtsspezifische Unterschiede der Spurenelementkonzentrationen im Blut beschrieben. In der Analyse von Liu et al. zeigten sich bei Kindern im Alter von 1 Monat bis 12 Jahren signifikante geschlechtsspezifische Unterschiede mit höheren Cu- und Zn-Werten im Blut bei Jungen im Vergleich zu Mädchen [79]. Laut Milne et al. weisen erwachsene Frauen höhere Plasma-Cu-Werte als Männer auf und die Cu-Konzentration im Blutplasma wird durch orale Östrogen-Zufuhr erhöht [10]. Es gibt wenige systematische Übersichtsarbeiten über den Verlauf der Geschlechtshormonkonzentration im Blut bei Neugeborenen in den ersten Tagen nach der Geburt. In der Übersichtsarbeit von Kuijper et al. wird eine hohe Konzentration

von Östrogenen im Nabelschnurblut beschrieben, die jedoch rasch nach der Geburt sinkt [80]. Die Daten zu geschlechtsspezifischen Unterschieden sind widersprüchlich, zeigen jedoch insgesamt nur für Östriol (schwache estrogen Wirkung) signifikante Unterschiede mit höheren Werten bei weiblichen als bei männlichen Neugeborenen [80]. Die Daten zur Konzentration von Testosteron im Nabelschnurblut zeigten enorme Abweichungen, sodass mögliche Unterschiede zwischen den Geschlechtern nicht abschließend beurteilt werden können [80]. Bei männlichen Neugeborenen waren die Konzentrationen von Inhibin B (Marker der Sertoli-Zell-Funktion) am Tag der Geburt gering über oder am oberen Referenzbereich der Werte, die bei 5 bis 10 Jahre alten Jungen beobachtet werden [81]. Ab dem 2. Lebenstag bis zum 6. Lebensmonat zeigten sich signifikant höhere Testosteron-Konzentrationen bei Jungen im Vergleich zu Mädchen [80]. Während die Testosteron-Konzentration bei Mädchen in den ersten Monaten nach der Geburt relativ konstant blieb, zeigte sich bei Jungen zwischen dem ersten und dritten Lebensmonat ein vorübergehender Anstieg der Testosteron-Konzentration auf pubertäre Konzentrationen [80,82]. Der Einfluss der Geschlechtshormone auf die Spurenelementhomöostase in den ersten Tagen und Monaten nach der Geburt bleibt ungeklärt.

4.2.1. Ceruloplasmin als Biomarker für den Plasma-Kupfer-Status bereits am Tag der Geburt

Plasma-Cu und -CP korrelierten am Tag der Geburt signifikant positiv miteinander. Dies ist mit den bisher publizierten Ergebnissen bei Neugeborenen [12] sowie bei gesunden Individuen und während inflammatorischer Prozesse bei erwachsenen Menschen und Tieren in Einklang [34]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit implizieren die Möglichkeit, CP als geeigneten Biomarker für den Plasma-Cu-Status bereits am Tag der Geburt zu bestimmen. Dies wäre mittels eines Bedside-Tests mit Hilfe immunologischer Verfahren wie zum Beispiel mit dem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) möglich [1]. Damit könnte ein wichtiger, für alle Körperzellen verfügbarer Cu-Anteil ermittelt werden, der beim Neugeborenen jedoch den Gesamtkörperbestand an Cu weniger präzise als beim Erwachsenen widerspiegelt. Dies ist in der unterschiedlichen Verteilung des Cu beim Neugeborenen und bei Erwachsenen begründet. Während sich beim Erwachsenen ca. 15% des Gesamtkörperbestandes an

Cu in der Leber befinden [83], beträgt dieser Anteil zum Zeitpunkt der Geburt ca. 50% [12,14]. Die Fähigkeit der fetalen Leber, Cu in Apoceruloplasmin zu integrieren, ist im Vergleich zur hepatischen Funktion des Erwachsenen stark eingeschränkt [13]. Nach der Geburt sinkt die Cu-Konzentration in der Leber und die Cu- und CP-Werte im Blutserum steigen [14]. Der hepatische Cu-Speicher scheint Reifgeborenen zu ermöglichen, die Plasma-Cu-Konzentration postnatal unabhängig von der Cu-Zufuhr adäquat zu regulieren [14].

Um den metabolisch aktiven Cu-Anteil sowie die Cu-Speicher des Organismus genauer bestimmen zu können, wird in der Literatur die Aktivität kupferabhängiger Enzyme als Biomarker des Cu-Status diskutiert. In der Arbeit von Milne et al. wird die Cytochrom-c-Oxidase als sensitiver Marker für die Cu-Speicher vorgeschlagen [10]. Im Tierversuch zeigte sich eine Korrelation zwischen der Aktivität des Enzyms in Thrombozyten und der Cu-Konzentration in der Leber [10]. De Romana et al. diskutieren die Aktivität kupferabhängiger Enzyme (Superoxiddismutase in Erythrozyten, Cytochrom-c-Oxidase in Thrombozyten, Diaminoxidase im Blutplasma) als besseren Cu-Biomarker während inflammatorischer Prozesse, da die Veränderung der Cu-Konzentration im Blut im Rahmen der Akute-Phase-Reaktion eine Cu-Defizienz bei der Bestimmung der Plasma-Cu-Werte alleine maskieren könnte [18]. Die Bestimmung der Enzymaktivität ist jedoch aufwendig und nur bei niedrigem Cu-Status sinnvoll, wobei Cut-off-Werte bei schwerer Cu-Defizienz (zum Beispiel für die Aktivität der Superoxiddismutase in Erythrozyten) noch nicht etabliert sind [35]. Bei hohem Cu-Angebot ist die Aktivität kupferabhängiger Enzyme als Cu-Biomarker nicht geeignet [35].

4.3. Konnatale Infektionen als Disruptoren des Spurenelementhaushaltes bei Neugeborenen

Am Tag der Geburt zeigte sich in der Kontrollgruppe eine signifikante Korrelation der Plasma-Cu- und -Zn-Konzentration mit dem Gestationsalter. Diese Korrelation war in der Infektionsgruppe nicht vorhanden, was darauf schließen lässt, dass konnatale bakterielle Infektionen Disruptoren des Spurenelementhaushaltes bei Neugeborenen sind.

