

Aus der Klinik für Neonatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Nekrotisierende Enterokolitis und Trefoilfaktor 3 im Darm Frühgeborener und in
Muttermilch“

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anke Wendt

aus Berlin

Datum der Promotion: 22.06.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	2
Abstract	4
1. Einleitung	6
1.1 Nekrotisierende Enterokolitis	6
1.1.2 Epidemiologie der Nekrotisierenden Enterokolitis.....	9
1.1.3 Ätiologie und Pathogenese der NEC	10
1.2 Trefoilfaktoren	18
1.2.1 Struktur und Vorkommen	18
1.2.2 Trefoilfaktoren 1 und 2	19
1.2.3 Trefoilfaktor 3	20
1.2.4 Bedeutung der Trefoilfaktoren im Verdauungstrakt	20
1.2.5 Trefoilfaktoren und NEC.....	22
2. Fragestellung	25
3. Methoden	26
3.1 Einwilligung/ Aufklärung	26
3.2 Studienpatienten	26
3.3 Probengewinnung	27
3.3.1 Stuhlproben.....	27
3.3.2 Muttermilch.....	27
3.4. Quantifizierung von TFF 3.....	28
3.4.1 Aufbereitung und Messung	28
3.4.2 TFF 3-ELISA (in Kooperation mit Dr. Else Marie Vestergaard)	28
3.5 Statistische Auswertung	28
4. Ergebnisse:	30
4.1 Studienpopulation	30
4.2 TFF 3-Konzentration in Stuhlproben	32
4.3 TFF 3 ist in Muttermilch nachweisbar	34
4.4 Abhängigkeit der TFF 3-Konzentration in Muttermilch vom Gestationsalter	35
4.5 Abhängigkeit der TFF 3-Konzentration von der Laktationsdauer.....	38
4.6 Einfluss eines Amnioninfektionssyndroms auf die TFF 3-Konzentration in Muttermilch....	41
4.7 Einfluss des C-reaktiven Proteins auf die TFF 3-Konzentration	43

4.8	TFF 3-Konzentration in Muttermilch bei NEC des Kindes:.....	44
5.	Diskussion	45
6.	Zusammenfassung.....	55
7.	Tabellenverzeichnis	56
8.	Abbildungsverzeichnis	56
9.	Literaturverzeichnis	58
10.	Eidesstattliche Versicherung.....	66
11.	Lebenslauf	69
12.	Danksagung.....	71

Für meine Eltern

Abkürzungsverzeichnis

AIS	Amnioninfektionssyndrom
ANID	acquired neonatal intestinal diseases
BCA	bicinchoninic acid (Bicinchoninsäure)
CrP	C-reaktives Protein
EGF	epidermal growth factor
ELBW	extremely low birth weight infant (Geburtsgewicht < 1000 g)
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
Ig A	Immunglobulin A
IL-8	Interleukin 8
iNOS	inducible nitric oxide-Synthase
kbp	Kilobasenpaare
LBW	low birth weight infant (Geburtsgewicht < 2500 g)
MM	Muttermilch
mRNA	mitochondriale Ribonukleinsäure
MUC	Mucin
n	Anzahl
NEC	Nekrotisierende Enterokolitis
NF κ B	Nuclear factor kappa B
NICHD	National Institute of Child Health and Human Development, USA
NO	Nitric oxide (Stickstoffmonoxid)
PAF	Plateled activating factor
PDA	Persistierender Ductus arteriosus Botalli
p.p.	post partum
PROM	premature rupture of membranes (vorzeitiger Blasensprung)
spp	Subspezies
SSW	Schwangerschaftswoche
TFF	Trefoilfaktor
TGF α/β	transforming growth factor alpha/ beta
TLR	Toll like Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
UACL	Ulcers associated cell line

U/ min Umdrehungen pro Minute
VLBW very low birth weight infant (Geburtsgewicht < 1500 g)

Schlagworte: Trefoilfaktor 3, Muttermilch, Nekrotisierende Enterokolitis, Frühgeburtlichkeit, post partum, Gestationsalter, Amnioninfektion, Entzündung, entwicklungsabhängige Expression

Keywords: Trefoil factor 3, breast milk, necrotising enterocolitis, prematurity, post partum, gestational age, amnial infection, inflammation, developmentally regulated expression

Abstract

Die nekrotisierende Enterokolitis (NEC) ist eine der schwerwiegendsten Erkrankungen Frühgeborener. Muttermilch enthält Peptide, die vor einer NEC schützen. Trefoilfaktor 3 (TFF 3) ist ein wichtiges protektives Peptid der intestinalen Mukosa. In dieser Studie wurde TFF 3 mittels eines spezifischen ELISA (Dr. EM Vestergaard, Department of Clinical Biochemistry des Aarhus University Hospitals in Skejby/ Aarhus, Dänemark) in Muttermilch hinsichtlich einer Abhängigkeit der TFF 3-Konzentration vom Gestationsalter bei Entbindung beziehungsweise der postpartalen Zeit untersucht. Anfänglich wurde zudem die TFF 3-Konzentration in Stuhlproben Früh- und Neugeborener in Hinblick auf eine entwicklungsabhängige Expression von TFF 3 im Darm gemessen. Die Stuhl-/ Muttermilchproben wurden an der Klinik für Neonatologie der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte, in den erste fünf Wochen post partum an definierten Tagen, gesammelt. Da TFF 3 bei Entzündungen hochreguliert wird, untersuchten wir den Einfluss eines Amnioninfektionssyndrom und von entzündlichen Geschehen auf die TFF 3-Konzentration in Muttermilch. Wir haben TFF 3 erstmalig in Muttermilch nachgewiesen. Die TFF 3-Konzentration in Muttermilch fiel nach etwa zwei Wochen post partum signifikant ab. Die statistische Analyse ergab keine signifikante Abhängigkeit der TFF 3-Konzentration in Muttermilch vom Gestationsalter bei Entbindung. Peripartale Entzündungen oder Amnioninfektionen führten nicht zu einer signifikanten Änderung der TFF 3-Konzentration in Muttermilch. Stuhl stellt keine geeignete Matrix zur Messung von TFF 3 dar. Ob TFF 3 in humaner Milch einen protektiven Effekt in Bezug auf die Erkrankung Frühgeborener an einer NEC darstellt, und ob TFF 3 in humanem Darm entwicklungsabhängig exprimiert wird, bedarf weiterer Forschung.

Abstract

Necrotising enterocolitis (NEC) is one of the most serious diseases in preterm born infants. Human milk contains peptides that protect against NEC. Trefoil factor 3 (TFF 3)

is an important protective peptid in intestinal mucosa. In this study TFF 3 was examined in human milk, using a specific ELISA (Dr. EM Vestergaard, Department of Clinical Biochemistry, Aarhus University Hospitals in Skejby/ Aarhus, Denmark) concerning dependence of TFF 3-concentrations on gestational age at delivery and post partal time respectively. Initially TFF 3-concentrations in stools of preterm and term born infants were measured, regarding intestinal developmentally regulated expression. The samples of stool and human milk were collected at the Department of Neonatology at the Charité Berlin, Campus Mitte, within five weeks after delivery, at predefined days. As TFF 3 is upregulated in inflammations, we analysed the influence of amniotic infection syndromes and inflammatory processes on TFF 3-concentrations in human milk. We were the first to detect TFF 3 in human milk. TFF 3-concentrations in human milk decreased significantly around two weeks after delivery. The statistical analysis showed no significant dependence of TFF 3-concentrations on gestational age at delivery. Peripartal inflammations or amniotic infections did not change TFF 3-concentrations in human milk significantly. Stool is not an appropriate matrix for measuring TFF 3. Whether TFF 3 in human milk has a protective effect on NEC in preterm infants, and whether TFF 3 is expressed developmentally in human intestines, requires further research.

1. Einleitung

Die Nekrotisierende Enterokolitis (NEC) ist eine der schwerwiegendsten Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes Frühgeborener. Die Ätiologie und Pathogenese dieser hämorrhagisch-ulzerierenden Entzündung ist weitgehend ungeklärt. Bis jetzt gibt keine kausale Therapie oder adäquate Prophylaxe. In vielen klinischen Zentren wird intensiv daran geforscht. Die Unreife des Darmes, welche der wichtigste Risikofaktor in der Entwicklung einer NEC ist, besteht zu einem wichtigen Anteil aus einem Mangel an protektiven Faktoren des Verdauungstraktes. Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem sekretorischen Peptid Trefoilfaktor 3 (TFF 3) im Darm unreifer Frühgeborener und in humaner Milch. Der Mangel an TFF 3 als sekretorisches Peptid im Darm Frühgeborener wird über die Quantifizierung von TFF 3 in Stuhlproben untersucht. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt bei dem Nachweis von TFF 3 in Muttermilch und Auswertung von TFF 3-Konzentrationen in Muttermilch bei verschiedenen Gestationsaltern und zu verschiedenen Zeitpunkten post partum. Zudem wird der Einfluss von Entzündungen und Infektionen der Probandinnen auf die TFF 3-Konzentration in Muttermilch untersucht. Bei einem Mangel dieser Faktoren könnte eine Substitution des Faktors eine mögliche Prophylaxe einer NEC oder sogar einen Therapieansatz darstellen.

1.1 Nekrotisierende Enterokolitis

Die wissenschaftliche Auseinandersetzung mit einer Entzündung im Gastrointestinaltrakt Neugeborener begann Mitte des neunzehnten Jahrhunderts. So beschrieb Adam Elias von Siebold 1825 in Jena eine letale, nicht obstruktiv bedingte Magen- und Darmentzündung bei Neugeborenen (Siebold AE 1825). Bereits 1884 wurde der Krankheitsverlauf einer Darmruptur mit nachfolgender Peritonitis als ein für die Neonatalperiode typisches Ereignis erkannt (Zillner E 1884). Die Definition der „Enterocolite ulceronecrotique du premature“ hat der Krankheit 1959 zu einem bleibenden Namen verholfen, und gleichzeitig die auch noch heutzutage beobachtete Pathologie treffend beschrieben (Rossier A et al. 1959). Die spezifische Versorgung in neonatologischen Kliniken führte zu steigenden Überlebenschancen Frühgeborener und ermöglichte eine gezielte Erforschung der NEC.

Eine wichtige Grundlage für das Verständnis der Erkrankung und deren Behandlungsmöglichkeiten ist die Hypothese von Sántulli. Er postulierte 1975 drei

Risikofaktoren für die Entwicklung einer NEC: eine Verletzung der Mukosa, die bakterielle Besiedelung des Darmes und der Beginn der enteralen Ernährung. (Sántulli TV et al. 1975). Im selben Jahr entwickelte Sántulli ein Tiermodell mit Kältestress- oder Hypoxie exponierten Ratten zur Erforschung der Pathogenese der NEC. Zur Beurteilung der Schwere einer NEC entwickelte Bell 1978 eine klinische Stadieneinteilung mit systematischer Beschreibung des Krankheitsgeschehens (Bell MJ. et al. 1978). Diese Stadieneinteilung wird bis heute noch in angepasster Form in vielen Kliniken angewandt. Sie wurde in der „prä-Surfactant“-Ära entwickelt, anhand Frühgeborener mit einem Gestationsalter von mehr als 30 Schwangerschaftswochen (SSW). Unreifere Frühgeborene hatten zu dieser Zeit nur geringe Überlebenschancen. Heutzutage überleben immer unreifere Frühgeborene, mit dem Risiko an einer NEC zu erkranken, da sich mit der Einführung der Surfactanttherapie deren Überlebenschancen deutlich gebessert haben. Etwa 1,5% aller Lebendgeborenen werden mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g geboren (VLBW: very low birth weight infants), die Mortalität derer liegt bei 12,5% (Horbar JD et al. 2012). Um dieser Entwicklung Rechnung zu tragen, wurden Bell's Kriterien bereits 1986 angepasst (Walsh MC, Kliegman RM 1986). Schon damals postulierte Kliegman, dass unter dem Begriff der NEC ein breites Spektrum an Symptomaten zusammengefasst wird. Er bezeichnete die NEC eher als ein Syndrom als eine spezifische Krankheit. Heutzutage lassen sich eine Mehrzahl an Krankheiten von der klassischen NEC des Frühgeborenen abgrenzen, die seit der Einführung von Bell's Kriterien nicht selten als NEC diagnostiziert wurden und jetzt als ANIDs (acquired neonatal intestinal diseases) bezeichnet werden. Dazu gehören die NEC des term geborenen Kindes, die fokale intestinale Perforation, aber auch virale Enteritiden des Neugeborenen, die Kuhmilchprotein-Allergie und die Ernährungsintoleranz des Frühgeborenen. Dementsprechend erfolgte eine weitere Verfeinerung von Bell's Kriterien (Gordon PV, Attridge JT 2007).

Die klassische NEC wird vor allem anhand klinischer und radiologischer Zeichen diagnostiziert. Die Diagnostik und Beurteilung des Schweregrades der NEC orientiert sich an der von Kliegman und Walsh modifizierten Stadieneinteilung nach Bell (Walsh MC, Kliegman RM 1986):

Stadium I: Verdachtsdiagnose einer NEC mit unspezifischen klinischen Symptomen und Subileus

Stadium IIA: gesicherte NEC, zunehmende abdominelle und systemische Zeichen, milde systemischer Reaktion, radiologisch ileustypische Darmgasverteilung und Pneumatoxis intestinalis

Stadium IIB: gesicherte NEC mit fortgeschrittener abdomineller Symptomatik und systemischer Reaktion, radiologisch fortgeschrittene Pneumatoxis intestinalis

Stadium IIIA: schwer ausgeprägte NEC mit Zeichen eines Schockgeschehens, kritisch krankes Kind, drohende Perforation

Stadium IIIB: schwere NEC mit Zeichen eines schweren Schockgeschehens und radiologisch nachgewiesener intestinaler Perforation. Hier besteht eine dringliche Operationsindikation

Tabelle 1: systemische und gastrointestinale Symptome einer NEC (Kanto WP et al. 1994)

gastrointestinal	systemisch
Distendiertes Abdomen	Lethargie
Abwehrspannung	Apnoen
Abdominelle Resistenz	Atemnotsyndrom
Palpabler Tumor	Temperaturinstabilität
Rötung der Bauchwand (Flanke)	Metabolische/ respiratorische Azidose
Nahrungstoleranz	Hyper-/ Hypoglykämie
Erbrechen	Minderperfusion
Magenrestbildung	Schock
Okkultes/ sichtbares Blut im Stuhl	Disseminierte Gerinnungsstörung
Diarrhoe/ Änderung der Stuhlkonsistenz	Positive Blutkultur

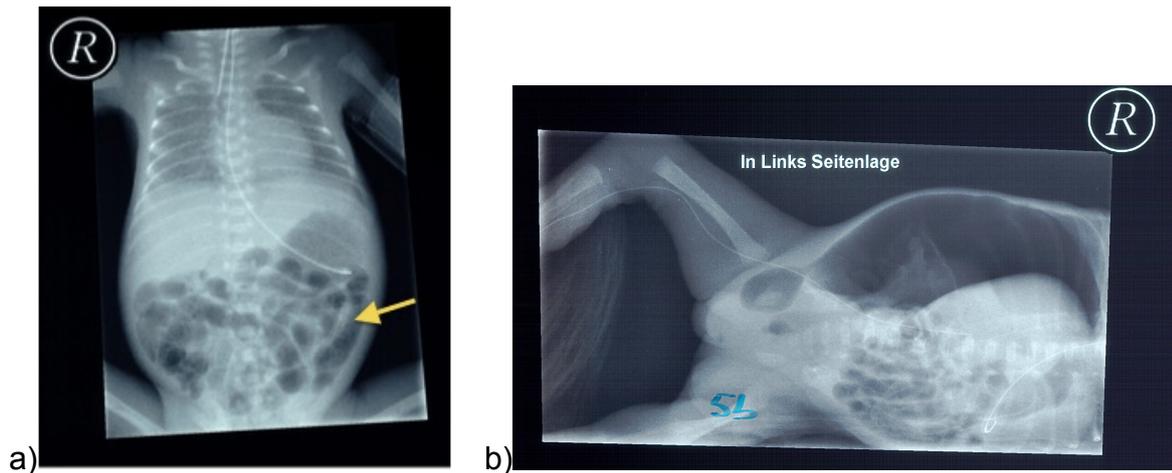


Abbildung 1: a) Pneumatosis intestinalis (Pfeil), b) freie Luft (extraluminale) im Abdomen durch NEC mit Perforation im Ileum

Komplikationen

Leichte NEC-Fälle heilen unter konservativer Therapie aus, in fortgeschrittenen Stadien liegt die Letalität bei 30 – 50 %. Die Letalität von ELBW (extremely low birth weight infants, Geburtsgewicht unter 1000 g, 0,6 % aller Lebendgeborenen) nach operativ versorgter NEC beläuft sich ebenfalls auf etwa 50 %. Wird die Erkrankung überlebt, haben 10 % der Patienten Komplikationen wie Rezidive, Strikturen, Stenosen oder ein Kurzdarmsyndrom mit Ernährungsschwierigkeiten und Gedeihstörungen. Durch die oft langwierige parenterale Ernährung kann eine intrahepatische Cholestase mit nachhaltiger Schädigung der Leber entstehen. Langzeitfolgen sind vermehrt neurologische Defizite, auch als Folge der langwierigen intensivmedizinischen Therapie.

1.1.2 Epidemiologie der Nekrotisierenden Enterokolitis

Die Inzidenz der NEC liegt bei 0,3 bis 5 Fällen pro 1000 Lebendgeburten und variiert zwischen den neonatologischen Zentren. Eine Untersuchung des National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) in den USA gab Unterschiede zwischen 1 – 22 % aller VLBW an, in Abhängigkeit vom behandelnden Zentrum (Lin PW, Stoll BJ 2006). Etwa 2 – 5 % aller auf einer neonatologischen Intensivstation aufgenommenen Kinder erkranken, 90 % derer sind Frühgeborene (Gestationsalter < 37,0 SSW). Signifikante ethnien- oder geschlechtsspezifische Unterschiede bezüglich der Inzidenz konnten bisher nicht nachgewiesen werden. Bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht von 401 bis 750 g ist die Inzidenz mit 11,5 % dreimal so hoch wie bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht zwischen 1000 und 1500 g (4 – 6 %). Die

NEC-bedingte Letalität liegt bei 15 – 30 %, wobei ethnien- und geschlechtsspezifische Unterschiede vorhanden sind: die NEC-bedingte Sterblichkeit ist bei männlichen Frühgeborenen sowie in der afroamerikanischen Bevölkerung erhöht (Lin PW, Stoll BJ 2006).

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese der NEC

Die Ätiologie und Pathogenese der nekrotisierenden Enterokolitis ist bis jetzt nicht vollständig geklärt, es wird von einem multifaktoriellen Geschehen ausgegangen. Histopathologisch finden sich in der Mukosa Ulzerationen, diffuse oder umschriebene nekrotische Herde mit Tendenz zu Perforation und Entwicklung von Pseudomembranen. In der Submukosa entstehen Hämorrhagien und gasgefüllte Zysten.

Als der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung einer NEC wird die Frühgeburtlichkeit angesehen. In den vergangenen Jahrzehnten wurden zahlreiche weitere Risikofaktoren postuliert. Davon konnten drei tierexperimentell bestätigt werden: eine bakterielle Besiedelung des Verdauungstraktes, eine enterale Ernährung und eine intestinale Ischämie.

Frühgeburtlichkeit

Eine Vielzahl wichtiger Körperfunktionen ist bei Frühgeborenen noch nicht ausgereift. Dazu gehören Verdauungsmechanismen, aber auch zelluläre und humorale Abwehrmechanismen, welche im Gastrointestinaltrakt interagieren. Die Motilität des prematuren Darmes ist vermindert und unkoordiniert (Berseth CL 1989), es bestehen strukturelle Unterschiede im Aufbau der Mikrovilli und es wird weniger Magensaft und Mukus gebildet. Eine geringere Magensaftproduktion erhöht das Risiko an einer NEC zu erkranken. Behandelt man Frühgeborene mit einem Antazidum, zeigt sich der Trend noch deutlicher (Guillet R et al. 2006). Eine geringere Magensaftsekretion verändert die Viskosität des intestinalen Mukus, somit ist dessen Funktion als Abwehrmechanismus komprimiert und die Besiedelung des Darmes mit pathogenen Bakterien wird gefördert. Auch die Zusammensetzung der intestinalen Mukusschicht und der intestinalen Schleimhaut ist verändert. Im Tiermodell zeigte sich, dass der Gesamtproteingehalt des Mukus neugeborener Ratten höher ist als der in adulten Ratten (Shub MT et al. 1983). Das unreife intestinale Immunsystem reagiert mit einer überschießenden inflammatorischen Antwort auf intrainestinale mikrobielle Stimuli (Martin CR, Walker WA 2006). Peptide, die auf Entzündungsreaktionen regulierend wirken, wie NF-kappa B

(NF κ B), werden noch ungenügend exprimiert (Claud EC et al. 2004). Auch pankreatische Proteasen wie die Enterokinase, die Laktase und das proteolytische Pankreaspeptid werden im unreifen Verdauungstrakt vermindert gebildet und haben eine reduzierte Enzymaktivität. Das Gefäßsystem ist ebenfalls unreif, es bestehen Imbalancen im Gefäßwiderstand. Eine Therapiemöglichkeit, die eine Reifung der intestinalen Mukosa und ihrer Barrierefunktion bewirkt, ist die medikamentöse Therapie mit Glucocorticoiden. In einem Tiermodell wurde die NEC-Inzidenz bei Ratten durch eine pränatale Gabe von Cortison gesenkt (Israel EJ et al. 1990). Auch die Permeabilität der intestinalen Mukosa wird durch antenatale Gabe von Glucocorticoiden gesenkt (Shulman RJ et al. 1998) und die Aktivität von Enzymen wie der Laktase, Maltase und Sucrase erhöht (Buchmiller TL et al. 1994). Eine antenatale Gabe von Glucocorticoiden kann die NEC-Inzidenz beim Menschen aber nicht signifikant senken, allenfalls zeigt sich ein positiver Trend diesbezüglich (Halliday HL et al. 2010).

Intestinale Ischämie und Reperfusion

Lange Zeit wurde als hauptsächliche Pathogenese der NEC ein hypoxisch-ischämisches Ereignis mit ischämischem Schaden der Darmwand und nachfolgender Nekrose, bzw. einem nachfolgenden Reperfusionsschaden gesehen: verschiedene Erkrankungen, Prozeduren oder Therapien, die ein Frühgeborenes nach der Geburt durchlebt, bedingen eine Umverteilung des Blutvolumens zu den lebenswichtigen Organen, um deren Versorgung zu sichern. Dies bedeutet gleichzeitig eine Vasokonstriktion und Minderperfusion mesenterialer Gefäße, mit Folge einer Hypoxie und Ischämie des Darmes. Auslöser sind beispielsweise eine Asphyxie, Polyglobulie, Anämie, eine arterielle Hypotension, Hypothermie, die enterale Ernährung sowie eine ausgeprägte abdominelle Distension (Szabo JS et al. 1987).

Frühgeborene haben nicht selten einen persistierenden Ductus arteriosus (PDA). Entsteht ein links-rechts-Shunt, kommt es einerseits zur Überflutung des pulmonalen Stromgebietes und andererseits zu einer Minderdurchblutung des mesenterialen Gefäßsystems. Ein medikamentöser Verschluss des PDA mit Indomethacin senkt die NEC-Inzidenz jedoch nicht signifikant (Fowlie PW 2000). Maßnahmen wie eine Austauschtransfusion, Nabelarterien-Katheterisierung oder Infusion hyperosmolarer Lösungen wird durch Steigerung der vaskulären Resistance einen vergleichbarer hypoxischer Effekt untersagt. Ein kausaler Zusammenhang zwischen liegenden Nabelgefäßkathetern und einer NEC konnte bisher nicht nachgewiesen werden, und die

parenterale Ernährung über Nabelarterienkatheter erhöht das Risiko, an einer NEC zu erkranken, nicht (Davey AM et al. 1994). Durch den Sauerstoffmangel, vor allem der Mukosa und Submukosa des Darmes, entstehen Koagulationsnekrosen und Ulzerationen. Dadurch werden mukosale Transportmechanismen beeinträchtigt, was zu einer Malabsorption der zugeführten Nahrung und einer Barriereminderung ("gut barrier failure") führt. Dadurch kann es zu einer Disseminierung von Bakterien kommen, vor allem im distalen Ileum und proximalen Kolon, mit der Folge einer Durchwanderungsperitonitis und Darmperforation. Im Tiermodell führt eine Hyperkapnie- und Reperfusion-induzierte Barriereminderung zu einer verzögerten Hämoxxygenase 1-Bildung, sodass bezüglich einer NEC protektives Kohlenstoffmonoxid verspätet gebildet wird (Pietzcker J et al. 2011). Nach einer Hypoxie bedingt die mit der Reperfusion einhergehende Hyperoxie eine Freisetzung von Sauerstoffradikalen und sauerstofffreien Superoxiden. Es entsteht ein Mukosachaden durch Peroxidation ungesättigter Fettsäuren in der zellulären und mitochondrialen Membran (Dunn SP et al. 1984). Hauptlieferant freier Radikale ist dabei die Xanthinoxidase des intestinalen Gewebes. Sowohl die NEC-artige Erkrankung des Reifgeborenen oder des späten Frühgeborenen, als auch die fokale intestinale Perforation tritt in der ersten Lebenswoche auf. Hierbei spielt die Ischämie und Reperfusion eine wichtige Rolle (Ostlie DJ et al. 2003). In der Entstehung der klassischen NEC hat die Ischämie bzw. Reperfusion möglicherweise keine primäre Rolle, denn diese wird erst ab der zweiten Lebenswoche klinisch relevant, perinatale Stressoren mit unmittelbarer Folge einer Ischämie können aufgrund der zeitlichen Diskrepanz keine unmittelbare Ursache sein. In einer epidemiologischen Betrachtung der NEC wurde diese Vermutung konsolidiert, denn es stellte sich heraus, dass selten eine Asphyxie einer klassischen NEC vorausgeht (Stoll BJ 1994). Es wird inzwischen angenommen, dass die intestinale Ischämie sekundär entsteht. Inflammatorische Prozesse auf der mukosalen Oberfläche bewirken eine intramurale Mikrozirkulationsstörung und führen somit zu einer Ischämie. Sowohl Entzündungsmediatoren, als auch die Ischämie selbst stören die Regulationsmechanismen des Gefäßwiderstandes. Das Gleichgewicht zwischen vasodilatatorischem Stickstoffmonoxid (NO) und Endothelin-1, das normalerweise etwas zu Gunsten von NO verschoben ist, wird durch Entzündungsprozesse, -mediatoren und durch die Ischämie selbst zu Gunsten des vasokonstriktorisches Endothelin-1 verschoben. Dies führt zu einer Ausdehnung ischämischer Darmabschnitte mit Minderung der Barrierefunktion und zur Begünstigung einer transmuralen bakteriellen

Translokation mit Ausbildung einer Pneumatosis intestinalis, Sepsis und dem Vollbild einer NEC (Young CM et al. 2011).

Bakterielle Besiedelung

Ein weiterer Risikofaktor ist die Besiedelung des unreifen Darmes mit pathogenen Bakterien. Dafür spricht sowohl das Auftreten der NEC nach der ersten Lebenswoche, wenn die Besiedelung des Verdauungstraktes mit anaeroben Bakterien begonnen hat, als auch die Wirksamkeit von prophylaktisch angewandten Probiotika (Caplan MS 2009). Der Geburtsmodus hat einen wichtigen Einfluss auf die Ausbildung der Darmflora des Neugeborenen. Neugeborene, die per Kaiserschnitt geboren werden, entwickeln eine andere Mikroflora, als auf natürlichem Wege geborene Kinder (Penders J et al. 2006). Frühgeborene werden häufiger per Kaiserschnitt geboren und bei vorzeitiger Entbindung ist der maternale Geburtskanal oftmals mit pathologischen Erregern besiedelt. Dadurch ist die Ansiedelung einer physiologischen Darmflora im Neonaten erschwert. In Stuhlproben an NEC erkrankter Frühgeborener konnte eine Besiedelung des Darmes mit atypischen Erregern, sowie eine Reduktion der Diversität der Mikroflora nachgewiesen werden, vor allem unter antibiotischer Therapie (Wang Y et al. 2009). Nach einer antibiotischen Prophylaxe mit oralen Aminoglykosiden besteht ein signifikant erhöhtes Risiko einer Besiedelung mit resistenten Erregern (Bury RG, Tudehope D 2001). Neuere Untersuchungen zeigen, dass die prolongierte empirische intravenöse Gabe von Antibiotika in einer Zunahme der NEC-Inzidenz bei ELBW-Frühgeborenen resultiert (Cotten CM et al. 2009).

Die nekrotisierende Enterokolitis tritt in Epidemien und in Endemien auf. Einzelne NEC-Epidemien wurden mit pathogenen Erregern wie *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* oder *Klebsiella pneumoniae* assoziiert (Kliegman RM 2008). Bakteriell produzierte Endotoxine triggern die Produktion endogener Zytokine und Entzündungsmediatoren wie Platelet activating Factor (PAF), Tumornekrosefaktor α (TNF α) oder Interleukin 8 (IL-8), mit Folge einer überschießenden Zytokinfreisetzung und Entzündungsreaktion. Die PAF-Konzentration im Stuhl von NEC-Patienten ist im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe deutlich erhöht (Amer MD et al. 2004). PAF induziert die Expression von Toll-like-Rezeptor 4 (TLR 4), einem Glykoprotein, das Zellen des angeborenen Immunsystems mikrobielle Nukleinsäuren erkennen läßt. Die Expression von TLR 4 auf Enterozyten nimmt in Tiermodellen bei Risikofaktoren für eine NEC, wie Ernährung mit Formulanahrung und perinatalem Streß, deutlich zu. TLR 4-Null-Mäuse sind im Vergleich

zum Wildtyp in einem NEC-Mausmodell vor der Erkrankung geschützt (Jilling T et al. 2006). IL-8 wird von epithelialen Zellen produziert und wirkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten, die die Inflammation verstärken und die Entwicklung von Nekrosen fördern (Mukaida N 2000). Zusammenfassend findet ein Zusammenspiel aus einer Endotoxin getriggerten Entzündungsreaktion und einer Infektion durch pathogene Erreger bei der Pathogenese der NEC statt.

Enterale Ernährung

Seit Sántulli 1975 die enterale Ernährung als Risikofaktor für die Entwicklung einer NEC postulierte, wird dieses Thema ausführlich untersucht. In einer Studie wiesen Anderson und Kliegman 1991 nach, dass NEC-Patienten signifikant mehr Nahrung in den ersten Lebensstagen erhielten als Frühgeborene ohne NEC. Nicht nur die absolute Menge der Nahrung wurde als wichtig angesehen, sondern auch die tägliche Steigerung der Nahrungsmenge. In der Studie war die Steigerung der Nahrungsmenge bei den an NEC erkrankten Frühgeborenen hochsignifikant rascher als bei der gesunden Kontrollgruppe. Es wurde die Empfehlung ausgesprochen, die Nahrung nicht mehr als 20 ml pro Kilogramm Körpergewicht und Tag zu steigern (Anderson DM, Kliegman RM 1991). Jedoch gibt es auch Studien, die das Gegenteil postulieren: wird die Nahrung rasch gesteigert und erreichen die Kinder schneller wieder das Geburtsgewicht, so findet sich keine Zunahme der NEC-Inzidenz (Caple J et al, 2004). In einer Metaanalyse zu diesem Aspekt konnte weder eine Signifikanz noch ein Trend, ob die enterale Nahrungsmenge schnell oder langsam gesteigert werden sollte, bezüglich der NEC-Inzidenz (> Stadium 1 nach Bell, mit oder ohne Perforation) festgestellt werden (McGuire W, Bombell S 2008). Es wurde auch untersucht, ob der Zeitpunkt, an dem eine enterale Ernährung begonnen wird, Einfluss auf die NEC-Inzidenz nimmt. Ein verzögerter Beginn der enteralen Ernährung wurde 1982 von Marchildon als Risikofaktor für eine NEC identifiziert (Marchildon MB et al. 1982). Eine enterale Nahrungskarenz mit totaler parenteraler Ernährung führt zu einer Atrophie der intestinalen Mukosa mit einer Zunahme der Permeabilität, wodurch sich das Risiko an einer NEC zu erkranken bei Beginn der enteralen Ernährung erhöht (Mallick ICH et al. 2004). Moss und Kalish stellten fest, dass einige Frühgeborene vor dem Beginn einer NEC nie enteral ernährt wurden. Bei denen war das Risiko eines schwereren NEC-Verlaufes signifikant erhöht (66 % versus 38 %) (Moss RL et al. 2008). Eine frühe, geringe enterale Nahrungsaufnahme („gut priming“) erscheint wichtig, um eine normale intestinale Barrierefunktion und Kolonisierung mit

einer gesunden Mikroflora zu erreichen (Schanler RJ et al. 1999). Eine weit verbreitete Methode ist das trophic feeding, bei dem kleinste Mengen an Nahrung gegeben werden, um die Atrophie des Zottengewebes zu verhindern. Die derzeitige Studienlage lässt keinen Schluß zu, ob das trophic feeding die NEC-Inzidenz senkt (Tyson JE, Kennedy KA 2005). Letztendlich lässt sich aber auch kein signifikanter Unterschied der NEC-Inzidenz zwischen frühem und verzögertem enteralen Nahrungsbeginn nachweisen (Morgan J et al. 2011). Auch konnte kein Unterschied zwischen kontinuierlicher und intermittierender Nahrungsgabe gefunden werden. Der Verlauf der NEC scheint unabhängig vom weiteren Ernährungsregime zu sein. Ob Formula basiert ernährt oder reine Muttermilch gegeben wird, ob die Nahrung kontinuierlich gegeben oder in Boli verabreicht wird und wie rasch die enterale Nahrung gesteigert wird, scheint keinen Einfluss mehr zu haben, sobald das Kind an einer NEC erkrankt ist (Moss RL et al. 2008).