4.3.1. Kupfer

Die Plasma-Cu-Werte am Tag der Geburt zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontroll- und der Infektionsgruppe. Im Gegensatz dazu zeigten bisherige Studien bei erwachsenen Menschen und Tieren eine signifikant positive Assoziation des Serum- oder Plasma-Cu mit Inflammation [34]. Ein Anstieg der Plasma-Cu-Konzentration während akuter Infektionserkrankungen erscheint biologisch sinnvoll, da ein Cu-Exzess direkte bakterizide Eigenschaften besitzt [84]. In der vorliegenden Arbeit hatte die Ungleichverteilung des Gestationsalters einen signifikanten Effekt auf die Cu-Werte in den Studiengruppen, was bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden muss. Die eingeschränkte Inkorporation von Cu in das CP-Apoenzym in der fetalen Leber [13] (siehe Kapitel 4.2.1. *Ceruloplasmin als Biomarker für den Plasma-Kupfer-Status bereits am Tag der Geburt*) könnte ebenfalls ein Grund für den geringeren Anstieg der Plasma-Cu-Werte während einer Inflammation zum Zeitpunkt der Geburt im Vergleich zum Erwachsenenalter sein. Ob die Zunahme der Plasma-Cu-Konzentration und der CP-Werte in der Infektionsgruppe von Tag 1 zu Tag 3 nach der Geburt allein auf Grund der steigenden Leberfunktion oder im Rahmen einer späten Akute-Phase-Reaktion stattfindet, kann im Rahmen der vorliegenden Studie nicht abschließend beantwortet werden. Ein Vergleich mit dem Verlauf der Cu- und CP-Werte in der Kontrollgruppe ist auf Grund der fehlenden Blutproben von Tag 3 in dieser Studiengruppe nicht möglich. Bisherige Studien berichten einen signifikanten Anstieg der Plasma-Cu- und -CP-Konzentrationen innerhalb der ersten 4 Monate des Lebens [12]. Der physiologische Verlauf der Spurenelement-Werte im Blut innerhalb der ersten Tage nach der Geburt ist bisher nicht ausreichend erforscht und es bedarf weiterer Studien, um dies zu untersuchen.

Bei der Analyse des Zusammenhanges der Plasma-Cu- und der -CP-Konzentration mit etablierten Inflammationsmarkern zeigte sich an Tag 1 und Tag 3 eine signifikant positive Korrelation mit dem CRP an Tag 3. Dies stimmt mit den bisherigen Studienergebnissen bei hospitalisierten Neugeborenen überein [85]. Das Ergebnis lässt einen prädiktiven Wert der Plasma-Cu- und CP-Konzentration zum Zeitpunkt der Geburt für den Verlauf der Erkrankung sowie deren Bedeutung als klinische Verlaufparameter in den folgenden Tagen vermuten.

4.3.2. Zink

In der Infektionsgruppe zeigten sich niedrigere Plasma-Zn-Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe, was mit früheren Erkenntnissen bei Kindern, Erwachsenen und Tieren mit akuten inflammatorischen und kritischen Erkrankungen übereinstimmt [7,11,19,36,86]. Die Reduktion des Plasma-Zn während bakterieller Infektionen erscheint biologisch sinnvoll, da Zn nicht nur für die menschlichen Zellen, sondern auch für die Proliferation der Pathogene essentiell ist [19].

Die Zn-Werte korrelierten weder am Tag der Geburt noch an Tag 3 nach der Geburt mit den etablierten Inflammationsmarkern IL-6 und CRP. Studien bei Erwachsenen zeigten im Gegensatz dazu eine signifikant negative Assoziation des Plasma-Zn mit den Inflammationsmarker IL-6 [87] und CRP [11,88,89]. Möglicherweise unterscheidet sich die Pathophysiologie der Zn-Veränderungen während einer Inflammation in den ersten Tagen des Lebens von derjenigen im Erwachsenenalter und folgt bei Neugeborenen dem Alles-oder-Nichts-Prinzip, ohne die Schwere des entzündlichen Prozesses widerzuspiegeln [1]. Eine andere mögliche Erklärung für das Ergebnis wäre, dass ein niedriger Zn-Status am Tag der Geburt keine Konsequenz, sondern ein Risikofaktor ist, der durch die Verschlechterung der Immunfunktion zur Entstehung der Infektion beigetragen hat [1,31].

4.4. Potenzielle neue Biomarker bei konnatalen bakteriellen Infektionen

4.4.1. Kupfer, Ceruloplasmin und Zink

Plasma-Cu, -CP und -Zn zeigten in der vorliegenden Arbeit separat betrachtet keine ausreichende Eignung als Biomarker einer Early-Onset-Infektion. Die Ergebnisse lassen zwar für Plasma-Cu und -CP einen prädiktiven Wert sowie eine Bedeutung als klinische Verlaufsparemeter vermuten, die Cu-Werte waren jedoch zwischen der Kontroll- und der Infektionsgruppe nicht signifikant unterschiedlich, was den Parameter als geeigneten Biomarker für konnatale bakterielle Infektionen ausschließt. Die Plasma-Zn-Konzentration in der Infektionsgruppe war signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe, es zeigte sich jedoch keine Korrelation mit etablierten Inflammationsmarkern. Die unterschiedlichen Qualitäten und die gegenläufigen

Veränderungen beider Spurenelemente kommen in Form des Cu/Zn-Koeffizienten zusammen, deren Eigenschaften als Biomarker im Folgenden dargestellt werden.

4.4.2. Kupfer/Zink-Koeffizient

Der Cu/Zn-Koeffizient war signifikant unterschiedlich zwischen den Studiengruppen. In der Infektionsgruppe korrelierte der Koeffizient zum Zeitpunkt der Geburt zwar nicht mit dem IL-6 an Tag 1, es zeigte sich jedoch eine signifikante Korrelation mit dem CRP an Tag 3, was einen prädiktiven Wert des Cu/Zn-Koeffizienten für den Verlauf der Erkrankung vermuten lässt [1]. Auch der Cu/Zn-Koeffizient an Tag 3 korrelierte mit dem CRP an Tag 3, was für dessen Eignung als klinischer Verlaufsparemeter spricht. Bisherige Studien in Erwachsenen zeigten eine Korrelation des Cu/Zn-Koeffizienten mit dem CRP bei Frauen und Männern nach der Korrektur für Alter sowie eine Korrelation mit dem IL-6 nur bei Männern [59].

Im Rahmen der ROC-Kurven-Analyse zeigte sich bei einer Fläche unter der Kurve von 0,756 eine mittlere Qualität des Tests. Es wurde ein Grenzwert für den Cu/Zn-Koeffizienten von 0,37 festgelegt, unter dessen Annahme zwar eine geringe Sensitivität, jedoch eine hohe Spezifität für den Test berechnet wurde. Damit wäre der Cu/Zn-Koeffizient eine gute Ergänzung des bisherigen diagnostischen Algorithmus bei Verdacht auf das Vorliegen einer neonatalen Infektion, der sich durch eine hohe Sensitivität, aber eine unzureichende Spezifität auszeichnet. Die Etablierung eines solchen Biomarkers hat eine hohe klinische Relevanz, da eine sichere Vermeidung unnötiger antibiotischer Behandlungen bei Neugeborenen zur Reduktion möglicher Medikamentennebenwirkungen und der Antibiotikaresistenzentwicklung beitragen würde.

Die unterschiedliche Verteilung des Gestationsalters in den Studiengruppen zeigte in der multinomialen logistischen Analyse keinen signifikanten konfundierenden Effekt auf die Assoziation des Cu/Zn-Koeffizienten mit der Infektion. Da jedoch eine Korrelation der Cu/Zn-Koeffizienten mit dem Gestationsalter in der gesamten Studienpopulation sowie in der Kontrollgruppe vorliegt, wäre eine Definition von altersspezifischen Referenzbereichen für den Koeffizienten notwendig. Dies ist im Rahmen der vorliegenden Pilotstudie auf Grund der zu kleinen Studienpopulation nicht möglich.