Vorteile der Muttermilchernährung

Die American Association of Pediatrics empfiehlt für Frühgeborene und LBW-Neugeborene (low birth weight, < 2500 g Geburtsgewicht) eine Ernährung mit Muttermilch (MM). Ist keine Muttermilch vorhanden, bieten sich grundsätzlich zwei Alternativen: gespendete humane Milch oder Formulanahrung. Gespendete humane Milch, sogenannte Frauenmilch, variiert an Protein-, Fett- und Energiegehalt, abhängig vom Zeitpunkt der Gewinnung und ob sie aus der laktierenden oder der kontralateralen Brust stammt (Lucas A et al. 1978). Meistens enthält Frauenmilch weniger Protein und Kalorien als Formulanahrung und wird zum Schutz des Kindes vor Infektionskrankheiten pasteurisiert. Wie umfangreich der Pasteurisierungsprozess die Qualität der Frauenmilch mindert, ist bis jetzt unklar. Wahrscheinlich wird ein Großteil der immunologisch wirksamen Inhaltsstoffe der Muttermilch denaturiert (Ewaschuk JB et al. 2011). Die meisten Formulanahrungen sind kuhmilchbasiert. Eine Muttermilchernährung hat im Vergleich zur Ernährung mit Formulanahrung einen protektiven Effekt. Sie fördert durch das Zusammenspiel ihrer Inhaltsstoffe die Reifung der intestinalen Mukosa, verhindert Entzündungen im Darm Frühgeborener und hilft eine physiologische intestinale Darmflora zu etablieren. Antimikrobielle Proteine wie Lactoferrin, Haptocorrin, Fas und Lysozym, sowie Antikörper wie sekretorisches IgA wirken gegen pathogene Keime und erleichtern somit den Aufbau einer kommensalen Flora. Lactoferrin hat einen bakteriostatischen Effekt, da es als Chelator für freies Eisen wirkt, welches ein wichtiger

Nahrungsbestandteil für viele pathogene Bakterien ist (Ochoa TJ et al. 2003). Das Fas-Protein ist ein Teil eines transmembranösen Rezeptors und gehört wie der Fas-Ligand zu der Familie der Tumornekrosefaktoren. Durch Interaktion aktivieren sie einen Apoptosevorgang. Muttermilch liefert mit löslichem Fas eine alternative Bindungsmöglichkeit für den Fas-Liganden, sodass eine Apoptoseaktivierung auf mukosaler Seite reduziert wird (Playford RJ et al. 2000). Bioaktive Peptide aus der Muttermilch wie Lactoferrin, Lysozym oder Fas werden im oberen Verdauungstrakt des Frühgeborenen nicht inaktiviert und können so ihre Wirkung in den tieferen Darmabschnitten entfalten. Muttermilch wird im oberen Verdauungstrakt mit linguale und gastrische Lipasen vermengt. Durch die Lipasen werden in Muttermilch vorhandene Triglyzeride in freie Fettsäuren und Monoglyzeride gespalten, welche als Detergentien auf pathogenen Membranen von Bakterien wirken (Hamosh M 1998). Lysozym bricht β 1, 4-Bindungen zwischen N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglykosaminen, die Bestandteile von Peptidoglykanen in Wänden vor allem gramnegativer Bakterien sind. Haptocorrin, Chelator von Vitamin B 12, inhibiert enterotoxische Escherichia coli-Varianten (Newburg DS et al. 2007). Für Frühgeborene sind diese Abwehrmechanismen essentiell, da ihr Verdauungstrakt eher mit einer gramnegativen Flora besiedelt wird. Bioaktive Peptide, die im Darm bereits identifiziert wurden und denen eine wichtige Rolle in der Wahrung der mukosalen Integrität mit Schutz vor einer NEC zugesprochen sind, werden aktuell auch in Muttermilch untersucht. Dazu gehören nun auch die Trefoilfaktoren.

Neben bioaktiven Peptiden enthält Muttermilch über 130 Oligosaccharid-Verbindungen, insgesamt etwa 5 – 10 g/l (Kuhmilch enthält unter 1 g/l Oligosaccharid-Verbindungen). Diese gelangen ohne aufgespalten zu werden in die tieferen Darmabschnitte, wo sie der kommensalen Darmflora als Substrat dienen und zusätzlich die Adhäsion pathogener Bakterien an intestinale Zellen hemmen (prebiotischer Effekt). Weiterhin lassen sich probiotische Milchsäurekulturen der Lactobacillus spp. in frischer Muttermilch nachweisen. Die Darmflora gestillter Kinder besteht dementsprechend hauptsächlich aus Lactobacillus spp., wohingegen die Mikroflora des Darmes Formulanährter Neonaten eher aus Clostridien und Bacteroides spp. besteht (Harmsen HJM et al. 2000). Das relative Risiko an einer NEC zu erkranken ist für ein mit Formulanahrung ernährtes Frühgeborenes vier Mal so hoch wie für ein mit Muttermilch ernährtes Frühgeborenes (McGuire W, Anthony MY 2001). Laut NICHD sinkt das NEC-Risiko um den Faktor 0,83 pro Steigerung des Muttermilchanteiles um 10 % an der Gesamtnahrungsmenge. Bei

einer Steigerung der zugeführten Muttermilchmenge pro 100 ml/ kg mehr innerhalb der ersten 14 Lebenstage sinkt das NEC-Risiko und das Risiko zu versterben um den Faktor 0,87. Eine Ernährung mit 100 % Muttermilch oder Frauenmilch scheint im Vergleich zu einer kombinierten Ernährung mit Muttermilch und Formulanahrung das NEC-Risiko zu senken (Meinzen-Derr J et al. 2008, Quigley MA et al. 2007). Von 33 formulaernährten Frühgeborenen unter 32 SSW Gestationsalter wird eines mehr aufgrund der Ernährungsform an einer NEC erkranken (number needed to harm = 33). Muttermilch ist also als enterale Ernährung für Frühgeborene zu bevorzugen, da sie immunoprotektive Faktoren, Wachstumsfaktoren und kommensale Erreger enthält, die der unreifen Mukosa zugute kommen und vor schweren Erkrankungen wie einer Sepsis oder NEC schützen.

Probiotika & Prebiotika

Muttermilch beeinflusst die Entwicklung der intestinalen Disaccharidasen, die Permeabilität des Gastrointestinaltraktes und die Immunantwort des Intestinums positiv. Sie enthält komplexe Kohlenhydrate (Glykane), die als Prebiotika die Kolonisation des Verdauungstraktes mit probiotischen Organismen fördern und die Besiedelung mit pathogenen Keimen verhindern (Newburg DS, Walker WA 2007). In Anlehnung daran kommen immer mehr Prebiotika und Probiotika zum Einsatz. Prebiotika sind seit 2006 als Nahrungszusatz in Anfangs- und Folgemilchen zugelassen (Commission Directive 2006/ 141/ EC). Prebiotika sind Oligosaccharide wie Inulin, Galaktooligosaccharide, Fruktooligosaccharide oder Laktulose, die die Proliferation einer gesunden intestinalen Mikroflora steigern (Gibson GR 1998). Voraussetzung für Wirkung der Prebiotika ist ein ausreichend mit physiologischer Flora kolonisierter Darm. Bei VLBW ist dies noch nicht ausreichend gegeben, sodass die Wirksamkeit von Prebiotika bei VLBW-Frühgeborenen anzuzweifeln ist (Moro G et al. 2002).

Probiotika sind Bakterienstämme, die einer gesunden intestinalen Mikroflora entsprechen bzw. eine Entwicklung dieser unterstützen. Angewendet werden 2 bis 4 Bakterienstämme, meist der Gattung *Lactobacillus acidophilus* oder *Bifidobacterium infantis*. Eine Metaanalyse zeigte, dass die Kombination aus 2×10^9 Kolonie-bildenden Einheiten *Lactobacillus acidophilus* und *Bifidobacterium infantis* spp. zu einer Reduktion des relativen Risikos der NEC-Inzidenz auf 0,29 führt. Insgesamt sinkt durch die prophylaktische Gabe von Probiotika die NEC-Inzidenz um ca. 70 %, bei einer number needed to treat von 24. Bis zu 70 % der betrachteten Studienpatienten hatte ein mittleres Geburtsgewicht von 1250 g, sodass anzunehmen ist, dass Probiotika auch bei VLBW-

Frühgeborenen wirken. Über die Dauer der Prophylaxe besteht noch Uneinigkeit (Guthmann F et al. 2010).

1.2 Trefoilfaktoren

1.2.1 Struktur und Vorkommen

Trefoilfaktoren (TFF) sind eine Familie muzinassoziierter Peptide, welche mindestens eine strukturell charakteristische "Trefoil"-Domäne aufweisen. Eine Trefoil-Domäne ist definiert als eine Sequenz von 38 – 39 Aminosäureresten, in denen sechs Zysteine drei Disulfidbrücken, in einer 1 – 5, 2 – 4 und 3 – 6 Konfiguration, bilden. Das führt zu der charakteristischen dreiblättrigen Kleeblattstruktur (engl.: trefoil). Aufgrund der Disulfidbrücken-Bindungen haben die Moleküle eine sehr kompakte Konfiguration, die zu einer hohen Säure- und Proteasenresistenz führt. Beim Menschen wurden bisher drei Trefoilfaktoren nachgewiesen: TFF 1 (eine Trefoil-Domäne), TFF 2 (zwei Domänen) und TFF 3 (eine Domäne). Dabei liegt TFF 2 nur in einer dimeren Form vor, TFF 1 und TFF 3 können in Abhängigkeit vom umgebenden Redoxpotential sowohl in einer monomeren als auch in einer dimeren Form exprimiert werden (Thim L 1997).

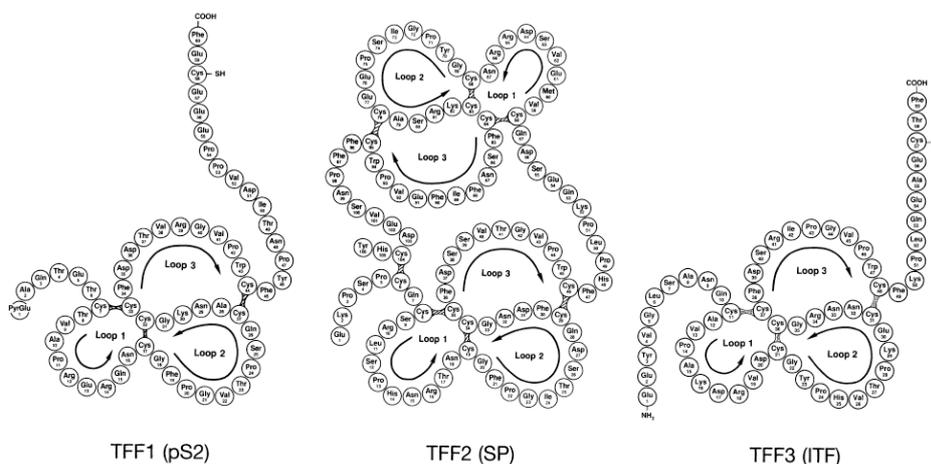


Abbildung 2: charakteristische Trefoil-Disulfid-Schleifen (Thim L 1997)

Die Synthese aller drei Faktoren ist in vielen mukusbildenden Zellen der verschiedenen Organsysteme, vor allem denen des Gastrointestinaltraktes, nachgewiesen. Jedem Faktor kann man einen eigenen Muzintyp zuordnen: TFF 1 ist mit MUC 5 AC co-lokalisiert, TFF 2 mit MUC 6 und TFF 3 mit MUC 2 (Longman RJ et al. 2000). TFF 3 ist in Magen und Auge auch mit MUC 5 AC co-lokalisiert (Langer G et al. 2002). TFF 1 und 2

werden zudem von verschiedenen Tumoren sezerniert (Longman RJ et al. 2000). Als erstes wurde das TFF 1-Gen 1988 auf Chromosom 21 lokalisiert (Moisan J et al., 1988). 1992 kartierten Tomasetto et al. die Gene von TFF 1 und TFF 2 auf Chromosom 21 an Position 21q22.3 mit einer physikalischen Distanz von weniger als 230 Kilobasenpaaren (kbp) (Tomasetto C et al. 1992). Auch das für TFF 3 kodierende Gen ist auf Chromosom 21q22.3 lokalisiert (Chinery R et al. 1996). Seib et al. charakterisierten die genomische Struktur von TFF 3 (Seib T et al. 1995). Seit 1996 weiß man, dass alle drei humanen Trefoilpeptid-Gene innerhalb einer Region von 55 kbp liegen (Seib T et al. 1997).

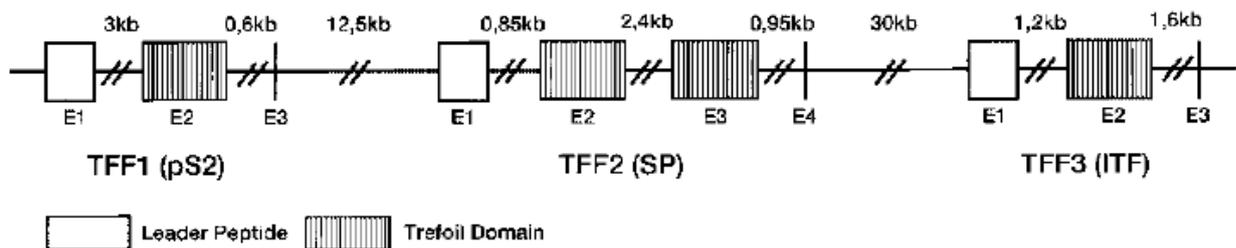


Abbildung 3: Lokalisation der TFF-Gene auf Chromosom 21q22.3 (Seib T et al. 1997)

Die Trefoilfaktoren sind evolutionär hoch konserviert, mehr als 70 % der Aminosäuren der Trefoilfaktoren in Menschen und Nagetieren sind identisch (Baker ME 1988). TFF werden zu den Wachstumsfaktoren gezählt. TFF 2 und TFF 3 bewirken an verletzten Zelllinien eine drei- bis sechsfache Zunahme der Zellmigration (Dignass A et al. 1994) und eine Zellvermehrung über die Hemmung von Apoptosefaktoren (Taupin DR et al. 2000). Die Sekretion der TFF unterliegt starken Schwankungen innerhalb eines Tages und ist abhängig von intestinalen Sekretagoga und der Nahrungsaufnahme: bei der Nahrungsaufnahme werden TFF 2 und TFF 3 vermindert sezerniert (Semple JI et al. 2001).

1.2.2 Trefoilfaktoren 1 und 2

Als erstes Trefoilpeptid wurde TFF 2 in den späten siebziger Jahren am Novo Research Institute in Dänemark aus Schweinepankreas, als Nebenprodukt der Insulinproduktion, entdeckt (Jørgensen KH et al. 1979). TFF 1 wurde zuerst 1984 als Nukleotidsequenz eines östrogeninduzierten Elementes in sogenannten MCF 7 humanen Brustkrebszellen beschrieben (Jakowlew SB et al. 1984). Ab 1989 ging man aufgrund der Homologie der Domänen beider TFF von einer neuen Peptidfamilie aus. TFF 1 und 2 werden in den

Mukosazellen des oberflächlichen Duodenalepithels und dessen Krypten, sowie in Zellen des Corpus und Antrum des Magens produziert. Es besteht eine Co-Expression von TFF 1 und 2 in gastralen Parietal- und Hauptzellen (Tomasetto C et al. 1990).

1.2.3 Trefoilfaktor 3

TFF 3, der initial als „intestinaler Trefoilfaktor“ hieß, wurde 1991 aus dem Intestinum von Ratten und Menschen isoliert. TFF 3 existiert in einer 60 Aminosäuren langen monomeren Form (6.7 kDa) und in einer 118 Aminosäuren langen dimeren Form (13.1 kDa) (Thim L et al. 1995). Er wird vorrangig in Becherzellen gebildet und auf die intestinale Oberfläche sezerniert. Im Dün- und Dickdarm von Ratten und Menschen wird TFF 3 recht spezifisch exprimiert (Podolsky DK et al., 1993), im Magen wird TFF 3 im Gegensatz zu TFF 1 und 2 nur im Antrum und in der Cardia exprimiert, im Ösophagus findet es sich nur spärlich. Im Pankreas wird TFF 3 vor allem in den Pankreasgängen exprimiert, er scheint aber auch im endokrinen Pankreas vorzukommen (Madsen J et al. 2007). Aufgrund der Lokalisierung von TFF 3 wird angenommen, dass er eine wichtige Komponente der intrinsischen Mechanismen zum Schutz und Erhalt der mukosalen Integrität ist (Suemori S et al. 1991). Ein wichtiger Faktor in der Schädigung der mukosalen Integrität ist die intestinale Hypoxie. Futura et al. wiesen in vitro an der Promoterregion des TFF 3-Gens eine Bindungsstelle für den Hypoxia inducible factor 1 nach. Hypoxische Zustände führen zu einer Induktion der TFF 3-mRNA und des TFF 3-Peptids, die Zugabe von Anti-TFF 3-Antikörpern führt zu einem Verlust der Barrierefunktion epithelialer Zellen und Addition von TFF 3 bewahrt epitheliale Zellen zumindest teilweise vor hypoxieinduzierter Barrierefunktionsstörung (Futura GT et al. 2001).

Im Jahr 2002 wurde ein ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) zum Nachweis von TFF 3 entwickelt und TFF 3 wurde mit einer Konzentration um 200 pmol/l in humanem Serum nachgewiesen (Vestergaard EM et al. 2002).