Bisherige Studien bei Erwachsenen beschrieben ebenfalls eine signifikante Assoziation des Cu/Zn-Koeffizienten mit dem Alter [59]. Das Geschlecht des Neugeborenen hatte in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf den Cu/Zn-Koeffizienten. Dies stimmt mit bisherigen Ergebnissen zur Korrelation von Cu und Zn einzeln betrachtet mit dem Gestationsalter bei Neugeborenen überein [12] (siehe Kapitel 4.2. *Der Spurenelementstatus des Neugeborenen*). Bei Erwachsenen sind im Gegensatz dazu auf Grund der hormonellen Einflüsse geschlechtsspezifische Unterschiede des Cu/Zn-Koeffizienten zu erwarten. In der Arbeit von Malavolta et al. zeigte sich dementsprechend ein deutlicher Zusammenhang des Cu/Zn-Koeffizienten mit dem Geschlecht bei erwachsenen Menschen mit höheren Werten bei Frauen als bei Männern [59].

Insgesamt zeigte sich der Cu/Zn-Koeffizient als ein vielversprechender neuer Biomarker für neonatale Early-Onset-Infektion. Größere Studien sind nötig, um dieses Ergebnis zu verifizieren.

4.5. Exkurs: mögliche adjuvante Therapiestrategien bei konnatalen bakteriellen Infektionen

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich bei Neugeborenen mit Early-Onset-Infektionen signifikant niedrigere Plasma-Zn-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Wie bereits beschrieben, führt eine Zn-Defizienz zur Beeinträchtigung der Immunfunktion [7]. Infektionserkrankungen können wiederum eine Reduktion der Plasma-Zn-Konzentration verursachen [7,31]. Die Unterbrechung dieses Circulus vitiosus oder ein Ausgleich des Spurenelementdefizites bereits bevor die Infektion auftritt stellen plausible Strategien zur adjuvanten Behandlung und Prävention konnataler Infektionen dar. Zn entfaltet eine direkte bakterizide Wirkung, indem es die Aufnahme anderer für die Pathogene essentieller Elemente verhindert und die Aktivität von Schlüsselenzymen der Bakterienzelle hemmt [84]. Frühere Studien zeigten eine signifikante Reduktion der Häufigkeit von postnatalen Infektionen bei Neugeborenen mit niedrigem Geburtsgewicht, deren Mütter Zn-Supplemente während der Schwangerschaft erhielten [31,90]. Bei Neugeborenen, die als small for gestational age (SGA; aus dem Englischen: zu klein bezogen auf das Gestationsalter) eingeordnet wurden, zeigte sich eine Reduktion der Infektuszeptibilität durch postnatale Zn-Supplementierung

[31,91,92]. Eine randomisierte und Placebo-kontrollierte Studie ergab, dass die orale Zn-Supplementierung bei 2 bis 23 Monate alten Kindern mit schwerer Pneumonie zur Beschleunigung der Genesung und Verkürzung der Hospitalisierung führte [93]. Eine weitere Supplementierungsstudie bei 2 bis 24 Monate alten Kindern mit Pneumonie zeigte keine Vorteile der adjuvanten oralen Therapie mit Zn in der gesamten Studienpopulation. Die Autoren berichten jedoch von einer möglichen Reduktion der Krankheitsdauer in einer Subgruppe mit sehr schwerer Pneumonie [94]. Eine Cochrane-Metaanalyse ergab, dass die Zn-Supplementierung das Mortalitätsrisiko auf Grund von Infektionen des Respirationstraktes und Malaria sowie das allgemeine Mortalitätsrisiko bei 6 bis 12 Jahre alten Kindern reduziert [95].

Nach der Analyse der beschriebenen Studienergebnisse scheint eine Zn-Supplementierung eine vielversprechende Strategie zur Verbesserung der Immunfunktion zu sein. Bei Neugeborenen mit Early-Onset-Infektionen könnte diese nicht nur einen positiven Einfluss auf die Immunfunktion ausüben, sondern auch zur Reduktion des oxidativen Stresses führen. Die perinatale Phase ist für die Entwicklung des Nervensystems kritisch [15]. Die Disruption der Zn-Homöostase durch eine Infektion in dieser vulnerablen Phase kann die neuronale Apoptose triggern und bleibende Beeinträchtigungen des Nervensystems nach sich ziehen [15,96]. Weitere Studien sind nötig, um mögliche Vorteile einer Zn-Supplementierung in den ersten Tagen des Lebens bei Neugeborenen mit konnatalen bakteriellen Infektionen zu evaluieren. Sowohl eine Zn-Defizienz, als auch ein Zn-Überschuss kann zu Schädigung der Gesundheit führen, sodass besondere Vorsicht und Berücksichtigung von potenziellen Nebenwirkungen von großer Bedeutung sind. Bei oraler Zn-Supplementierung bei Kindern (6 Monate bis 12 Jahre alt) wurde Erbrechen als Nebenwirkung berichtet [95]. Eine intravenöse Gabe von ZnSO₄ in einer Dosierung bis zu 750 µg/kg/Tag durch einen zentralen Venenzugang in kritisch erkrankten pädiatrischen Patienten verursachte keine Nebenwirkungen [86]. In Studien mit erwachsenen Teilnehmern waren Nebenwirkungen bei Zn-Gabe in der empfohlenen Dosierung selten. Zu diesen zählten: abdominale Schmerzen, Erbrechen, Diarrhö, Abfall des Serum-Cu, Anämie, Neutropenie und beeinträchtigte Immunantwort [37]. Erhöhte Zn-Konzentrationen im Blut resultieren in einer Inhibition der T-Zell-Funktion, was im gesunden Organismus eine Rolle in der Hemmung der Alloreaktivität spielt [19],

während bakterieller Infektionen jedoch einen negativen Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben könnte.

Obwohl ein adäquater Cu-Status ebenfalls eine wichtige Rolle für das Immunsystem spielt und eine Supplementierung bei Cu-Defizienz zur Erholung der Funktion der Immunzellen führt [84], ist eine Cu-Supplementierung während akuter bakterieller Infektionen bei Neugeborenen sehr kritisch zu betrachten. Laut Bo et al. ist eine Cu-Supplementierung trotz positiver metabolischer Effekte (im Tiermodell und bei erwachsenen Menschen) auf Grund des Zusammenhanges von Cu mit Inflammation, oxidativem Stress und erhöhtem kardiovaskulären Risiko nicht erwünscht [35].

4.6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass konnatale bakterielle Infektionen Disruptoren des Spurenelementhaushaltes eines Neugeborenen sind.

Die Plasma-Cu-Konzentration zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontroll- und der Infektionsgruppe. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Plasma-Cu vom Tag der Geburt bis zum Tag 3 nach der Geburt in der Infektionsgruppe, was durch eine späte Akute-Phase-Reaktion oder durch die steigende Leberfunktion verursacht sein könnte. Das CP im Blutplasma scheint ein geeigneter Biomarker für den Plasma-Cu-Status bereits in den ersten Tagen des Lebens zu sein, da sich eine starke Korrelation der CP-Werte mit der Cu-Konzentration an Tag 1 und Tag 3 zeigte. Des Weiteren korrelierte CP mit dem CRP an Tag 3 nach der Geburt, sodass CP möglicherweise als Indikator des klinischen Verlaufes fungieren könnte.

Neugeborene mit Early-Onset-Infektionen wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant niedrigere Plasma-Zn-Konzentrationen am Tag der Geburt auf. Dies könnte ein Risikofaktor für die Infektsuszeptibilität darstellen und/oder eine Folge der Inflammation sein.

In der Studie wurde der Cu/Zn-Koeffizient als ein vielversprechender Biomarker für Early-Onset-Infektionen identifiziert. Auf Grund der hohen Sensitivität könnte der Parameter eine wertvolle Ergänzung des aktuellen diagnostischen Algorithmus darstellen. Der Cu/Zn-Koeffizient scheint einen prädiktiven Wert sowie Qualitäten eines klinischen Verlaufsparmeters zu besitzen.

Die pathophysiologischen Zusammenhänge zwischen dem Spurenelement-Status, der Infektusstabilität und der Infektion lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Zn-Supplementierung eine plausible adjuvante Therapiemöglichkeit zur Verbesserung der Immunfunktion sowie Reduktion der oxidativen Schäden darstellen könnte. Es bedarf weiterer klinischer Studien zur Evaluierung der Vorteile einer Supplementierung, der möglichen Nebenwirkungen sowie der optimalen Dosierung.

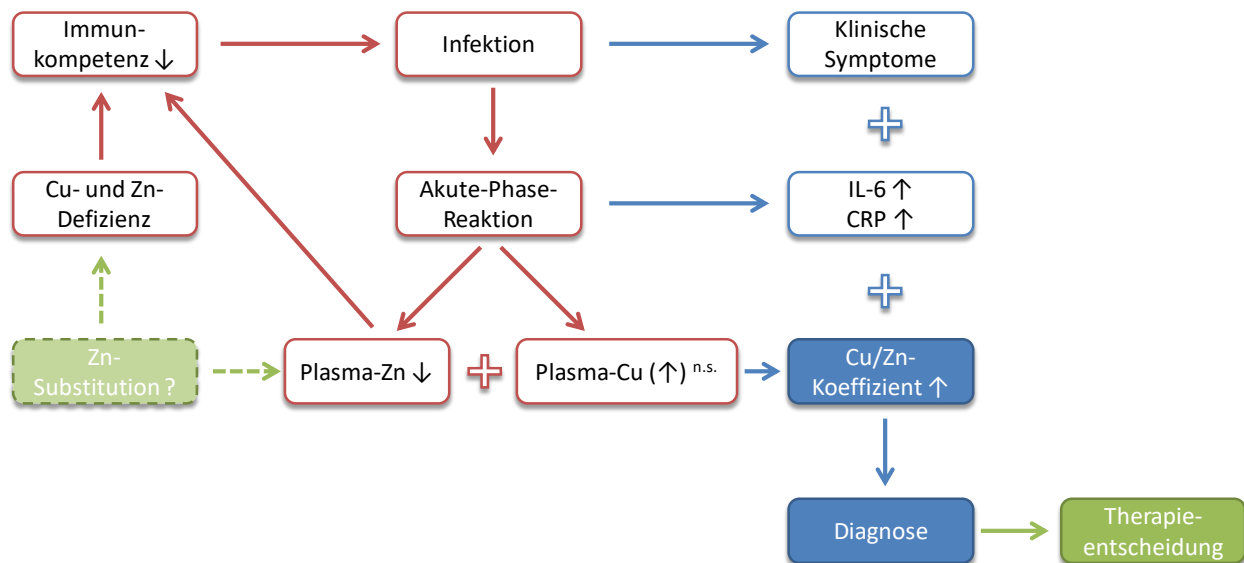


Abbildung 13. Die Rolle der Spurenelemente Kupfer (Cu) und Zink (Zn) bei konnatalen bakteriellen Infektionen schematisch zusammengefasst. Eine Cu- und Zn-Defizienz führen zur Beeinträchtigung der Immunkompetenz und begünstigen somit das Auftreten von Infektionen. Im Rahmen der Akute-Phase-Reaktion bei einer Infektion kommt es wiederum zu Veränderungen der Plasma-Cu- und Zn-Konzentrationen (Ergebnis für Cu in der vorliegenden Arbeit nicht signifikant (n.s.)). Zum einen haben diese Veränderungen beider Spurenelemente in Form des Cu/Zn-Koeffizienten einen diagnostischen Wert und können den aktuell etablierten diagnostischen Algorithmus ergänzen und damit die Therapieentscheidung unterstützen. Zum anderen beeinflusst die reduzierte Plasma-Zn-Konzentration die Immunkompetenz, sodass eine Zn-Substitution eine denkbare prophylaktische und adjuvante Therapiestrategie bei Early-Onset-Infektionen darstellt.