1.2.4 Bedeutung der Trefoilfaktoren im Verdauungstrakt

Alle TFF werden in gastrointestinalen Ulzerationen, bei entzündlichen Darmerkrankungen und neoplastischen Prozessen im Magen-Darm-Trakt hochreguliert. Wright et al. beschrieben eine Ulzera-assoziierte Zelllinie (UACL), welche sich an der

Basis intestinaler Krypten befindet und neben dem epidermal growth factor (EGF) und dem transforming growth factor α (TGF α) alle drei TFF exprimiert. Eine phänotypisch der UACL vergleichbare Zelllinie wurde in hyperplastischen Polypen des Kolons gefunden (Wright NA et al. 1990). Damit wurden die ersten Beweise erbracht, dass TFF an der Regeneration der Mukosa beteiligt sind. In experimentell in Ratten induzierten gastral Ulzerationen steigt die Expression von TFF 2 als erste an (eine halbe bis zwei Stunden nach Verletzung), TFF 3 ist nach 48 Stunden nachweisbar. Erst dann steigt die Expression von TGF β und EGF, so dass die Expression von Trefoilfaktoren als eine schnelle Antwort auf Schädigung der mukosalen Integrität gewertet wird (Alison MR et al. 1995). Das spezifische Verteilungsmuster der drei Faktoren scheint bei entzündlichen Prozessen veränderbar zu sein: TFF 1 und 2 werden bei Morbus Crohn auch in Abschnitten des Verdauungstraktes überexprimiert, in denen sie in gesundem Zustand nur minimal vorhanden sind (Wright NA et al. 1992). Alle TFF gehen einen stabilen gelartigen Komplex mit in Schleim enthaltenen Glykoproteinen ein und führen so zu deren Quervernetzung mit Steigerung der Viskosität des Schleimes. Hierbei scheint es einen deutlichen Unterschied in der Stabilität des TFF-Mukus-Komplexes zwischen monomeren und dimeren Formen von TFF 1 und 3 zu geben: die dimere Form hat jeweils eine deutlich höhere Viskosität, die monomere Form zeigt jeweils keine Viskositätszunahme im Vergleich zu der Grundlösung des Muzins. Die Zunahme der Viskosität einer Muzinlösung ist auch abhängig von dem zugeführten Faktor. TFF 2 führt zu einem dickflüssigen, gelartigen Schleim in der gastral Mukosa, TFF 3 hingegen führt zu mikroskopisch kleinen Komplexen mit weniger viskösem Schleim. Dadurch wird die Mukosa durch Bildung einer mukösen, aber nicht statischen Schicht geschützt und somit die Absorption von Nahrungsbestandteilen durch die intestinale Schleimhaut nicht behindert. TFF sind in hohem Maße protease- und säureresistent. Bei einem pH-Wert von 2,0 im Vergleich zu einem pH-Wert von 7,4 ist die Viskosität des Komplexes signifikant höher (Thim L et al. 2002). Aufgrund des muzin-assoziierten Auftretens von TFF wird eine protektive Wirkung auf die intestinale Schleimhaut vermutet. TFF 2 bzw. TFF 3 auf Monolayer von Kolonzellen gegeben führt zu einer Abschwächung der Zellschädigung durch Taurochol- und Ölsäure, in Kombination mit Glykoproteinen aus Dickdarm-Muzin gegeben ist die Zellschädigung deutlich geringer als bei alleiniger Gabe von TFF 2 oder 3 (Kindon H et al. 1995). Tierexperimentelle Daten belegen ebenfalls die Bedeutung von TFF im Gastrointestinaltrakt: füttert man Ratten mit TFF 2 bzw. TFF 3 zwei Stunden vor Gabe des schädigenden Agens (intragastriische Applikation von

Ethanol bzw. subkutane Injektion von Indomethacin), so ist die Schleimhaut vor einer Schädigung geschützt (Babyatsky MW et al. 1996). Auch subkutane Infusionen von TFF 2, die 30 Minuten vor bzw. zeitgleich mit einer streßinduzierten Schädigung gastraler Schleimhaut verabreicht wurden, zeigten einen protektiven bzw. heilenden Effekt (Konturek PC et al. 1997). TFF wirken wahrscheinlich in einem Rezeptor-medierten System. Die Wirkmechanismen des TFF 3 scheinen mit der Familie der Toll-like-Rezeptoren eng verknüpft zu sein: Podolsky et al bewiesen eine TLR 2-abhängige Wirkung im Intestinum. In Becherzellen aktivieren TLR 2-Agonisten selektiv die Synthese von TFF 3. Die orale Gabe rekombinanten TFF 3 senkt die Morbidität und Mortalität TLR 2-defizienter Mäuse, ohne TFF 3 entwickelten die Mäuse akute Darmentzündungen (Podolsky DK et al. 2009). In einem Mausmodell mit Trinitrobenzoesäure-induzierter Kolitis zeigte sich nach intraperitonealer Gabe von rekombinatem humanen TFF 3 im Vergleich zur Kontrollgruppe ein geringerer Gewebsschaden, eine verminderte TNF α -Konzentration, sowie eine verminderte Expression von TLR 4 und NF κ B. Teng et al. legten nahe, dass die protektive Wirkung von TFF 3 durch die Inhibition eines TLR 4/ NF κ B-Signalweges funktioniert (Teng X et al. 2009). Neben der protektiven Funktion nimmt man eine heilende bzw. reparierende Funktion der TFF an. An Wundrändern zeigt sich eine drei- bis sechsfach erhöhte epitheliale Migrationsrate bei Zugabe von TFF 2 und 3. Bei zusätzlicher Gabe von intestinalen muzinassozierten Glykoproteinen steigt die Migrationsrate um das 15-fache (Dignass A et al. 1994). Die Mechanismen, auf denen die protektive und heilende Wirkung der Trefoilpeptide basiert, sind bis jetzt aber noch nicht vollständig geklärt.

1.2.5 Trefoilfaktoren und NEC

In der Pathogenese der NEC ist die Unreife des Verdauungstraktes der wichtigste Faktor, wobei die insuffiziente Zusammensetzung der intestinalen Muzinschicht eine wichtige Rolle spielt. TFF 3 ist an der schnellen Antwort bei einer mukosalen Schädigung beteiligt und im intestinalen Mukus vorhanden. In einem Tiermodell ist neben der Expression von Muzin 2 - und 4mRNA auch die Expression von TFF 3 vermindert, womit eine verzögerte Entwicklung der Muzinschicht als schützende Schranke des Verdauungstraktes, und somit ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer NEC, assoziiert ist (Faņa-Berthon P et al. 2009). Dies legt nahe, dass ein Mangel an TFF 3 im Darm Frühgeborener ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der NEC ist. Im Intestinum

von Ratten wird TFF 3 entwicklungsabhängig exprimiert. Am 17. pränatalen Tag (term = 22 Tage) ist keine TFF 3-mRNA in fetalem Darm mittels Northernblot, kein TFF 3-Protein mittels Westernblot bzw. immunhistochemisch nachweisbar. Ab dem 20. pränatalen Tag steigt die mRNA-Konzentration deutlich an und postnatal ist ein weiterer deutlicher Anstieg bis zum Erreichen des Erwachsenenalters (24. Tag post natum) nachweisbar (Lin J et al. 1999). Bei Mäusen lässt sich eine Expression von TFF 3 erst ab dem dritten Lebenstag nachweisen (Mashimo H et al. 1995). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass TFF 3 auch beim Menschen entwicklungsabhängig exprimiert wird.

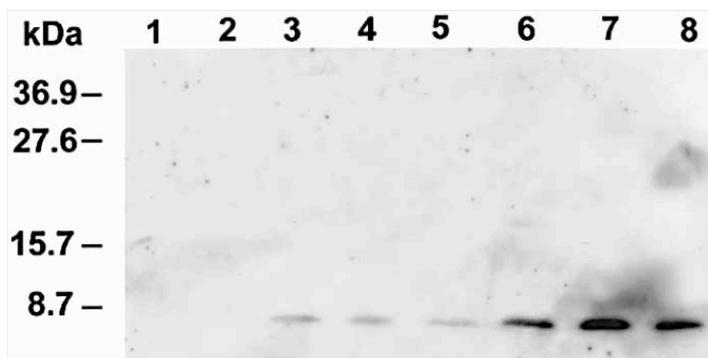


Abbildung 4: Expression von TFF 3 in wachsendem Rattendarm, Westernblot. Lin J et al. 1999 (Reihen 1 – 8 entsprechen von links nach rechts den pränatalen Tagen 14, 17, 20, postnatalen Tagen 1, 7, 17 und 24 sowie in Reihe 8 als Vergleich Dünndarm adulter Ratten)

Lin et al. wiesen TFF 3 in Mekonium nach (Lin J et al. 2003). Jedoch sammelt sich das Mekonium während der gesamten Schwangerschaft an, sodass durch diese Messungsmethode kein sicherer Rückschluss auf die entwicklungsabhängige Expression gezogen werden kann. Für einen Mangel an TFF 3 im Darm Frühgeborener als wichtiger Schutzfaktor in der Pathogenese der NEC sprechen Studien an Tiermodellen: TFF 3-defiziente knock-out-Mäuse reagierten im Gegensatz zum Wildtyp nach oraler Gabe von Dextransulfat mit einer ausgeprägten Kolitis und blutigen Durchfällen. Hingegen hatten nur 10 % des Wildtyps Epithelschäden, welche weniger schwerwiegend waren als bei den knock-out-Mäusen. Oral verabreichter TFF 3 führte nach Schädigung der intestinalen Mukosa durch Induktion einer Zellmigration auf die mukosale Oberfläche

eine Restitutio ad integrum (Mashimo H et al. 1996). Hypoxie-induzierte Tiermodelle der NEC ergaben ebenfalls wegweisende Befunde: in der NEC-induzierten Gruppe fand sich ein Anstieg von Entzündungsparametern, wie TNF α , IL- 8, Malondialdehyd, Thromboxan 2 und NO, im Darmgewebe. Die intraperitoneale oder subkutane Injektion von TFF 3 führte zu einer Abnahme von Cyclooxygenase 2 und iNOS im Gewebe. Dadurch wurden weniger Entzündungsmediatoren, Sauerstoffradikale und Lipidperoxide gebildet und der Anstieg der Entzündungsparameter, als auch die Ausprägung der mukosalen Schädigung, war signifikant gemindert (Zhang BH et al. 2003). TFF 3 wurde bereits in humanem Brustdrüsengewebe nachgewiesen, was neben dem protektiven Effekt der Muttermilch bezüglich einer NEC das Vorhandensein von TFF 3 in Muttermilch nahe legt. Die Expression von TFF 3 wird östrogenreguliert (May FE, Westley BR 1997), was eine veränderte Expression von TFF 3 in der Brustdrüse im Laufe der Schwangerschaft und Stillperiode vermuten läßt. Vorausgesetzt TFF 3 ist in Muttermilch vorhanden und trägt zu der TFF 3-Menge im kindlichen Verdauungstrakt bei, könnte ein Mangel an TFF 3 in Muttermilch einen mangelnden Schutz vor einer NEC bedeuten.

2. Fragestellung

Das Peptid TFF 3 ist ein wichtiger protektiver Faktor bei der unmittelbaren Schädigung der mukosalen Integrität. Es wird von Becherzellen im Darm produziert und ist in intestinalem Mukus vorhanden. Bei der Pathogenese der NEC spielt die Unreife des Verdauungstraktes und somit auch des intestinalen Mukus mit seinen Abwehrmechanismen eine zentrale Rolle. Daher beschäftigten wir uns in einer Pilotstudie mit folgenden Fragestellungen:

1. Wird TFF 3 im kindlichen Darm entwicklungsabhängig exprimiert ?
2. Ist das Auftreten einer NEC mit der Höhe der TFF 3-Konzentration in Stuhl korreliert ?

Frühgeborene, die mit Muttermilch ernährt werden, erkranken signifikant seltener an einer NEC. Vermutet wird ein Zusammenhang mit dem Vorhandensein protektiver Peptide in der Muttermilch. TFF 3 wurde bereits in der Milch laktierender Nagetiere nachgewiesen, es wird östrogenreguliert und wirkt als protektives Peptid im Verdauungstrakt. Daher setzten wir uns in einer anschließenden Studie mit folgenden Hypothesen auseinander:

1. TFF 3 wird in Muttermilch exprimiert
2. TFF 3 in Muttermilch wird in Abhängigkeit von der Schwangerschaftswoche, in der die Probandinnen entbunden wurden, exprimiert.
3. Im postpartalen Verlauf verändert sich die Expression von TFF 3 in Muttermilch.

TFF 3 wird bei Entzündungen in verschiedenen Sekreten hochreguliert, daher untersuchten wir folgende Zusammenhänge:

1. Einfluss eines Amnioninfektionssyndroms auf die TFF 3-Konzentration in Muttermilch
2. Einfluss des C-reaktiven Proteins als Zeichen eines entzündlichen Geschehens (kein Amnioninfektionssyndrom) auf die TFF 3-Konzentration in Muttermilch
3. Zusammenhang der TFF 3-Konzentration in Muttermilch und dem Risiko eine NEC zu erleiden

3. Methoden

3.1 Einwilligung/ Aufklärung

Vor Beginn der Studienarbeiten haben wir ein Ethikantrag verfasst, in dem der Studienaufbau und die Begründung des Vorhabens dargelegt wurde. Der Ethikantrag wurde von der Ethikkommission der Charite Campus Mitte genehmigt (EK-Vorg. 913).

Bei Rekrutierung der Probandinnen und Probanden klärten wir die Probandinnen, und im Falle der Kinder die Sorgeberechtigten, über die Studie und die benötigten Proben auf, und erhielten eine schriftliche und mündliche Einverständniserklärung.

3.2 Studienpatienten

In einer Pilotstudie haben wir Stuhl von Frühgeborenen und Neugeborenen mit einem Gestationsalter zwischen 23,1 und 40,9 Schwangerschaftswochen gesammelt. Die erste Stuhlprobe haben wir am 5. Lebenstag abgenommen, die folgenden Stuhlproben in wöchentlichem Abstand, bis zum errechneten Entbindungstermin. Die Stuhlproben wurden ab dem 5. Lebenstag abgenommen, um sicherzugehen, dass kein Mekonium oder Übergangsstuhl, sondern schon Muttermilch-Stuhl vorhanden ist, da die TFF 3-Konzentration in Mekonium, wie oben bereits erwähnt, wahrscheinlich über einen längeren Zeitraum entstanden, und somit die TFF 3-Konzentration nicht repräsentativ für den jeweiligen Lebenstag ist. Von den reifgeborenen Kindern haben wurde nur eine Stuhlprobe am 5. Lebenstag gesammelt.

In der anschließenden Studie haben wir die asservierte Muttermilch von Frauen, deren Kinder zu früh oder termingerecht geboren wurden, ausgewertet. Die Milch wurde bereits parallel zur Pilotstudie am 5., 7., 11., 17. und 30. Tag der Laktation abgenommen.

Pilotstudie (TFF 3 in Stuhl Neu-/ Frühgeborener):

Einschlusskriterien:

Die Probanden sollten innerhalb der ersten drei Lebenstage in unserer Klinik aufgenommen oder dort geboren worden sein, damit wir den Stuhlgang ab dem 5. Tag sammeln konnten. Das zweite Einschlußkriterium war eine Ernährung mit Muttermilch.

Ausschlusskriterien:

Ausschlusskriterien waren die Rücknahme der Einwilligungserklärung oder abdominelle Erkrankungen der Probanden, abgesehen von einer NEC.

Hauptstudie (TFF 3 Muttermilch):

Einschlusskriterien:

Aufnahme in die Klinik innerhalb der ersten drei Tage post partum.

Ausschlusskriterien:

Ausschlusskriterien waren die Rücknahme der Einwilligungserklärung, eine Mastitis puerperalis oder die Indikation zum primären Abstillen.

3.3 Probengewinnung

3.3.1 Stuhlproben

Die Stuhlproben wurden im Rahmen einer Pilotstudie ab dem 5. Lebenstag in wöchentlichen Abständen bis zum errechneten Entbindungstermin gesammelt. Dabei wurde am jeweiligen Tag aus der Windel eine willkürliche Probe entnommen und in ein Stuhlröhrchen zur weiteren Asservierung gegeben. Die Menge wurde dabei nicht festgelegt. Es erfolgte zunächst keine Aufbereitung der Proben, sie wurden bei -70 °C eingefroren. Zur Messung des humanen TFF 3 wurden die Stuhlproben gekühlt ins Department of Clinical Biochemistry des Aarhus University Hospital (Skejby, Aarhus, Dänemark) zu Frau Dr. E. M. Vestergaard verschickt. Dort besteht derzeit die einzige Möglichkeit, einen ELISA zur Messung von humanem TFF 3 in Muttermilch und Stuhlproben durchzuführen.

3.3.2 Muttermilch

Die Muttermilch wurde in ein steriles Aufbewahrungsbehältnis abgepumpt. Etwa 0,5 bis 1 ml Muttermilch wurden in unpasteurisiertem Zustand mit einer sterilen Spritze entnommen und in je ein Eppendorff-Röhrchen gegeben. Diese wurden ebenfalls bei -70 °C in der Gefriertruhe asserviert. Bei Abpumpen der Milch wurden die vordere, mittlere und hintere Portion der Milch nicht voneinander getrennt, so dass eine Durchmischung der gesamten Milchportion erfolgte. Auch die Muttermilch wurde nicht vor dem Einfrieren und Verschicken aufbereitet. Zu Beginn der Studienarbeiten wurde

die Muttermilch zunächst parallel zu den Stuhlproben ab dem fünften Lebenstag wöchentlich abgenommen. Dies betraf die ersten 62 Studienpatienten im Rahmen der Pilotstudie. Darauffolgend wurden keine Stuhlproben mehr gesammelt. Die Milchproben wurden dann am 5., 7., 11., 17. und 30. Tag post partum abgenommen. Auch diese Proben wurden wie unter 3.3.1 beschrieben versandt.

3.4. Quantifizierung von TFF 3

3.4.1 Aufbereitung und Messung

Die Muttermilchproben wurden aufgetaut und bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 16000 U/ min zentrifugiert. Dadurch wurde der Fettanteil der Milch von der Magermilch getrennt und entfernt. Die Messung von TFF 3 erfolgte in der Magermilch. Die Milchproteinkonzentration wurde mittels eines BCA Protein Assays (Pierce IL) ermittelt. Dies wurde durchgeführt, um auszuschließen, dass unterschiedliche absolute TFF 3-Konzentrationen von differierenden Milchproteinkonzentrationen abhängen. Die Messung des TFF 3 in humaner Muttermilch erfolgte mit dem peptidspezifischen ELISA, welcher in o.g. Labor entwickelt wurde. Die analytische Ungenauigkeit des ELISAs liegt für TFF 3 bei 7 %.

3.4.2 TFF 3-ELISA (in Kooperation mit Dr. Else Marie Vestergaard)

Der TFF 3-ELISA wird mit immobilisierten Antikörpern durchgeführt, welche das Analysat binden. Des Weiteren wird ein biotinylierter Nachweisantikörper verwendet. Dieser Nachweisantikörper reagiert in einer Biotinidase-Peroxidase-Reaktion mit einer hinzugegebenen Meerrettich-Avidin-Peroxidase, sodass eine Farbreaktion entsteht. Diese nimmt linear mit zunehmender TFF 3-Konzentration zu (Korrelationskoeffizient 0,983). Anschließend erfolgte die photometrische Messung der entwickelten Farbe bei 450 nm zur Quantifizierung von TFF 3. Um die Absorption zu korrigieren erfolgt eine zusätzliche Messung bei 620 nm (Vestergaard EM et al. 2002)

3.5 Statistische Auswertung

Zur Erfassung der Daten wurde Microsoft Excel 2001/ 2003 verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS 18 und Graph Pad Prism. Mit dem Shapiro-Wilk-Test

haben wir überprüft, ob eine Gauss'sche Normalverteilung der erhobenen TFF 3-Konzentrationen vorliegt. Zum Test auf Unterschiede der Mediane haben wir bei nicht normalverteilten Werten im direkten Vergleich zweier Mediane einen Mann-Whitney-U-Test und im Vergleich mehrerer Werte den Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Im Falle einer Normalverteilung hatten wir eine Varianzanalyse mittels T-Test für unverbundene Stichproben vorgesehen. Zur deskriptiven Statistik haben wir absolute Patientenzahlen und absolute TFF 3-Konzentrationen angegeben. Den Bereich haben wir durch Angabe der oberen und unteren Quartile sowie des Medians im Sinne einer 25., 75. bzw. 50. Perzentile charakterisiert. So nicht näher bezeichnet, haben wir die 95% Konfidenz-Intervalle errechnet, wobei wir p-Werte kleiner 0,05 als statistisch signifikant angenommen haben.