Literaturverzeichnis

1. Wisniewska, M.; Cremer, M.; Wiehe, L.; Becker, N.P.; Rijntjes, E.; Martitz, J.; Renko, K.; Buhner, C.; Schomburg, L. Copper to zinc ratio as disease biomarker in neonates with early-onset congenital infections. *Nutrients* **2017**, *9*.
2. Wiehe, L.; Cremer, M.; Wisniewska, M.; Becker, N.P.; Rijntjes, E.; Martitz, J.; Hybsier, S.; Renko, K.; Buhner, C.; Schomburg, L. Selenium status in neonates with congenital infection. *The British journal of nutrition* **2016**, *116*, 504-513.
3. Skalnaya, M.G., Skalny, A. V. Essential trace elements in human health: A physician's view. Tomsk : Publishing House of Tomsk State University, 2018.
4. Nordberg, M.; Nordberg, G.F. Trace element research-historical and future aspects. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements* **2016**, *38*, 46-52.
5. WHO. Trace elements in human nutrition and health *World Health Organization Geneva* **1996**.
6. Fraga, C.G. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Molecular aspects of medicine* **2005**, *26*, 235-244.
7. Bonaventura, P.; Benedetti, G.; Albareda, F.; Miossec, P. Zinc and its role in immunity and inflammation. *Autoimmunity reviews* **2015**, *14*, 277-285.
8. Stern, B.R. Essentiality and toxicity in copper health risk assessment: Overview, update and regulatory considerations. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* **2010**, *73*, 114-127.
9. Großklaus, R. Nutzen-risiko-abschätzung von mineralstoffen – ein problem bei der festlegung von grenzwerten zwischen essentialität und toxizität. In *Nutzen-risiko-bewertung von mineralstoffen und spurenelementen. Biochemische, physiologische und toxikologische aspekte.*, Andrea Hartwig, B.K.a.B.M.d., Ed. KIT Scientific Publishing KIT Scientific Publishing 2013; pp 7-41.
10. Milne, D.B. Copper intake and assessment of copper status. *American Journal of Clinical Nutrition* **1998**, *67*, 1041s-1045s.
11. Stefanowicz, F.; Gashut, R.A.; Talwar, D.; Duncan, A.; Beulshausen, J.F.; McMillan, D.C.; Kinsella, J. Assessment of plasma and red cell trace element concentrations, disease severity, and outcome in patients with critical illness. *Journal of critical care* **2014**, *29*, 214-218.
12. Lombeck, I.; Fuchs, A. Zinc and copper in infants fed breast-milk or different formula. *European journal of pediatrics* **1994**, *153*, 770-776.
13. Salmenpera, L.; Perheentupa, J.; Pakarinen, P.; Siimes, M.A. Cu nutrition in infants during prolonged exclusive breast-feeding: Low intake but rising serum concentrations of cu and ceruloplasmin. *The American journal of clinical nutrition* **1986**, *43*, 251-257.
14. Higashi, A.; Ikeda, T.; Uehara, I.; Matsuda, I. Effect of low-content zinc and copper formula on infant nutrition. *European journal of pediatrics* **1982**, *138*, 237-240.
15. Chasapis, C.T.; Loutsidou, A.C.; Spiliopoulou, C.A.; Stefanidou, M.E. Zinc and human health: An update. *Archives of toxicology* **2012**, *86*, 521-534.
16. Salim, S.; Farquharson, J.; Arneil, G.C.; Cockburn, F.; Forbes, G.I.; Logan, R.W.; Sherlock, J.C.; Wilson, T.S. Dietary copper intake in artificially fed infants. *Archives of disease in childhood* **1986**, *61*, 1068-1075.
17. Vigi, V.; Chierici, R.; Osti, L.; Fagioli, F.; Rescazzi, R. Serum zinc concentration in exclusively breast-fed infants and in infants fed an adapted formula. *European journal of pediatrics* **1984**, *142*, 245-247.
18. de Romana, D.L.; Olivares, M.; Uauy, R.; Araya, M. Risks and benefits of copper in light of new insights of copper homeostasis. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements* **2011**, *25*, 3-13.
19. Rink, L.; Gabriel, P. Zinc and the immune system. *The Proceedings of the Nutrition Society* **2000**, *59*, 541-552.

20. Linder, M.C. Ceruloplasmin and other copper binding components of blood plasma and their functions: An update. *Metallomics : integrated biometal science* **2016**, *8*, 887-905.
21. Uriu-Adams, J.Y.; Keen, C.L. Copper, oxidative stress, and human health. *Molecular aspects of medicine* **2005**, *26*, 268-298.
22. Maret, W. Zinc biochemistry: From a single zinc enzyme to a key element of life. *Advances in nutrition* **2013**, *4*, 82-91.
23. Prashanth L, K.K., Chitturi RT, Baddam VR, Prasad LK. A review on role of essential trace elements in health and disease. *J NTR Univ Health Sci* **2015**, *4*, 75-85.
24. Stefanidou, M.; Maravelias, C.; Dona, A.; Spiliopoulou, C. Zinc: A multipurpose trace element. *Archives of toxicology* **2006**, *80*, 1-9.
25. Roohani, N.; Hurrell, R.; Kelishadi, R.; Schulin, R. Zinc and its importance for human health: An integrative review. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences* **2013**, *18*, 144-157.
26. Gaier, E.D.; Eipper, B.A.; Mains, R.E. Copper signaling in the mammalian nervous system: Synaptic effects. *Journal of neuroscience research* **2013**, *91*, 2-19.
27. Percival, S.S. Copper and immunity. *The American journal of clinical nutrition* **1998**, *67*, 1064S-1068S.
28. Bonham, M.; O'Connor, J.M.; Hannigan, B.M.; Strain, J.J. The immune system as a physiological indicator of marginal copper status? *The British journal of nutrition* **2002**, *87*, 393-403.
29. Kenneth Murphy, C.W. *Janeway immunologie*. 9. Auflage ed.; Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg: 2018.
30. Maggini, S.; Wintergerst, E.S.; Beveridge, S.; Hornig, D.H. Selected vitamins and trace elements support immune function by strengthening epithelial barriers and cellular and humoral immune responses. *The British journal of nutrition* **2007**, *98 Suppl 1*, S29-35.
31. Krebs, N.F.; Miller, L.V.; Hambidge, K.M. Zinc deficiency in infants and children: A review of its complex and synergistic interactions. *Paediatrics and international child health* **2014**, *34*, 279-288.
32. Organization, W.H. *Global health risks: Mortality and burden of disease attributable to selected major risks*; 2009.
33. Gaetke, L.M.; Chow-Johnson, H.S.; Chow, C.K. Copper: Toxicological relevance and mechanisms. *Archives of toxicology* **2014**, *88*, 1929-1938.
34. Milanino, R.; Marrella, M.; Gasperini, R.; Pasqualicchio, M.; Velo, G. Copper and zinc body levels in inflammation: An overview of the data obtained from animal and human studies. *Agents and actions* **1993**, *39*, 195-209.
35. Bo, S.; Durazzo, M.; Gambino, R.; Berutti, C.; Milanese, N.; Caropreso, A.; Gentile, L.; Cassader, M.; Cavallo-Perin, P.; Pagano, G. Associations of dietary and serum copper with inflammation, oxidative stress, and metabolic variables in adults. *The Journal of nutrition* **2008**, *138*, 305-310.
36. Besecker, B.Y.; Exline, M.C.; Hollyfield, J.; Phillips, G.; Disilvestro, R.A.; Wewers, M.D.; Knoell, D.L. A comparison of zinc metabolism, inflammation, and disease severity in critically ill infected and noninfected adults early after intensive care unit admission. *The American journal of clinical nutrition* **2011**, *93*, 1356-1364.
37. Rech, M.; To, L.; Tovbin, A.; Smoot, T.; Mlynarek, M. Heavy metal in the intensive care unit: A review of current literature on trace element supplementation in critically ill patients. *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition* **2014**, *29*, 78-89.
38. F. Mills, C. *Zinc in human biology*. Springer, London: 1989.
39. Raimondi, F.; Ferrara, T.; Maffucci, R.; Milite, P.; Del Buono, D.; Santoro, P.; Grimaldi, L.C. Neonatal sepsis: A difficult diagnostic challenge. *Clinical biochemistry* **2011**, *44*, 463-464.
40. Simonsen, K.A.; Anderson-Berry, A.L.; Delair, S.F.; Davies, H.D. Early-onset neonatal sepsis. *Clinical microbiology reviews* **2014**, *27*, 21-47.
41. Shah, B.A.; Padbury, J.F. Neonatal sepsis: An old problem with new insights. *Virulence* **2014**, *5*, 170-178.

42. Puopolo, K.M.; Draper, D.; Wi, S.; Newman, T.B.; Zupancic, J.; Lieberman, E.; Smith, M.; Escobar, G.J. Estimating the probability of neonatal early-onset infection on the basis of maternal risk factors. *Pediatrics* **2011**, *128*, e1155-1163.
43. GNPI, D., DGKJ, DGGG. Bakterielle infektionen bei neugeborenen AWMF online, 2018; Vol. 024/008.
44. van de Laar, R.; van der Ham, D.P.; Oei, S.G.; Willekes, C.; Weiner, C.P.; Mol, B.W. Accuracy of c-reactive protein determination in predicting chorioamnionitis and neonatal infection in pregnant women with premature rupture of membranes: A systematic review. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* **2009**, *147*, 124-129.
45. Bedford Russell, A.R.; Kumar, R. Early onset neonatal sepsis: Diagnostic dilemmas and practical management. *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition* **2015**, *100*, F350-354.
46. Schrag, S.J.; Farley, M.M.; Petit, S.; Reingold, A.; Weston, E.J.; Pondo, T.; Hudson Jain, J.; Lynfield, R. Epidemiology of invasive early-onset neonatal sepsis, 2005 to 2014. *Pediatrics* **2016**, *138*.
47. Weston, E.J.; Pondo, T.; Lewis, M.M.; Martell-Cleary, P.; Morin, C.; Jewell, B.; Daily, P.; Apostol, M.; Petit, S.; Farley, M., *et al.* The burden of invasive early-onset neonatal sepsis in the united states, 2005-2008. *The Pediatric infectious disease journal* **2011**, *30*, 937-941.
48. Kerste, M.; Corver, J.; Sonneveld, M.C.; van Brakel, M.; van der Linden, P.D.; BA, M.B.-L.; Plotz, F.B. Application of sepsis calculator in newborns with suspected infection. *J Matern Fetal Neonatal Med* **2016**, *29*, 3860-3865.
49. Seale, A.C.; Blencowe, H.; Manu, A.A.; Nair, H.; Bahl, R.; Qazi, S.A.; Zaidi, A.K.; Berkley, J.A.; Cousens, S.N.; Lawn, J.E., *et al.* Estimates of possible severe bacterial infection in neonates in sub-saharan africa, south asia, and latin america for 2012: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Infectious diseases* **2014**, *14*, 731-741.
50. Hedegaard, S.S.; Wisborg, K.; Hvas, A.M. Diagnostic utility of biomarkers for neonatal sepsis-a systematic review. *Infectious diseases* **2015**, *47*, 117-124.
51. Molyneux, E.; Gest, A. Neonatal sepsis: An old issue needing new answers. *The Lancet. Infectious diseases* **2015**, *15*, 503-505.
52. Goldstein, B.; Giroir, B.; Randolph, A.; International Consensus Conference on Pediatric, S. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies* **2005**, *6*, 2-8.
53. Bajcetic, M.; Spasic, S.; Spasojevic, I. Redox therapy in neonatal sepsis: Reasons, targets, strategy, and agents. *Shock* **2014**, *42*, 179-184.
54. Alshaikh, B.; Yusuf, K.; Sauve, R. Neurodevelopmental outcomes of very low birth weight infants with neonatal sepsis: Systematic review and meta-analysis. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association* **2013**, *33*, 558-564.
55. Guo, C.H.; Chen, P.C.; Yeh, M.S.; Hsiung, D.Y.; Wang, C.L. Cu/zr ratios are associated with nutritional status, oxidative stress, inflammation, and immune abnormalities in patients on peritoneal dialysis. *Clinical biochemistry* **2011**, *44*, 275-280.
56. Karahan, S.C.; Deger, O.; Orem, A.; Ucar, F.; Erem, C.; Alver, A.; Onder, E. The effects of impaired trace element status on polymorphonuclear leukocyte activation in the development of vascular complications in type 2 diabetes mellitus. *Clinical chemistry and laboratory medicine* **2001**, *39*, 109-115.
57. Barrera, R.; Schattner, M.; Gabovich, N.; Zhang, J.; Saeed, M.; Genao, A.; Khvatyuk, O.; Simon, N.; Sepkowitz, K. Bacteremic episodes and copper/zinc ratio in patients receiving home parenteral nutrition. *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition* **2003**, *18*, 529-532.

58. Guo, C.H.; Ko, W.S.; Chen, P.C.; Hsu, G.S.; Lin, C.Y.; Wang, C.L. Alterations in trace elements and oxidative stress in uremic patients with dementia. *Biological trace element research* **2009**, *131*, 13-24.
59. Malavolta, M.; Giacconi, R.; Piacenza, F.; Santarelli, L.; Cipriano, C.; Costarelli, L.; Tesei, S.; Pierpaoli, S.; Basso, A.; Galeazzi, R., *et al.* Plasma copper/zinc ratio: An inflammatory/nutritional biomarker as predictor of all-cause mortality in elderly population. *Biogerontology* **2010**, *11*, 309-319.
60. Oyama, T.; Matsuno, K.; Kawamoto, T.; Mitsudomi, T.; Shirakusa, T.; Kodama, Y. Efficiency of serum copper/zinc ratio for differential diagnosis of patients with and without lung cancer. *Biological trace element research* **1994**, *42*, 115-127.
61. Gupta, S.K.; Shukla, V.K.; Gupta, V.; Gupta, S. Serum trace elements and cu/zn ratio in malignant lymphomas in children. *Journal of tropical pediatrics* **1994**, *40*, 185-187.
62. Luterotti, S.; Kordic, T.V.; Letoja, I.Z.; Dodig, S. Contribution to diagnostics/prognostics of tuberculosis in children. li. Indicative value of metal ions and biochemical parameters in serum. *Acta pharmaceutica* **2015**, *65*, 321-329.
63. Karakas, Z.; Demirel, N.; Tarakcioglu, M.; Mete, N. Serum zinc and copper levels in southeastern turkish children with giardiasis or amebiasis. *Biological trace element research* **2001**, *84*, 11-18.
64. Dollner, H.; Vatten, L.; Austgulen, R. Early diagnostic markers for neonatal sepsis: Comparing c-reactive protein, interleukin-6, soluble tumour necrosis factor receptors and soluble adhesion molecules. *Journal of clinical epidemiology* **2001**, *54*, 1251-1257.
65. Arnon, S.; Litmanovitz, I. Diagnostic tests in neonatal sepsis. *Current opinion in infectious diseases* **2008**, *21*, 223-227.
66. Ng, P.C.; Lam, H.S. Diagnostic markers for neonatal sepsis. *Current opinion in pediatrics* **2006**, *18*, 125-131.
67. Stosnach, H. Environmental trace-element analysis using a benchtop total reflection x-ray fluorescence spectrometer. *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry* **2005**, *21*, 873-876.
68. Silveira, R.C.; Procianny, R.S. Evaluation of interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1beta for early diagnosis of neonatal sepsis. *Acta paediatrica* **1999**, *88*, 647-650.
69. Berner, R.; Niemeyer, C.M.; Leititis, J.U.; Funke, A.; Schwab, C.; Rau, U.; Richter, K.; Tawfeek, M.S.; Clad, A.; Brandis, M. Plasma levels and gene expression of granulocyte colony-stimulating factor, tumor necrosis factor-alpha, interleukin (il)-1beta, il-6, il-8, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in neonatal early onset sepsis. *Pediatric research* **1998**, *44*, 469-477.
70. Franz, A.R.; Steinbach, G.; Kron, M.; Pohlandt, F. Reduction of unnecessary antibiotic therapy in newborn infants using interleukin-8 and c-reactive protein as markers of bacterial infections. *Pediatrics* **1999**, *104*, 447-453.
71. Franz, A.R.; Kron, M.; Pohlandt, F.; Steinbach, G. Comparison of procalcitonin with interleukin 8, c-reactive protein and differential white blood cell count for the early diagnosis of bacterial infections in newborn infants. *The Pediatric infectious disease journal* **1999**, *18*, 666-671.
72. Philip, A.G.; Mills, P.C. Use of c-reactive protein in minimizing antibiotic exposure: Experience with infants initially admitted to a well-baby nursery. *Pediatrics* **2000**, *106*, E4.
73. Shine, B.; Gould, J.; Campbell, C.; Hindocha, P.; Wilmot, R.P.; Wood, C.B. Serum c-reactive protein in normal and infected neonates. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **1985**, *148*, 97-103.
74. Finch, C.W. Review of trace mineral requirements for preterm infants: What are the current recommendations for clinical practice? *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition* **2015**, *30*, 44-58.
75. Terrin, G.; Berni Canani, R.; Di Chiara, M.; Pietravalle, A.; Aleandri, V.; Conte, F.; De Curtis, M. Zinc in early life: A key element in the fetus and preterm neonate. *Nutrients* **2015**, *7*, 10427-10446.