4. Ergebnisse:

4.1 Studienpopulation

Pilotstudie:

Insgesamt haben wir von 62 Neu- und Frühgeborenen im Verlauf der Studie, ab dem fünften Lebenstag, in wöchentlichen Abständen, Stuhlproben gesammelt. Von den Neugeborenen waren 31 weiblich und 31 männlich, das Gestationsalter bei Geburt reichte von 23,3 bis 40,9 SSW. Bei zwei Frühgeborenen (25,9 bzw. 27,3 SSW) bestand der klinische Verdacht auf eine nekrotisierende Enterokolitis (NEC I°), der sich weder radiologisch noch laborchemisch verifizieren ließ. Bei keinem der Probanden trat eine andere abdominelle Erkrankung auf.

Hauptstudie:

Von 70 Probandinnen haben wir Muttermilch gesammelt, von 60 Probandinnen haben wir je zwei bis fünf Proben in Folge gesammelt. 11 Probandinnen haben nur eine Muttermilchprobe abgegeben und 8 primär rekrutierte Probandinnen mussten wir später wegen fehlender Muttermilchproben aus der Studie ausschließen.

Die Frauen, deren Muttermilchproben wir für die Studie verwendet haben, wurden in drei Gruppen aufgeteilt:

Tabelle 2: Gruppeneinteilung der Probandinnen

Gruppe	SSW bei Entbindung	Reifestatus des Kindes bei Geburt
A	24,0 – 27,9	extrem preterm
B	28,0 – 36,9	preterm bis spät preterm
C	37,0 – 42,9	reifgeboren

Tabelle 3: Charakterisierung der Studienpopulation

Gruppe	A	B	C
Probandinnen (n)	21	41	8
Ausgeschlossen (n)	3	2	3
Gesamtprobenzahl (n)	64	118	10
Lungenreifeinduktion (%)	16 (76,2)	26 (63,4)	0 (0)
PROM (>18 h a.p.; n)	2	1	0
AIS (%)	8 (38)	11 (26)	2 (25)
CrP > 1,5 mg/ dl (n)	15	6	1
Gestationsalter (Median (Bereich))	26,57 (24,0 – 27,9)	32,0 (28,0 – 36,9)	39,5 (37,0 – 42,9)
Geburtsgewicht (Median (Bereich)) [g]	Kind 800 (480 – 110)	1435 (55 – 2830)	3082,5 (2585 – 3110)
NEC [III B] (n)	1	0	0

Tabelle 4: Anzahl der gesammelten Muttermilchproben der einzelnen Gruppen

Gruppe	d 5 (n)	d 7 (n)	d 11 (n)	d 17 (n)	d 30 (n)	d 6, 8 – 10 (n)	d 12 – 16 (n)	d 18 – 29 (n)
A	12	10	8	11	13	2	4	4
B	21	14	14	15	14	12	10	18
C	4	1	1	1	0	3	0	0

4.2 TFF 3-Konzentration in Stuhlproben

Wir haben in einer Pilotstudie die TFF 3-Konzentration in Stuhl Neu- und Frühgeborener gemessen. Insgesamt haben wir 14 Stuhlproben von 8 der insgesamt 62 Neu- und Frühgeborenen untersucht. Die Kinder hatten ein Gestationsalter von 24,7 bis 40,3 Schwangerschaftswochen bei Geburt.

Tabelle 5: TFF 3-Konzentrationen aller gemessenen Stuhlproben

	TFF 3 [nmol/ l]
Unteres Quartil	167,3
Median	265,5
Oberes Quartil	3882
Bereich	132 – 6780

Im Shapiro-Wilk-Test zeigte sich, dass die Probenzahl zu gering war, um eine Gauss'sche Normalverteilung zu bestätigen. Im Mann Whitney-U-Test ließ sich kein signifikanter Unterschied der TFF 3-Konzentrationen in den Stuhlproben im Laufe der ersten drei postnatalen Wochen zeigen.

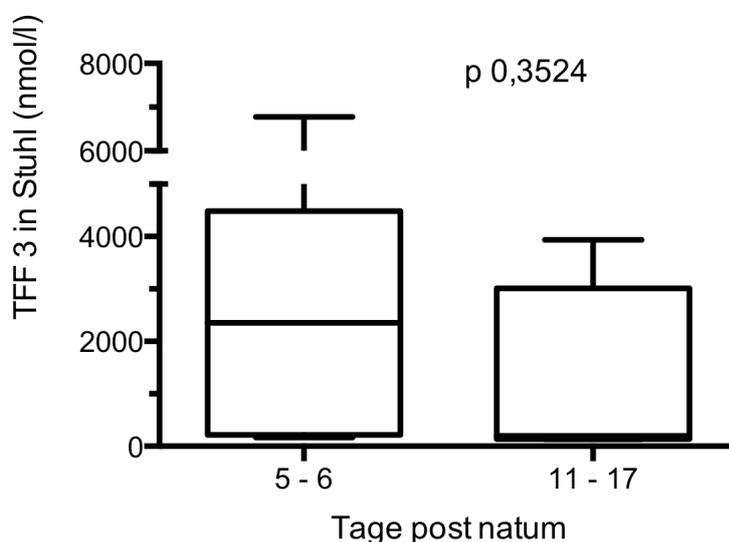


Abbildung 5: TFF 3-Konzentration in Stuhl Früh- und Neugeborener an definierten Tagen post natum, Vergleich der Konzentrationen in der ersten mit der zweiten und dritten Lebenswoche anhand von Box-Plots

Auch zwischen den verschiedenen Gestationsaltern zeige sich keine signifikanter Unterschied der TFF 3-Konzentrationen in den untersuchten Stichproben (p 0,6943).

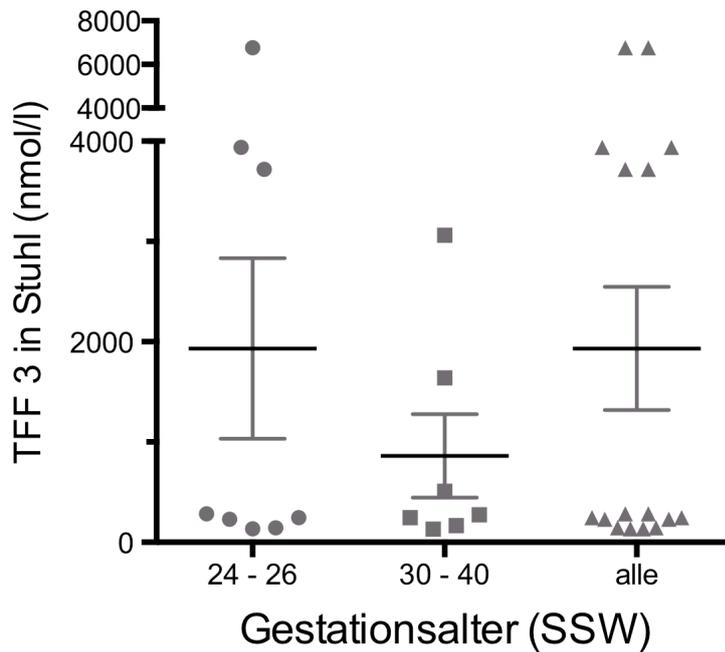


Abbildung 6: Vergleich der TFF 3-Konzentration in Stuhl in Abhängigkeit vom Gestationsalter

Da sich in der Auswertung, wie in der nachfolgenden Abbildung (Abb. 7) sichtbar, kein Trend bezüglich einer Korrelation der von uns gemessenen TFF 3-Konzentrationen mit dem Gestationsalter beziehungsweise dem chronologischen Alter der Kinder zeigte, haben wir auf weitere Messungen verzichtet und uns auf die Messung und Auswertung der Muttermilchproben konzentriert.

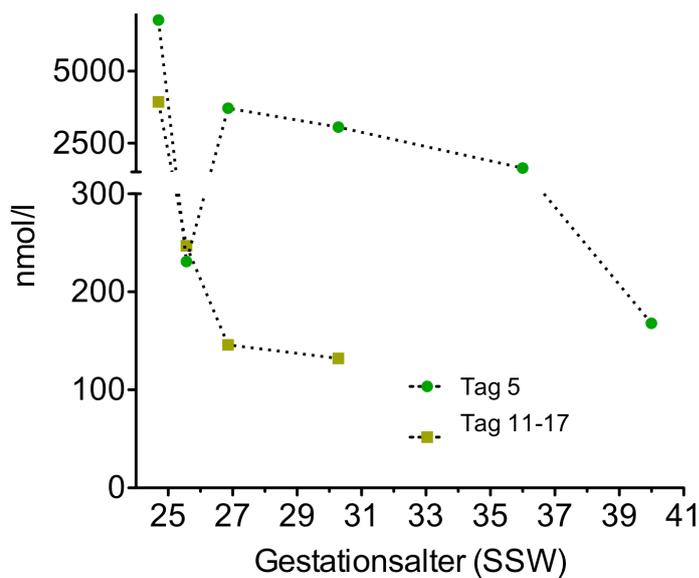


Abbildung 7: TFF 3-Konzentration in Stuhlproben Neugeborener an definierten Tagen post natum, in Abhängigkeit vom Gestationsalter bei Geburt

4.3 TFF 3 ist in Muttermilch nachweisbar

Von den 70 Probandinnen haben wir in 192 Muttermilchproben die TFF 3-Konzentration gemessen und ausgewertet. In allen Proben ließ sich TFF 3 nachweisen. Die Konzentrationen variieren in den 197 Proben um mehr als das 4000-fache und sind deutlich niedriger als die in Stuhl gemessenen Konzentrationen.

Tabelle 6: TFF 3-Konzentrationen aller gemessenen Muttermilchproben

	TFF 3 [pmol/ l]
Unteres Quartil	117,75
Median	286,5
Oberes Quartil	997,75
Bereich	15 – 63100

Auch in der Hauptstudie haben wir mit dem Shapiro-Wilk-Test geprüft, ob eine Gauss'sche Normalverteilung der gemessenen TFF 3-Konzentrationen vorliegt. In der Auswertung ergab sich keine Gauss'sche Normalverteilung der gemessenen TFF 3-Konzentrationen, sodass wir jegliche weitere Auswertung mittels eines nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Testes bzw. bei mehr als zwei Medianen den Kruskal-Wallis-Test durchgeführt haben.

Um auszuschließen, dass die Differenzen der gemessenen TFF 3-Konzentrationen durch Unterschiede in der Gesamtproteinkonzentration in den Muttermilchproben bedingt sind, haben wir die Proteinkonzentration in 52 repräsentativen Muttermilchproben (an Tag 5, 7, 11, 17 und 30 gewonnen) gemessen. Wir haben die Gesamtproteinkonzentration der Muttermilchproben in den Gruppen A – C verglichen. Die Gesamtproteinkonzentrationen sind in allen drei Gruppen in der ersten Laktationswoche am höchsten. Im Verlauf zeigt sich in allen drei Gruppen vergleichbar einen Abfall der Gesamtproteinkonzentration in den Muttermilchproben. Es gibt zwischen den drei Gruppen keine signifikanten Unterschiede der Gesamtproteinkonzentration in den Muttermilchproben.

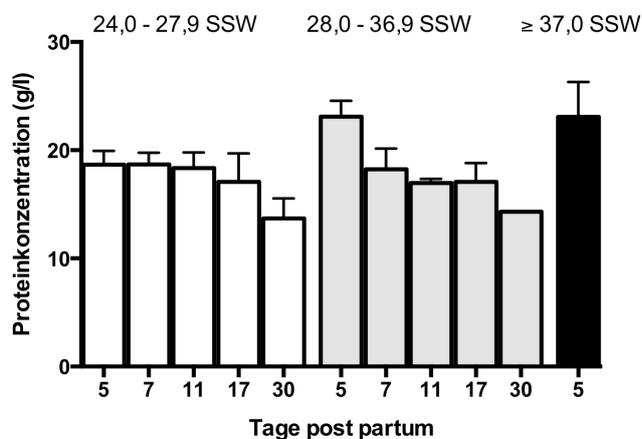


Abbildung 8: Gesamtproteinkonzentration in Muttermilch in Abhängigkeit vom Gestationsalter, an definierten Tagen post partum

Nachdem wir in allen Muttermilchproben TFF 3 nachgewiesen haben, untersuchten wir den Einfluss des Gestationsalters, der Laktationsdauer, des Vorliegens eines Amnioninfektionssyndromes und einer erhöhten CrP-Konzentration, als Hinweis auf ein entzündliches Geschehen vor der Entbindung, auf die TFF 3-Konzentration in Muttermilch.

4.4 Abhängigkeit der TFF 3-Konzentration in Muttermilch vom Gestationsalter

Um herauszufinden, ob die TFF 3-Konzentration in Muttermilch vom Gestationsalter abhängt, haben wir die TFF 3-Konzentrationen der Muttermilchproben, vor allem von Gruppen A und B, verglichen. Da die Probenanzahl in Gruppe C nach Tag 5 post partum sehr gering war, lässt sie keinen aussagekräftigen Vergleich zu den anderen Gruppen zu, daher haben wir Gruppe C ab Tag 7 nicht mit in die Auswertung eingeschlossen.

Tabelle 7: Verteilung der TFF 3-Konzentrationen in Muttermilch abhängig vom Gestationsalter an definierten Tagen post partum (p.p.):

Tag 5 p.p.	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C
	TFF 3 [pmol/ l]	TFF 3 [pmol/ l]	TFF 3 [pmol/ l]
Unteres Quartil	580,5	1065	827
Median	1610	3786	1663
Oberes Quartil	4972	8561	47897
Bereich	254 – 38600	459 – 30600	757 – 63100
Tag 7 p.p.			
Unteres Quartil	234,8	321,3	244
Median	526	948	244
Oberes Quartil	1189	1712	244
Bereich	154 – 1288	238 – 2710	244
Tag 11 p.p.			
Unteres Quartil	203,3	133	--
Median	240	263,5	--
Oberes Quartil	695	406,8	--
Bereich	187 – 729	78 – 1368	--
Tag 17 p.p.			
Unteres Quartil	65	118	--
Median	115	189	--
Oberes Quartil	183	448	--
Bereich	37 – 255	33 – 1061	--
Tag 30 p.p.			
Unteres Quartil	37	45,25	--
Median	65	88	--
Oberes Quartil	112,5	234,5	--
Bereich	20 – 386	23 – 852	--

In der Auswertung der einzelnen Gruppen scheint mit steigendem Gestationsalter die Konzentration an TFF 3 in Muttermilch zu steigen. Im Mann-Whitney-U-Test erreicht der Unterschied nur an Tag 17 das Signifikanzniveau (Vergleich Gruppe A und B: p 0,0312). Im Kruskal-Wallis-Test zeigt sich für Tag 5 und 7 keine Signifikanz. Abbildung 9 a) bis e) zeigt die Box-Plots der TFF 3-Konzentrationen an definierten Tagen post partum in Abhängigkeit vom Gestationsalter.

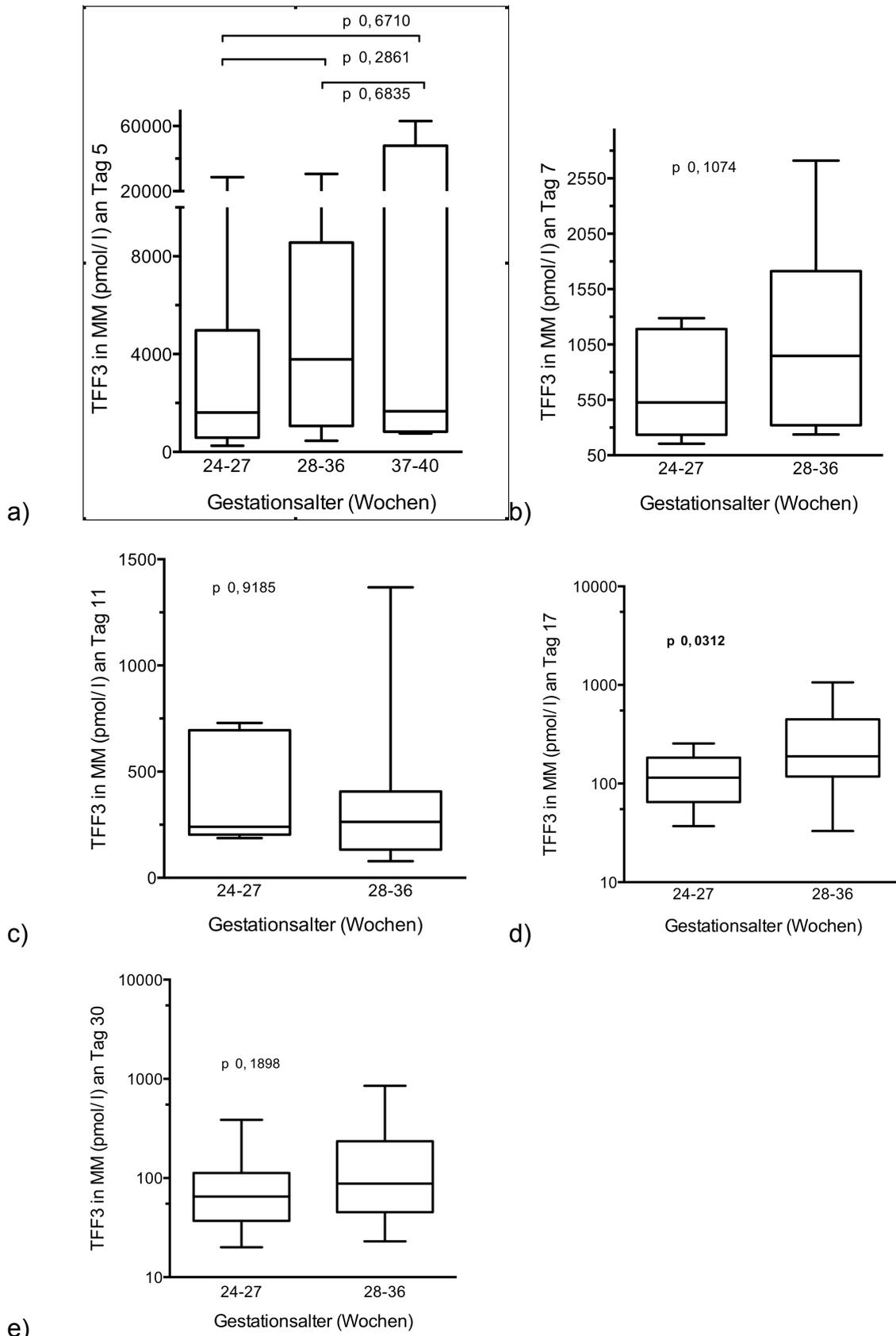


Abbildung 9: TFF 3-Konzentration in Muttermilch in Abhängigkeit vom Gestationsalter, a) an Tag 5, b) an Tag 7, c) an Tag 11, d) an Tag 17 und e) an Tag 30

4.5 Abhängigkeit der TFF 3-Konzentration von der Laktationsdauer

Im nächsten Schritt haben wir die Abhängigkeit der TFF 3-Konzentration in Muttermilch von der Laktationsdauer berechnet. Die TFF 3-Konzentrations-Zeit-Profilen in Abbildung 10 zeigen, dass bei fast allen Probandinnen die TFF 3-Konzentration in Muttermilch im Verlauf der Zeit abnimmt.