76. Galinier, A.; Periquet, B.; Lambert, W.; Garcia, J.; Assouline, C.; Rolland, M.; Thouvenot, J.P. Reference range for micronutrients and nutritional marker proteins in cord blood of neonates appropriated for gestational ages. *Early human development* **2005**, *81*, 583-593.
77. Perveen, S.; Altaf, W.; Vohra, N.; Bautista, M.L.; Harper, R.G.; Wapnir, R.A. Effect of gestational age on cord blood plasma copper, zinc, magnesium and albumin. *Early human development* **2002**, *69*, 15-23.
78. Kojima, C.; Shoji, H.; Ikeda, N.; Kitamura, T.; Hisata, K.; Shimizu, T. Association of zinc and copper with clinical parameters in the preterm newborn. *Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society* **2017**, *59*, 1165-1168.
79. Liu, J.; Yuan, E.; Zhang, Z.; Jia, L.; Yin, Z.; Meng, X.; Du, H. Age- and sex-specific reference intervals for blood copper, zinc, calcium, magnesium, iron, lead, and cadmium in infants and children. *Clinical biochemistry* **2012**, *45*, 416-419.
80. Kuijper, E.A.; Ket, J.C.; Caanen, M.R.; Lambalk, C.B. Reproductive hormone concentrations in pregnancy and neonates: A systematic review. *Reproductive biomedicine online* **2013**, *27*, 33-63.
81. Andersson, A.M.; Toppari, J.; Haavisto, A.M.; Petersen, J.H.; Simell, T.; Simell, O.; Skakkebaek, N.E. Longitudinal reproductive hormone profiles in infants: Peak of inhibin b levels in infant boys exceeds levels in adult men. *J Clin Endocrinol Metab* **1998**, *83*, 675-681.
82. Alexander, G.M. Postnatal testosterone concentrations and male social development. *Frontiers in endocrinology* **2014**, *5*, 15.
83. Greim, H. *Das toxikologiebuch: Grundlagen, verfahren, bewertung*. Wiley-VCH: 2017; p 1062
84. Djoko, K.Y.; Ong, C.L.; Walker, M.J.; McEwan, A.G. The role of copper and zinc toxicity in innate immune defense against bacterial pathogens. *The Journal of biological chemistry* **2015**, *290*, 18954-18961.
85. Gonzalez-Tarancon, R.; Calvo-Ruata, L.; Aramendia, M.; Ortega, C.; Garcia-Gonzalez, E.; Rello, L. Serum copper concentrations in hospitalized newborns. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements* **2017**, *39*, 1-5.
86. Cvijanovich, N.Z.; King, J.C.; Flori, H.R.; Gildengorin, G.; Vinks, A.A.; Wong, H.R. A safety and dose escalation study of intravenous zinc supplementation in pediatric critical illness. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition* **2015**.
87. Jung, S.; Kim, M.K.; Choi, B.Y. The relationship between zinc status and inflammatory marker levels in rural korean adults aged 40 and older. *PLoS one* **2015**, *10*, e0130016.
88. Duncan, A.; Talwar, D.; McMillan, D.C.; Stefanowicz, F.; O'Reilly, D.S. Quantitative data on the magnitude of the systemic inflammatory response and its effect on micronutrient status based on plasma measurements. *The American journal of clinical nutrition* **2012**, *95*, 64-71.
89. Jung, S.; Kim, M.K.; Choi, B.Y. The relationship between zinc status and inflammatory marker levels in rural korean adults aged 40 and older. *PLoS one* **2015**, *10*.
90. Osendarp, S.J.; van Raaij, J.M.; Darmstadt, G.L.; Baqui, A.H.; Hautvast, J.G.; Fuchs, G.J. Zinc supplementation during pregnancy and effects on growth and morbidity in low birthweight infants: A randomised placebo controlled trial. *Lancet* **2001**, *357*, 1080-1085.
91. Sur, D.; Gupta, D.N.; Mondal, S.K.; Ghosh, S.; Manna, B.; Rajendran, K.; Bhattacharya, S.K. Impact of zinc supplementation on diarrheal morbidity and growth pattern of low birth weight infants in kolkata, india: A randomized, double-blind, placebo-controlled, community-based study. *Pediatrics* **2003**, *112*, 1327-1332.
92. Sazawal, S.; Black, R.E.; Menon, V.P.; Dinghra, P.; Caulfield, L.E.; Dhingra, U.; Bagati, A. Zinc supplementation in infants born small for gestational age reduces mortality: A prospective, randomized, controlled trial. *Pediatrics* **2001**, *108*, 1280-1286.
93. Brooks, W.A.; Yunus, M.; Santosham, M.; Wahed, M.A.; Nahar, K.; Yeasmin, S.; Black, R.E. Zinc for severe pneumonia in very young children: Double-blind placebo-controlled trial. *Lancet* **2004**, *363*, 1683-1688.