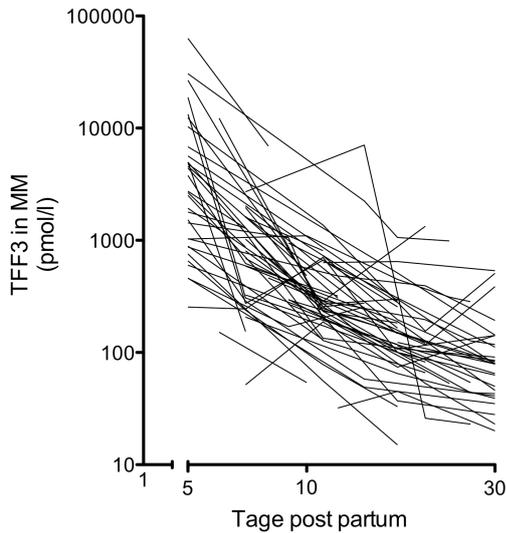


Abbildung 10: TFF 3-Konzentrations-Zeit-Profile aller Probandinnen

Mißt man die TFF 3-Konzentration bezogen auf den Gesamtproteingehalt, ergibt sich das gleiche Bild:

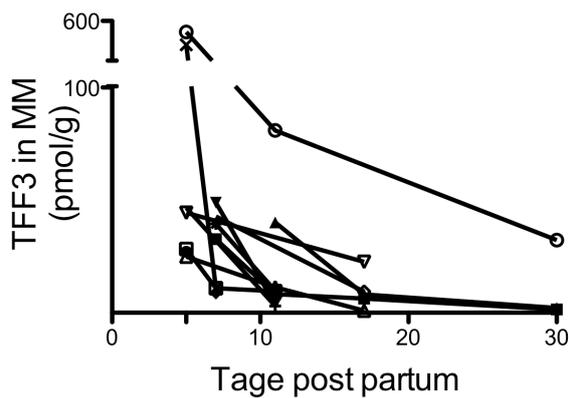


Abbildung 11: TFF 3-Konzentration im zeitlichen Verlauf, bezogen auf die Gesamtproteinkonzentration in Muttermilch

Um zu überprüfen, ob die Unterschiede der TFF 3-Konzentrationen in Muttermilch im Verlauf der Tage post partum signifikant sind, haben wir den Mann Whitney U-Test durchgeführt, zunächst für alle gesammelten Proben, unabhängig vom Gestationsalter. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den TFF 3-Konzentrationen sämtlicher Muttermilchproben vom 5. – 7. Tag und vom 8. – 14. Tag (Median 5. – 7. Tag 1160 pmol/ l, Mittelwert 8. – 14. Tag 282, $p < 0,0001$), den TFF 3-Konzentrationen vom 5. – 7. Tag und vom 17. – 28. Tag (Median 17. – 28. Tag 121 pmol/ l, $p < 0,0001$) und zwischen den TFF 3-Konzentrationen vom 5. – 7. und > 29 . Tag (Mittelwert > 29 . Tag 79, $p < 0,0001$). Auch im Vergleich der TFF 3-Konzentrationen von Tag 8 – 14 und Tag 17 – 28 bzw > 29 bleibt ein signifikanter Unterschied der Konzentrationen ($p < 0,0001$), nur zwischen Tag 17 – 28 und > 29 Tage wird das Signifikanzniveau nicht erreicht ($p 0,0647$). Im Vergleich aller Mediane im Kruskal-Wallis-Test wird ebenfalls das Signifikanzniveau erreicht ($p < 0,0001$).

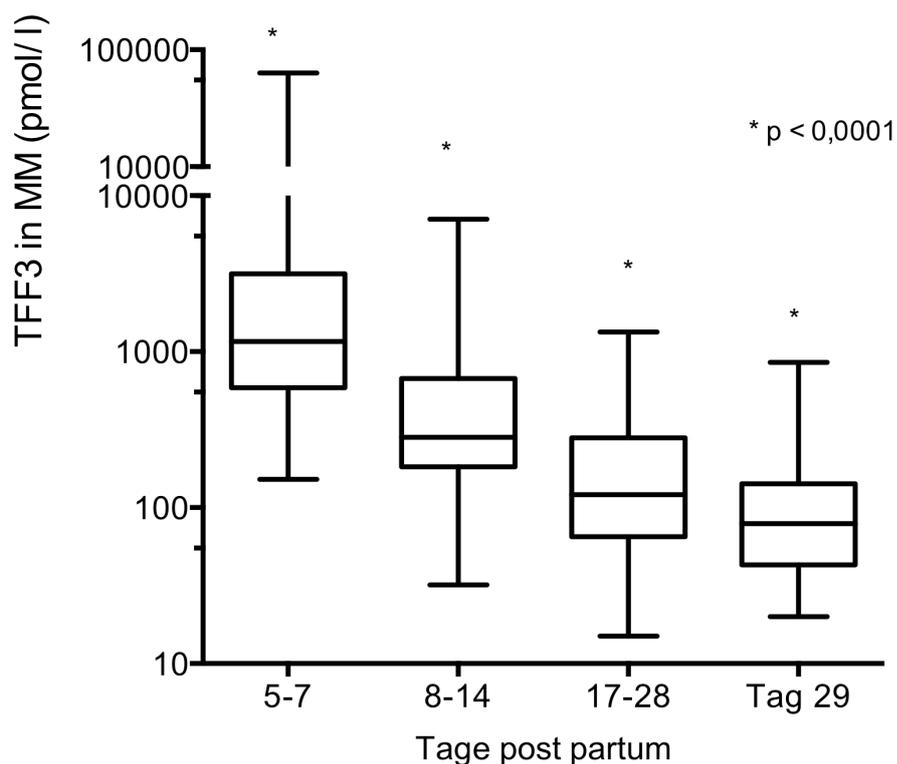


Abbildung 12: TFF 3-Konzentrationen aller Muttermilchproben im zeitlichen Vergleich (Box-Plots mit Medianen und unterem und oberem Quartil)

Anschließend haben wir die Muttermilchproben der Gruppen A – C getrennt untersucht. In allen Verläufen zeigt sich ein Abfall der TFF 3-Konzentration über die Zeit post partum.

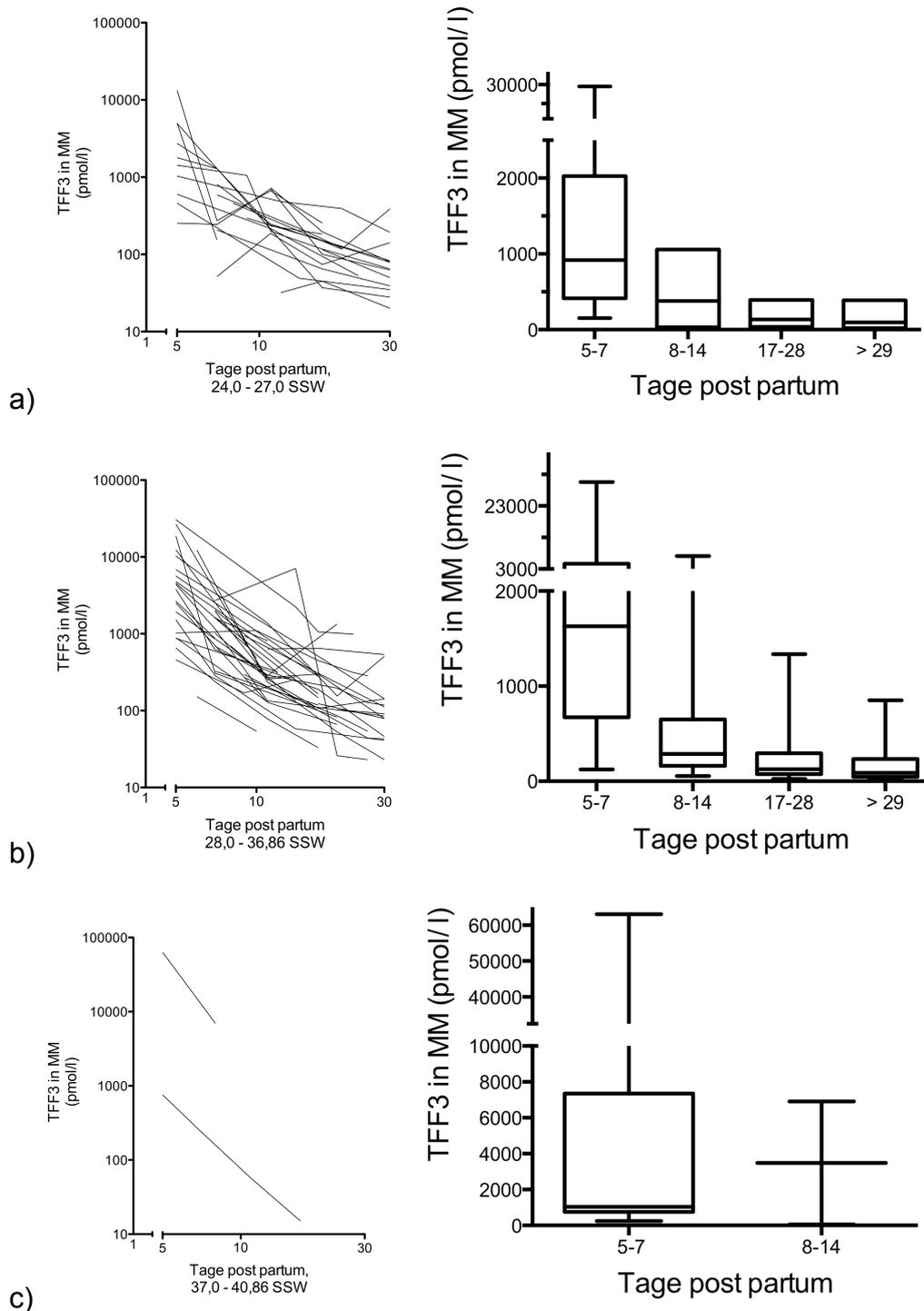


Abbildung 13 a) - c): Abnahme der TFF 3-Konzentration (pmol/ l) in Muttermilch im Verlauf von 30 Tagen, von rechts nach links: Konzentrationszeit-Profile, Box-Plots aller Proben an definierten Tagen post partum; a) extrem preterm (Gruppe A, 24,0 – 27,9 SSW), b) preterm entbundener Probandinnen (Gruppe B, 28,0 – 36,9 SSW) und c) term entbundener Probandinnen (Gruppe C, 37,0 – 40,9 SSW)

In Gruppe C lässt sich kein Unterschied errechnen, da aufgrund der geringen Probenzahl nach Tag 5 keine Mittelwerte erhoben werden können. In Gruppe A (24,0 – 27,9 SSW) zeigt sich sowohl ein signifikanter Unterschied der TFF 3-Konzentrationen zwischen Tag 5 – 7 und Tag 8 – 14 (p 0,0041) als auch zwischen Tag 5 – 7 und Tag 17 – 28 bzw > 29 (p < 0,0001). Auch der Vergleich aller Mediane im Kruskal-Wallis-Test ergibt signifikante Unterschiede (p < 0,0001). In Gruppe B zeigen sich vergleichbare Ergebnisse (p < 0,0001).

Tabelle 8: TFF 3-Konzentrationen in Muttermilch der Gruppen A und B

Gruppe A	Tag 5 – 7	Tag 8 –14	Tag 17 – 28	> Tag 29
	TFF 3 [pmol/ l]	TFF 3 [pmol/ l]	TFF 3 [pmol/ l]	TFF 3 [pmol/ l]
Minimaler Wert	154	32	37	20
Unteres Quartil	413,5	196	62	37
Median	920	240	116	65
Oberes Quartil	2028	675	186,3	112,5
Maximaler Wert	28600	1057	393	386
Gruppe B				
Minimaler Wert	152	54	23	23
Unteres Quartil	780	161,5	70	45,25
Median	1630	289,5	137	88
Oberes Quartil	4678	649,5	296,8	234,5
Maximaler Wert	30600	7063	1337	852,0

4.6 Einfluss eines Amnioninfektionssyndroms auf die TFF 3-Konzentration in Muttermilch

Bei der Charakterisierung der Studienpopulation fiel auf, dass mit 22 von 70 Probandinnen der Anteil der Frauen, die bei Entbindung ein AIS hatten, nicht vernachlässigbar klein war. Wir haben daraufhin den Einfluß eines AIS auf die TFF 3-Konzentration durch Vergleich der TFF 3-Konzentrationen in Muttermilch von Probandinnen mit und ohne Amnioninfektionssyndrom. Diagnosekriterien eines Amnioninfektionsyndromes waren klinische Symptome, wie Fieber oder ein druckschmerzhafter Uterus, mit einer systemischen Infektionsreaktion, die durch ein

positives CrP ($\geq 1,5$ mg/dl) belegt wurde. Eine Leukozytose haben wir nicht als paraklinischen Hinweis auf ein Amnioninfektionsyndrom gewertet, da sie durch eine Lungenreifeinduktion mit Glucocorticoiden verursacht sein könnte. Vor Entbindung hatten 16 der 22 Probandinnen mit einem AIS Glucocorticoid zur Lungenreifeinduktion beim Fetus erhalten. Bestätigt wurde das AIS durch den histologischen Nachweis einer Entzündung der Eihäute oder der Placenta.

Wir konnten nur ein deutlicher Unterschied der Mediane der TFF 3-Konzentrationen am 5. und 7. Tag post partum finden, der im Mann-Whitney-U-Test das Signifikanzniveau nicht erreicht ($p > 0,05$).

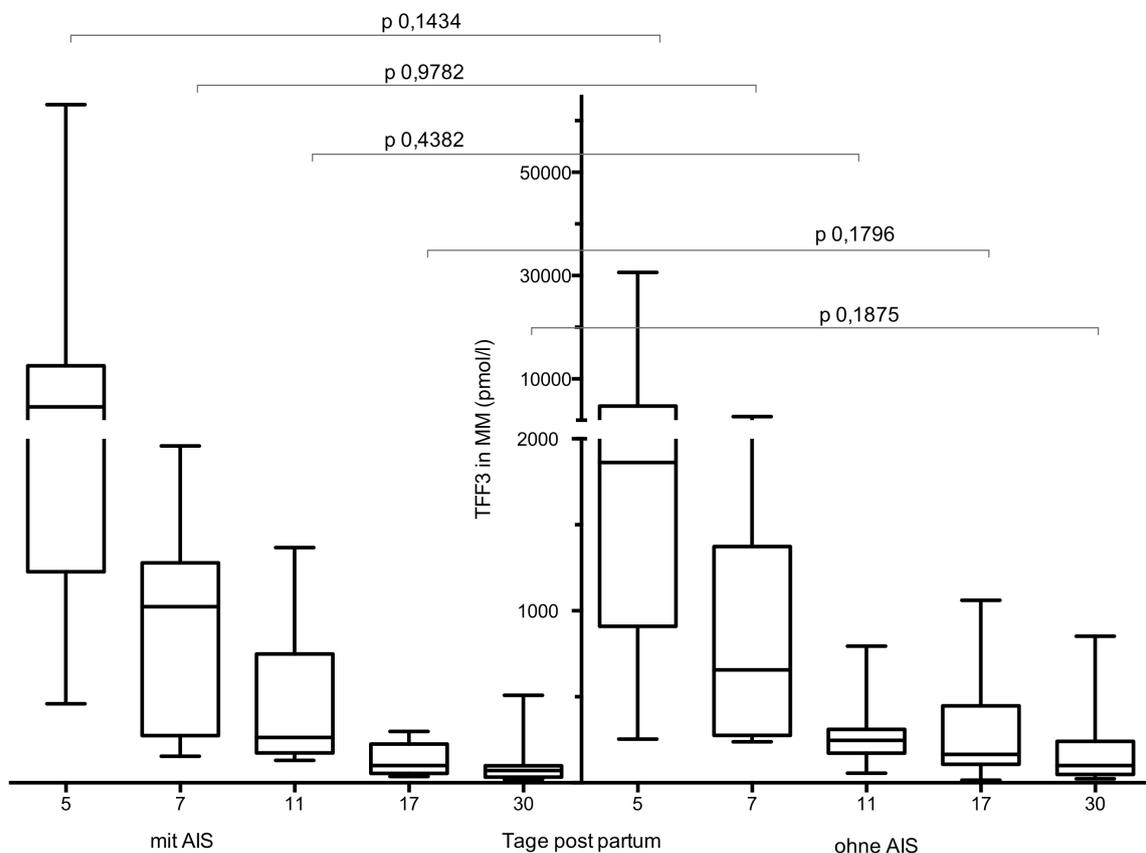


Abbildung 14: TFF 3-Konzentration in Muttermilch bei Studienpatientinnen mit bzw. ohne AIS an definierten Tagen

4.7 Einfluss des C-reaktiven Proteins auf die TFF 3-Konzentration

In der Literatur wird TFF 3 als protektiver Faktor charakterisiert, der im Falle einer Entzündung oder einer Infektion hochreguliert wird. Da einige der Probandinnen Erkrankungen hatten, die mit einer Entzündung einhergehen, z.B. Infektionen (andere als ein AIS) oder Autoimmunerkrankungen, wollten wir den Einfluss einer peripartalen systemischen Entzündungsreaktion auf die TFF 3-Konzentration untersuchen. Als laborchemischen Marker für eine Entzündung haben wir das C-reaktive Protein gewählt. Wir haben die TFF 3-Konzentrationen in Muttermilch von Probandinnen mit einem peripartal pathologischen CrP ($\geq 1,5$ mg/ dl) ohne AIS mit den TFF 3-Konzentrationen in Muttermilch der Probandinnen mit einem normwertigen CrP verglichen. Im Mann-Whitney-U-Test ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der TFF 3-Konzentrationen in Muttermilch an definierten Tagen post partum (s. Abb. 15).

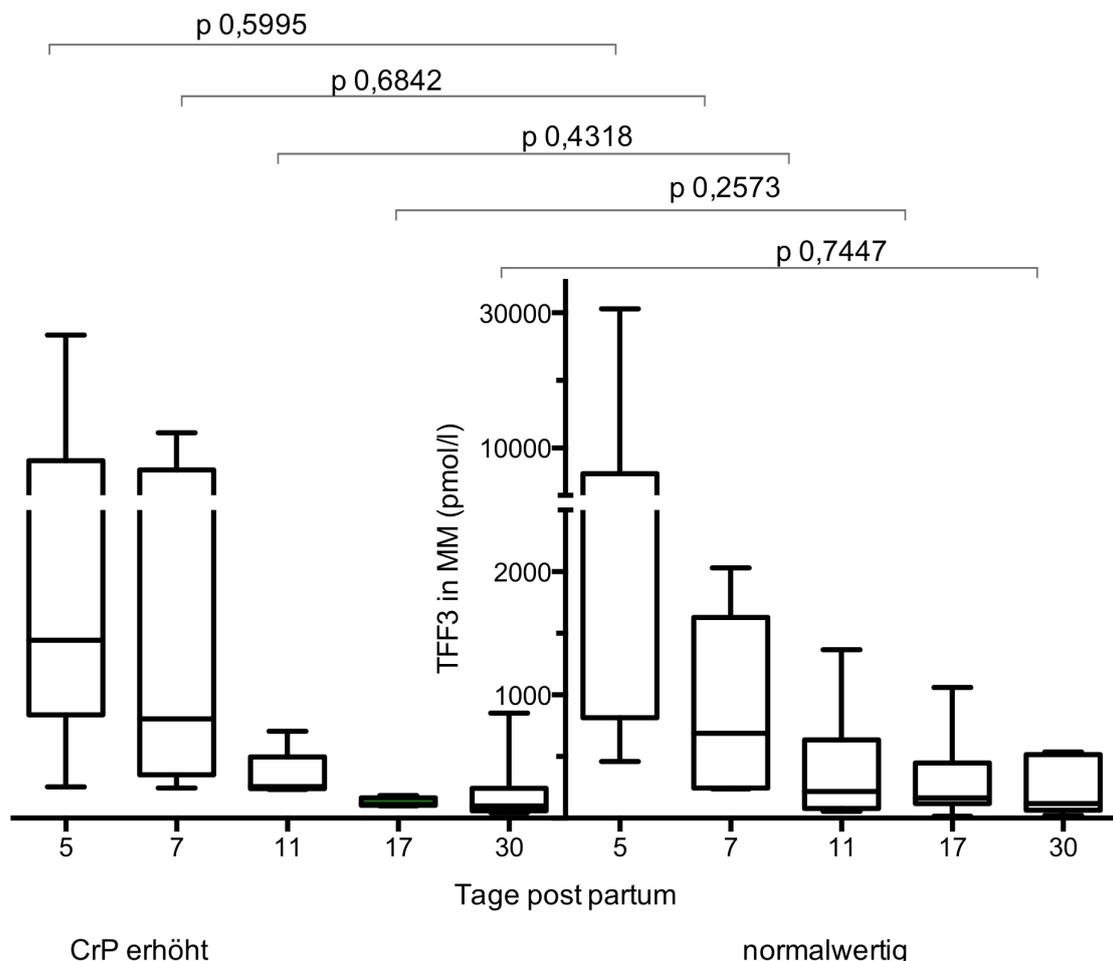


Abbildung 15: TFF 3-Konzentration in Muttermilch am definierten Tagen post partum, in Abhängigkeit von der peripartalen CrP-Konzentration

4.8 TFF 3-Konzentration in Muttermilch bei NEC des Kindes:

Wir wollten den Zusammenhang zwischen der TFF 3-Konzentration in Muttermilch und einer NEC beim zugehörigen Kind der Probandin untersuchen. Drei der 72 Probandinnen haben ein Kind, bei dem im stationären Verlauf der Verdacht auf eine NEC bestand. Bei zwei der drei Kinder bestand der klinische Verdacht auf eine NEC (Gestationsalter bei Geburt 25,9 bzw. 27,9 SSW), der sich weder radiologisch noch laborchemisch bestätigte. Daher konnte nur die Muttermilch einer Probandin auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der TFF 3-Konzentration ihrer Muttermilch und einer NEC bei ihrem Kind untersucht werden. Bei dem zugehörigen Kind (Gestationsalter bei Geburt 27,0 SSW) wurde eine NEC IIIB diagnostiziert, die chirurgisch behandelt wurde. Die TFF 3-Konzentration in der Muttermilch beträgt am fünften Tag post partum 4972 pmol/l und am 17. Tag post partum 37 pmol/l. Die Werte liegen innerhalb der berechneten Bereiche der TFF 3-Konzentration der übrigen 69 Probandinnen. Aufgrund der geringen Fallzahl können wir keinen Zusammenhang zwischen der TFF 3-Konzentration in Muttermilch und einer NEC beim zugehörigen Kind bestätigen.

5. Diskussion

In unserer Studie haben wir untersucht, ob TFF 3 in Muttermilch vorhanden ist und dem gestillten oder mit Muttermilch ernährten Neugeborenen zugeführt wird. TFF 3 wurde bisher in vielen verschiedenen Körpergeweben und -flüssigkeiten nachgewiesen, bisher gab es aber noch keinen Nachweis von TFF 3 in Muttermilch. Wir konnten zeigen, dass TFF 3 im Vergleich zu Serum in hohen Konzentrationen in Muttermilch vorhanden ist, sowohl in der monomeren als auch in der dimeren Form (Vestergaard EM et al. 2008). Der erste Nachweis von TFF 3-mRNA in gesundem und in neoplastischem bzw. hyperplastischem Brustdrüsengewebe gelang 1997 (Poulsom R et al. 1997). Wir können keine Aussage darüber treffen, ob die sezernierte Menge vollständig in der Brustdrüse gebildet wird, oder ob ein Teil aus dem Blut in die Brustdrüse aufgenommen wird. Durch die Messungen konnten wir beschreiben, dass in der ersten Woche der Laktation die TFF 3-Konzentrationen in Muttermilch etwa zehnfach höher waren als die TFF 3-Serumkonzentration in gesunden Individuen (Vestergaard EM et al., 2008). Die TFF 3-Konzentration in Muttermilch sinkt bis zum 15. Tag der Laktation und erreicht die Werte der Serumkonzentration gesunder Erwachsener, etwa um 200 pmol/l. Dieser Verlauf ist bereits von Wachstumsfaktoren wie EGF und TGF- β bekannt (Dvorak B et al., 2003). Hesselund Samson und Vestergaard beschrieben einen signifikanten Anstieg der TFF 3-Serumkonzentration während der Schwangerschaft. Dabei zeigte sich, im Vergleich zu der Serumkonzentration nicht schwangerer Frauen ein 28-facher Anstieg der Konzentration in der 32. SSW, und ein 47-facher Anstieg in der 39. SSW. Offen bleibt die Frage, ob das in der Brustdrüse gebildete TFF 3 zu der Serumkonzentration beiträgt oder umgekehrt. Prägnant ist, dass sowohl die TFF 3-Konzentration in Muttermilch, als auch im Serum zum Zeitpunkt der Entbindung erhöht ist und post partum auf Serumnormwerte absinkt (Hesselund Samson M et al. 2008). Es wurde bisher nicht beschrieben, innerhalb welches Zeitraumes die Serumkonzentration sich normalisiert, sodass sich die Frage stellt, ob die Serumkonzentration im gleichen Intervall wie die TFF 3-Konzentration in Muttermilch abfällt, innerhalb von etwa zwei Wochen. Dies spräche für einen gegenseitige Beeinflussung der beiden Konzentrationen.

In unserer Studie haben wir uns mit dem protektiven, muzinassoziierten Peptid TFF 3 beschäftigt, dem ein schützender Effekt bei inflammatorischen Darmerkrankungen wie der NEC zugeschrieben wird. Frühgeburtlichkeit ist der wichtigste Risikofaktor für die

Entwicklung einer NEC. Mit abnehmendem Gestationsalter sind unabdingbare Funktionen des Gastrointestinaltraktes noch „unreif“, was Frühgeborene einem hohen Risiko aussetzt, intestinale Erkrankungen wie eine NEC zu entwickeln. Neben pankreatischen Proteasen, die vermindert gebildet werden bzw. weniger aktiv sind, und einer geringeren Bildung von Magensaft, ist auch die intestinale Mukusschicht verringert und weniger viskös. Dadurch wird wiederum die Adhärenz und Invasion von pathologischen Erregern erleichtert (Martin CA, Walker WA 2006). TFF 3 steigert die Viskosität des Mukus durch Quervernetzung von darin enthaltenen Glykoproteinen. Die verminderte Viskosität des Mukus im Darm Frühgeborener ist ein Hinweis dafür, dass TFF 3 beim Menschen entwicklungsabhängig exprimiert wird. Im Tiermodell konnte eine entwicklungsabhängige Expression von TFF 3 bereits nachgewiesen werden (Lin J et al. 1999, Mashimo H et al. 1995). Einen fehlender Schutz bzw. Reparaturmechanismus des Darmes Frühgeborener, durch Mangel an intestinalem TFF 3, kann die Entwicklung einer NEC bedeuten. Das relative Risiko an einer NEC zu erkranken ist für ein rein Muttermilch ernährtes Frühgeborenes ernährtes Kind vier mal niedriger als für ein Formula ernährtes Frühgeborenes (McGuire W, Anthony MY 2002) und wird Muttermilch-Anteil in der Gesamtnahrungsmenge gesteigert, sinkt das NEC-Risiko pro 10 % mehr Muttermilchanteil um den Faktor 0,83 (Meinzen-Derr J et al. 2008). Eine Multicenter-Studie aus Großbritannien zeigte, dass die Inzidenz einer NEC unter Frühgeborenen, die eine reine Muttermilchernährung erhielten, sechs bis zehnfach geringer war als bei Frühgeborenen, die nur mit Formulanahrung ernährt wurden (Lucas A, Cole TJ 1990). Unumstritten ist, dass in der Muttermilch enthaltene Proteine wie TFF 3 und Wachstumsfaktoren einen positiven Effekt auf den unreifen Verdauungstrakt des Frühgeborenen haben. Fraglich ist, ob das in Muttermilch enthaltene TFF 3 seine Wirkung im Darm des Kindes entfalten kann. Um herauszufinden, ob TFF 3 aus der Muttermilch im kindlichen Darm protektiv wirkt, muss zunächst erörtert werden, ob TFF 3 aus der Muttermilch im kindlichen Verdauungstrakt inaktiviert wird oder intakt bleibt. Aufgrund der charakteristischen dreiblättrigen Trefoil-Domäne ist TFF 3 sehr stabil und widerstandsfähig gegenüber Säuren und proteolytischen Verdauungsmechanismen (Thim L et al. 1995). Lebenthal und Lebenthal beschrieben 1999, dass die Sekretion pankreatischer Proteasen und Magensäure im Magen bzw. Dünndarm Frühgeborener nur in geringem Ausmaß stattfindet und diese Funktion des Verdauungstraktes erst in der Neugeborenenperiode, also nach korrigiert 40 SSW, ausreift (Lebenthal A, Lebenthal E 1999). Daher wird vermutet, dass in Muttermilch enthaltene bioaktive Peptide, zu

denen TFF 3 gehört, nicht im Magen Frühgeborener aufgespalten und somit unwirksam werden. Da TFF 3 spezifisch im Dün- und Dickdarm exprimiert wird, ist es dementsprechend wichtig, dass TFF 3 aus der Muttermilch nicht bereits im Magen inaktiviert wird, um einen potentiellen Mangel des Faktors bei Frühgeborenen auszugleichen, oder zumindest abzuschwächen. Kelly und Newell zeigten, dass Frühgeborene mit einem Gestationsalter zwischen 24 und 29 SSW vom ersten Lebenstag an einen Magen-pH unter 4 haben und der Magen-pH bis zur dritten Lebenswoche signifikant auf ein Niveau zwischen 1,7 und 2,0 sinkt (Kelly EJ et al. 1993). Es ist somit nicht genau geklärt, mit welchem Gestationsalter, bzw. in welchem Zeitraum nach Beginn der enteralen Ernährung die Sezernierung von Magensäure und pankreatischen Proteasen beginnt und somit zumindest eine partielle Inaktivierung von TFF 3 möglich wäre. Fraglich ist auch, ob TFF 3 überhaupt im Magen inaktiviert wird, denn Studien belegen, dass TFF 3 auch im Magen, vor allem in Antrum und Kardial, gebildet wird und weitgehend unempfindlich gegenüber proteolytischer Spaltung ist (Kouznetsova I et al. 2004). Jedoch findet die Exkretion von TFF 3 in das basische Milieu der Schleim sezernierenden Becherzellen statt und nicht im sauren Milieu des Magens oberhalb der protektiven Schleimschicht. Ab der zweiten Lebenswoche steigt die NEC-Inzidenz. Es ist bisher nicht bekannt, ob dies ein Effekt des effizienten Magen-pH-Niveaus, im Sinne einer Inaktivierung protektiver Peptide der Muttermilch, ist, das sich bis zur dritten Lebenswoche etabliert hat. Ursächlich kann auch der Konzentrationsabfall protektiver Peptide und Wachstumsfaktoren in der Muttermilch sein. Dafür spricht der Mangel dieser Faktoren in Formulanahrung, dem das höhere NEC-Risiko bei Formula ernährten Frühgeborenen angeschuldet wird (Dvorak B et al. 2003).

Wir wollten herausfinden, ob die TFF 3-Konzentration in Muttermilch von dem Gestationsalter abhängig ist. Da bisher TFF 3 in Muttermilch noch nicht nachgewiesen wurde, finden sich in der Literatur zu dieser Fragestellung keine Daten. Wie oben beschrieben steigt die Serumkonzentration von TFF 3 in der Schwangerschaft signifikant an. Das legt den Verdacht nahe, dass auch die TFF 3-Konzentration in Muttermilch in verschiedenen Schwangerschaftswochen unterschiedlich hoch ist. Diese Hypothese setzt allerdings voraus, dass die TFF 3-Konzentration in Muttermilch sich in gleichem Maße ändert wie die Serumkonzentration. Auch dieser Zusammenhang ist bis jetzt nicht untersucht. McLean et al. wiesen anhand gesteigerter Corticotropin-releasing-Hormon-Serumspiegel bei Frauen, die preterm entbunden wurden, erhöhte Östrogenserumspiegel nach (McLean M et al. 1995). Da die TFF 3-Expression in der