94. Wadhwa, N.; Chandran, A.; Aneja, S.; Lodha, R.; Kabra, S.K.; Chaturvedi, M.K.; Sodhi, J.; Fitzwater, S.P.; Chandra, J.; Rath, B., *et al.* Efficacy of zinc given as an adjunct in the treatment of severe and very severe pneumonia in hospitalized children 2-24 mo of age: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *The American journal of clinical nutrition* **2013**, *97*, 1387-1394.
95. Mayo-Wilson, E.; Junior, J.A.; Imdad, A.; Dean, S.; Chan, X.H.; Chan, E.S.; Jaswal, A.; Bhutta, Z.A. Zinc supplementation for preventing mortality, morbidity, and growth failure in children aged 6 months to 12 years of age. *The Cochrane database of systematic reviews* **2014**, *5*, CD009384.
96. Adamo, A.M.; Zago, M.P.; Mackenzie, G.G.; Aimo, L.; Keen, C.L.; Keenan, A.; Oteiza, P.I. The role of zinc in the modulation of neuronal proliferation and apoptosis. *Neurotoxicity research* **2010**, *17*, 1-14.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Monika Dorota Wisniewska, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Veränderungen im Spurenelementhaushalt bei Neugeborenen mit konnatalen bakteriellen Infektionen: Der Kupfer/Zink-Koeffizient als ein neuer Biomarker bei Neugeborenen mit Early-Onset-Infektionen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Monika Wisniewska hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

1. **Monika Wisniewska** †, Malte Cremer †, Lennart Wiehe †, Niels-Peter Becker, Eddy Rijntjes, Janine Martitz, Kostja Renko, Christoph Bühner and Lutz Schomburg. *Copper to Zinc Ratio as Disease Biomarker in Neonates with Early-Onset Congenital Infections*. *Nutrients* 2017, 9.
2. Lennart Wiehe †, Malte Cremer †, **Monika Wisniewska** †, Niels-Peter Becker, Eddy Rijntjes, Janine Martitz, Sandra Hybsier, Kostja Renko, Christoph Bühner and Lutz Schomburg. *Selenium status in neonates with connatal infections*. *The British journal of nutrition* 2016, 116, 504-513.

Publikation Nr. 1 und 2:

Monika Wisniewska beteiligte sich bedeutend am Entwurf des Studiendesigns, an der Ausarbeitung der Ein- und Ausschlusskriterien sowie an der Erstellung der Studienbögen. Im Rahmen der Patientenrekrutierung war sie zuständig für die Durchsicht der Patientendaten in Hinsicht auf die Ein- und Ausschlusskriterien, führte Aufklärungsgespräche mit den Eltern durch und holte deren Einverständniserklärungen ein. Zudem erfasste sie die studienrelevanten klinischen Daten aus elektronischer und papierbasierter Dokumentation und war an der Erstellung der Datenbank (Excel, SPSS) sowie an der Beschaffung, Verarbeitung und Lagerung der Blutproben beteiligt. Überdies trug sie intensiv zu der Verfassung des publizierten Manuskriptes bei.

Publikation Nr. 1:

Monika Wisniewska führte die laborchemischen Analysen (Röntgenfluoreszenzspektroskopie: Messung von Kupfer und Zink) exklusive Western Blot (Ceruloplasmin) durch. Des Weiteren führte sie selbstständig die statistische Auswertung mittels SPSS durch und erstellte die in der Publikation Nr. 1 veröffentlichten Tabellen und Graphen. Sie verfasste die erste Version der Publikationsschrift (exklusive detaillierte Methodenbeschreibung der Western Blot-Analyse im Abschnitt 2.4., Materials and Methods/Ceruloplasmin), beteiligte sich am Revisions-Prozess und an der Einarbeitung der vorgeschlagenen Änderungen.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Lennart Wiehe [†], Malte Cremer [†], **Monika Wisniewska** [†], Niels-Peter Becker, Eddy Rijntjes, Janine Martitz, Sandra Hybsier, Kostja Renko, Christoph Bühner and Lutz Schomburg. *Selenium status in neonates with connatal infections*. The British journal of nutrition 2016, 116, 504-513.

2018 Journal Impact Factor: 3,319

Monika Wisniewska [†], Malte Cremer [†], Lennart Wiehe [†], Niels-Peter Becker, Eddy Rijntjes, Janine Martitz, Kostja Renko, Christoph Bühner and Lutz Schomburg. *Copper to Zinc Ratio as Disease Biomarker in Neonates with Early-Onset Congenital Infections*. Nutrients 2017, 9.

2018 Journal Impact Factor: 4,171

Kostja Renko, Janine Martitz, Sandra Hybsier, Bjoern Heynisch, Linn Voss, Robert A. Everley, Steven P. Gygi, Mette Stoedter, **Monika Wisniewska**, Josef Köhrle, Vadim N. Gladyshev and Lutz Schomburg. *Aminoglycoside-driven biosynthesis of selenium-deficient Selenoprotein P*. Scientific reports 2017, 7, 4391.

2018 Journal Impact Factor: 4,011

[†] gleichberechtigte Erstautoren

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Lutz Schomburg. Mit der Arbeit in seiner Arbeitsgruppe ermöglichte er mir wertvolle Einblicke in die Forschung in allen Facetten von der klinischen Studie bis zu verschiedenen Laboranalysen. Im Rahmen zahlreicher wissenschaftlicher Gespräche vermittelte er professionellen Rat und wertvolle Anregungen, aber auch die Freude am Forschen, und war an Tiefpunkten eine große Unterstützung und die Quelle neuer Inspiration. Für seine immer zuverlässige Betreuung während des gesamten Entstehungsprozesses meiner Promotionsarbeit möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bei ihm bedanken.

Für die konstruktive Zusammenarbeit und den freundschaftlichen Zusammenhalt danke ich herzlich Dr. Lennart Greifenstein-Wiehe.

Ich bedanke mich herzlich bei allen aktuellen und ehemaligen Doktoranden und Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Endokrinologie, insbesondere Dr. Niels-Peter Becker für seine engagierte Betreuung und tatkräftige Unterstützung während meiner Einarbeitungszeit im Labor sowie Dr. Eddy Rijntjes, Dr. Janine Martitz, Dr. Kostja Renko und Dr. Sandra Hybsier für ihren wissenschaftlichen Rat, ihre Unterstützung beim Erlernen labortechnischer Fertigkeiten, für ihr Feedback und die zahlreichen wertvollen Anregungen. Meine Doktorandenzeit werde ich Dank Euch allen als eine sehr schöne und lehrreiche Zeit in Erinnerung behalten.

Die Durchführung der Studie wäre ohne die Unterstützung des Klinikdirektors der Klinik für Neonatologie Herrn Prof. Dr. Christoph Bühner sowie den Beitrag und die fachliche Betreuung von Herrn Dr. Malte Cremer nicht gelungen. Auch Ihnen gilt mein besonderer Dank.

Ganz besonders bedanke ich mich ebenfalls bei den Neugeborenen, die an der Studie teilgenommen haben, und ihren Eltern, die dies durch ihre Einwilligung ermöglicht haben.

Mein herzlicher Dank gilt nicht zuletzt meinem Freund Sebastian, meinen Freunden und meiner Familie. Eure vielfältige und liebevolle Unterstützung, euer Rückhalt in jeder schwierigen Situation und die gemeinsame Zeit, die das Leben abseits der Arbeit so schön macht – all das weiß ich sehr zu schätzen. Auf meinem gesamten Weg haben mich meine Eltern Krystyna und Roman stets begleitet. Ihnen widme ich diese Arbeit.