Brustdrüse einer Östrogenregulation unterliegt, liegt die Überlegung nahe, dass TFF 3 in Muttermilch von Frauen, die preterm entbunden wurden, durch den erhöhten Östrogenspiegel in höheren Konzentrationen vorhanden ist, als bei termingerecht entbundenen Frauen. Wenn wir aber von der Hypothese ausgehen, dass ein Mangel an TFF 3 in Muttermilch, als Mangel eines protektiven Faktors, einen Risikofaktor für die Entwicklung einer NEC darstellt, müssen wir von einer verminderten TFF 3-Konzentration in Muttermilch preterm entbundener Frauen ausgehen. Die beiden Überlegungen stehen in einem Widerspruch zueinander, was die TFF 3-Konzentration in Muttermilch anbelangt. Um herauszufinden ob sich eine der Hypothesen bestätigen läßt, haben wir in dieser Studie untersucht, ob eine Abhängigkeit der TFF 3-Konzentration in Muttermilch von dem Gestationsalter besteht. Dafür haben wir die Probandinnen in drei Gruppen aufgeteilt (s. Material und Methoden). Es fällt auf, dass die Gruppen unterschiedlich viele Probandinnen einschließen, obwohl wir zu Beginn der Studie eine ausgeglichene Probandinnenanzahl in allen Gruppen angestrebt haben. In genauerer Betrachtung der Gruppen tragen zwei Umstände zu der ungleichen Verteilung bei. In der Gruppe der Probandinnen, die termingerecht entbunden wurden, erschwerte der Umstand, dass die Liegedauer auf der Wöchnerinnenstation regelhaft nur 48 Stunden beträgt, die Aquirierung von Probandinnen: die Einschlußkriterien wurden nicht vollständig erfüllt, da die Milchprobengewinnung erst ab dem fünften Lebenstag des Kindes beginnen sollte. Nur Frauen, deren stationäre Liegedauer mehr als 48 Stunden betrug, aufgrund eigener Erkrankung oder Erkrankung des Kindes, bzw. deren Kind noch nach der Entlassung der Probandin im Krankenhaus verblieb, eigneten sich als Probandin für die Studie. Nur dann konnte die regelrechte Gewinnung und Lagerung der Proben ausreichend gewährleistet werden. Ein Großteil der Wöchnerinnen eignete sich somit nicht als Probandin, immerhin 3 von 11 ursprünglich rekrutierten Probandinnen mussten im Nachhinein aus der Studie ausgeschlossen werden. Frauen, deren Liegedauer mehr als 48 Stunden betrug, wurden zumeist per Kaiserschnitt entbunden (Liegedauer 5 Tage). Weitere Indikationen für eine längere stationäre Liegedauer waren vor allem Infektionen, wobei die Mastitis puerperalis ein Ausschlusskriterium in dieser Studie darstellte, Gestationsdiabetes oder ein schwangerschaftsinduzierter Hypertonus bzw. ein arterieller Hypertonus durch Präeklampsie oder ein HELLP-Syndrom. Diese Erkrankungen stellten keine Ausschlusskriterien dar. Die Indikationen für einen verlängerten Krankenhausaufenthalt bei den reifen Neugeborenen waren vor allem eine behandlungsbedürftige Hyperbilirubinämie, konnatale Infektionen mit der Notwendigkeit

einer antibiotischen Therapie oder eine Trink- bzw. Gedeihschwäche, oft aufgrund von Stillproblemen. Wenn die Frauen die Einschlusskriterien erfüllten, gestaltete sich trotzdem die Probengewinnung aufgrund der immer noch kurzen Liegedauer schwierig. Keine der Frauen gab Milchproben nach dem siebten Tag post partum ab, da nach diesem Zeitpunkt alle Probandinnen mit ihren Kindern entlassen waren. Auf der Intensivstation gelang die Rekrutierung der Probandinnen einfacher, da ihre Kinder, ob zu früh geboren oder aus anderen Gründen intensivpflichtig, Liegezeiten über fünf Tage hatten. Dies galt für Gruppe B und C. Am fünften Tag hatten ausreichend Frauen einen Milcheinschuß, sodass eine umfassende Zahl an Probandinnen rekrutiert werden konnte. Die Frauen brachten ihre Muttermilch täglich mit, oder haben die Milch in der Klinik abgepumpt, sodass die Probengewinnung und Lagerung unproblematisch war. Dieser Unterschied in der Rekrutierung der Probandinnen bedingt einerseits die Abweichungen in der Menge der Probandinnen pro Gruppe. Andererseits haben wir die Frauen in Abhängigkeit von der Schwangerschaftswoche, in der sie entbunden wurden in die Gruppen aufgeteilt: wir wollten einerseits eine Referenzgruppe schaffen mit Frauen, die termingerecht entbunden wurden (Gruppe C) und andererseits eine Gruppe mit Frauen, deren Kinder das höchste Risiko für die Entwicklung einer NEC fallen, also unter vollendeten 28 SSW (Gruppe A). Dadurch differieren die Zeiträume, in denen die Frauen entbunden wurden voneinander: In Gruppe A sind insgesamt vier Schwangerschaftswochen zusammengefasst (Entbindung nach 24,0 – 27,9 SSW), in Gruppe B neun (Entbindung nach 28,0 – 36,9 SSW) und in Gruppe C sechs Schwangerschaftswochen (Entbindung nach 37,0 – 42,9 SSW). Die Gruppe der Frauen, deren Milchproben die Referenzwerte darstellten sollten, also die Frauen, die termingerecht entbunden wurden, war die Gruppe mit der geringsten Probandinnenzahl. Wir konnten zeigen, dass in dieser Gruppe die TFF 3-Konzentrationen untereinander vergleichbar hoch waren. Aufgrund dieser geringen Streubreite der Werte sind wir trotz fehlender Normalverteilung davon ausgegangen, dass auch diese geringe Probenzahl repräsentative TFF 3-Konzentrationen in Muttermilch termingerecht entbundener Frauen liefert. Der Unterschied in der Probandinnenzahl zu den anderen beiden Gruppen, in denen die Anzahl vergleichbar hoch waren (Gruppe A: 4 SSW, 21 Probandinnen/ Gruppe B: 9 SSW, 41 Probandinnen), stellte sich somit als nicht relevant heraus. Wir haben die TFF 3-Konzentration in Muttermilch an verschiedenen Tagen post partum gemessen. Die gemessenen TFF 3-Konzentrationen waren nicht normalverteilt, weder in den einzelnen Gruppen, noch in Bezug auf alle Proben gemeinsam betrachtet. Da nicht

ausgeschlossen werden konnte, dass die gemessenen Konzentrationen durch unterschiedliche Proteinfractionen in den Muttermilchproben bedingt waren, haben wir zunächst die TFF 3-Konzentrationen bezogen auf den Gesamtproteingehalt gemessen. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Verhältnis der TFF 3-Konzentrationen zueinander, auch ergaben sich keine Schwankungen der Gesamtproteinfractionen zwischen den Proben und bezogen auf die Gesamtproteinkonzentration ergab sich bei den TFF 3-Konzentrationen dementsprechend keine Normalverteilung. Ob die Gesamtzahl der Proben letztendlich zu gering war um eine Normalverteilung zu erreichen, lässt sich nur spekulieren, da bisher keine vergleichbaren Studien vorliegen.

In der Auswertung der TFF 3-Konzentrationen haben wir am 5. Tag post partum keine Abhängigkeit von dem Gestationsalter zwischen allen drei Gruppen gefunden und an Tag 7, 11 und 30 post partum waren die TFF 3-Konzentrationen in Muttermilch nicht signifikant geringer Gruppe A als in Gruppe B. Einzig an Tag 17 post partum zeigte sich ein signifikanter Unterschied der TFF 3-Konzentrationen, die der Gruppe B (28,0 – 36,9 SSW) waren signifikant höher (p 0,0312) als die von Gruppe A (24,0 – 27,9 SSW). Die TFF 3-Konzentrationen in Muttermilch unterscheiden sich überwiegend nicht signifikant an gleichen Tagen nach der Entbindung, unabhängig davon, in welcher Schwangerschaftswoche die Probandinnen entbunden wurden. Da wir an Tag 17 aber ein signifikanter Anstieg der TFF 3-Konzentration in Muttermilch nachgewiesen haben, lässt sich vermuten, dass mit einer größeren Probenzahl in allen Gruppen auch an anderen Tagen ein signifikanter Unterschied nachweisen lässt. Vorerst konnten wir die Hypothese, dass mit steigendem Gestationsalter bei Geburt das NEC-Risiko aufgrund steigender TFF 3-Konzentrationen in der Muttermilch sinkt, weder komplett widerlegen, noch eindeutig beweisen. Die TFF 3-Konzentration in Muttermilch ist, wie vermutet durch niedrigere Östrogenspiegel bedingt, nach 40 SSW nicht geringer als bei Frauen, die am Beginn des dritten Trimenons entbunden wurden.

Eine weitere Hypothese, die wir untersucht haben, war, dass sich die TFF 3-Konzentration in Muttermilch über die Stilldauer verändert. Bekannterweise tritt eine NEC selten in der ersten Lebenswoche, sondern meistens zwischen dem 14. und 20. Lebenstag auf. Daher stellt sich die Frage, ob in diesem Zeitraum Veränderungen in der Ernährung des Kindes, also in der Zusammensetzung der Muttermilch und deren Gehalt an protektiven Peptiden, stattgefunden haben. Wir konnten zeigen, dass die TFF 3-Konzentration in Muttermilch ab der zweiten Woche post partum etwa auf das Level der

TFF 3-Serumkonzentration abfällt, unabhängig von der Schwangerschaftswoche, in der die Frau entbunden wurde. Die niedrigsten Konzentrationen haben wir zwischen dem 17. und 30. Tag post partum gemessen. Die TFF 3-Konzentration haben wir nicht täglich gemessen, daher ist unklar, wann genau der Abfall der TFF 3-Konzentration in Muttermilch beginnt. Der Zeitraum, in dem wir die geringer werdenden TFF 3-Konzentrationen gemessen haben, fällt mit dem Zeitraum des höchsten NEC-Risikos zusammen. Die TFF 3-Konzentration in Muttermilch ist in einem Zeitraum verringert, in dem auch anderen wichtige Faktoren, nachgewiesenermaßen vor allem EGF, welcher die Reifung des prematuren Gastrointestinaltraktes fördert, in geringerer Konzentration in Muttermilch vorhanden sind. Dieser Zeitraum beginnt zwischen dem 14. und 30. Tag post partum (Dvorak B et al. 2003).

TFF 3 schützt den Darm durch Quervernetzung des Mukus, andererseits ist es an der schnellen Antwort auf eine mukosale Schädigung beteiligt: nach Schädigung der intestinalen Mukosa kommt es nach Injektion von TFF 3 zu einem geringeren Anstieg von Entzündungsparametern (Zhang BH et al. 2003). TFF 3-defiziente Knock-out-Mäuse reagieren nach Reizung des Intestinums durch Dextransulfat mit einer ausgeprägten Kolitis (Mashimo H et al. 1995). Die enterale Gabe von TFF 3 führt zu einer Ausheilung der Kolitis durch Induktion der Zellmigration (Mashimo H et al. 1996) und ist protektiv gegenüber einer Kolitis, wenn es enteral vor der Schädigung des Darmes gegeben wird (Babyatsky MW et al. 1996). Die intraperitoneale Gabe von TFF 3 führt zu einem geringeren Gewebsschaden bei einer Trinitrobenzoesäure-induzierten Kolitis (Teng X et al. 2009). Mäuse, die Trefoilfaktoren überexprimieren, entwickeln nach Gabe von Indomethacin keine intestinale Entzündung, im Gegensatz zum Wildtyp (Playford RJ et al. 1996). In einem Modell Hypoxie- und Kältestress-induzierter NEC bei neugeborenen Ratten bewirkte die anschließende subkutane Injektion von TFF 3 histologisch eine deutlich geringere Ausprägung der NEC (Shi L et al. 2007). Wichtig ist dabei zu betonen, dass speziell die Wirkung von TFF 3 untersucht wurde, da TFF 3 vor allem in Dün- und Dickdarm lokalisiert ist, im Gegensatz zu TFF 1 und 2. Diese finden sich hauptsächlich in der gastralen Mukosa. Eine NEC findet vor allem im terminalen Ileum und Colon statt. Daher haben wir unsere Arbeit auf TFF 3 ausgerichtet.

TFF 3 wird im Rahmen von inflammatorischen Prozessen betroffenen Geweben hochreguliert (Zhang BH et al. 2006), Dies spiegelt sich in einer steigenden Serumkonzentration wieder (Grønbaek H et al. 2006). Deshalb sollte in dieser Studie der Einfluss eines Amnioninfektionssyndromes bzw. einer CrP-Erhöhung als Ausdruck von

Infektionen oder anderen entzündlichen Prozessen als ein Amnioninfektionssyndrom auf die TFF 3-Konzentration in Muttermilch untersucht werden. Frühgeburtlichkeit ist in erhöhtem Maße mit einem Amnioninfektionssyndrom assoziiert. In diesem Zusammenhang wollten wir herausfinden, ob die TFF 3-Konzentration in Muttermilch bei einem AIS (Definition s. Material und Methoden) ansteigt. Es ist wichtig diese Fragestellung zu untersuchen, weil ein Amnioninfektionssyndrom eine antibiotische Therapie des Kindes der betroffenen Probandin nach sich zieht. Folglich steigt für das frühgeborene Kind das Risiko an einer NEC zu erkranken. Prolongierte intravenöse Therapien mit Antibiotika führen bekannterweise zu einer Zunahme der NEC-Inzidenz bei ELBW-Frühgeborenen (Cotten CM et al. 2009). TFF 3 wird im Rahmen von inflammatorischen Prozessen hochreguliert. Nimmt die TFF 3-Konzentration in Muttermilch bei einem Amnioninfektion von Mutter und Kind zu, könnte dies wiederum ein Schutz des unreifen Intestinums bei einer antibiotischen Therapie darstellen. Die Prävalenz eines Amnioninfektionssyndromes war erwartungsgemäß in der Gruppe mit der höchsten Anzahl an ELBW-Frühgeborenen (Gruppe A) am höchsten. Es zeigte sich nur am fünften Tag post partum in der Auswertung eine höhere TFF 3-Konzentration in Muttermilch in der AIS-Gruppe. Der Unterschied stellte sich in der in der statistischen Analyse jedoch als nicht signifikant heraus. Wahrscheinlich steigt die TFF 3-Konzentration in Muttermilch bei einem AIS nicht signifikant an, da die Brustdrüse nicht an dem inflammatorischen Geschehen beteiligt ist. Die erhöhte Serumkonzentration bei infektiösen Geschehen entsteht durch eine gesteigerte TFF 3-Produktion in den betroffenen Organen, in diesem Fall der Uterus bzw. die Placenta mit den Eihäuten. Der Nachweis von TFF 3 in den reproduktiven Organen der Frau gelang erst kürzlich, dabei wurde erstmals gesundes, bzw. nicht tumorös verändertes Gewebe untersucht (Madsen J et al. 2007). Zuvor wurde bereits nachgewiesen, dass TFF 3 in diversen Tumoren, auch ausserhalb des Gastrointestinaltraktes, exprimiert wird.

Wir untersuchten auch die TFF 3-Konzentration in Muttermilch von Frauen, die zum Zeitpunkt der Entbindung an anderen Infektionen oder entzündliche Geschehen erkrankt waren. Wir haben auf ein entzündliches bzw. infektiöses Geschehen geschlossen bei einem erhöhten C-reaktiven Protein ($>1,5$ mg/ dl) mit Ausschluss eines Amnioninfektionssyndroms. Auch in diesem Vergleich zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den TFF 3-Konzentrationen in Muttermilch. Eine erhöhte TFF 3-Serumkonzentration, die aufgrund eines entzündlichen Geschehens zustande kommt, führt also nicht zu einer erhöhten TFF 3-Konzentration in der Muttermilch. Offensichtlich

bewirkt ein entzündliches Geschehen eine organbezogene Hochregulierung von TFF 3, und nicht eine systemische Hochregulierung des Peptids. Es lässt sich somit auch vermuten, dass das nachgewiesene TFF 3 in Muttermilch, unabhängig davon, ob eine Entzündung oder Infektion vorliegt oder nicht, zumindest zum überwiegenden Anteil in der Brustdrüse gebildet wird.

Um eine Aussage treffen zu können, ob sich die TFF 3-Konzentration in der Muttermilch der Probandinnen, deren Kinder an einer nekrotisierenden Enterokolitis erkrankten von der TFF 3-Konzentration in Muttermilch der Mütter, deren Kinder keine NEC entwickelten, unterscheidet, ist die Zahl erkrankter Kinder zu gering. Komplizierend kommt hinzu, dass das einzige Kind in der Studie mit der NEC IIIB einen Zwilling hat, der nicht an einer NEC erkrankte.

Zu Beginn der Studie wollten wir herausfinden, ob das protektive Peptid TFF 3 im Darm Frühgeborener entwicklungsabhängig exprimiert wird und ob eine Korrelation zwischen der Erkrankung an einer NEC und der Höhe der TFF 3-Konzentration im Stuhl Früh- und Neugeborener, als Marker für die TFF 3-Konzentration im Darm, besteht. Um diese Fragen beantworten zu können, haben wir Stuhlproben Früh- und Neugeborener an definierten Tagen post natum gesammelt und auf die TFF 3-Konzentration in Abhängigkeit von Gestationsalter und chronologischem Lebensalter, untersucht. Es hat sich herausgestellt, dass die TFF 3-Konzentrationen in den Stuhlproben unabhängig von Gestationsalter und Lebensalter weit voneinander abweichen. Wir schuldeten dies der Durchführbarkeit der Probenentnahme zu. Stuhl enthält neben flüssigen auch feste Bestandteile, wie abgeschilferte Schleimhautzellen, in denen hohe TFF 3-Konzentrationen zu vermuten sind, die dazu führen, dass TFF 3 nicht homogen auf die gesammte Stuhlportion verteilt ist. Entnimmt man nur einen Anteil der Stuhlportion, gewinnt man also keine repräsentative TFF 3-Menge, die gemessene TFF 3-Konzentration kann demnach ebenfalls nicht repräsentativ sein. Eine verlässliche Konzentrationsbestimmung wäre wahrscheinlich nur durch Homogenisierung der kompletten Stuhlportion und Extraktion von TFF 3 aus diesem Homogenisat zu gewährleisten. Wir haben daher diese Fragestellung nicht weiter verfolgt. Auch wenn wir zwar errechnet haben, dass zwischen den wenigen TFF 3-Konzentrationen, die wir gemessen haben, keine signifikante Abhängigkeit von chronologischem Alter und Gestationsalter besteht, ist jedoch die Probenzahl zu gering und die Probengewinnung erwies sich retrospektiv als fehlerbehaftet, sodass wir letztendlich keine verlässliche Aussage treffen können, ob TFF 3 im kindlichen Darm entwicklungsabhängig exprimiert

wird. Dementsprechend haben wir der zweiten Fragepunkt, ob die gemessenen TFF 3-Konzentrationen invers mit dem Auftreten einer NEC korreliert sind, also eine geringe intrainestinale TFF 3-Konzentration eine NEC begünstigt, nicht bearbeitet.

6. Zusammenfassung

In dieser klinischen Studie haben wir Muttermilch auf das protektive Peptid TFF 3 untersucht und dieses erstmalig in humaner Milch nachgewiesen. Wir haben die Muttermilch von Frauen, die termingerecht entbunden wurden mit der Muttermilch von Frauen, die preterm, d.h. vor vollendeten 37 SSW, entbunden wurden, verglichen. Ziel war es, herauszufinden, ob die TFF 3-Konzentration sich in Abhängigkeit vom Gestationsalter oder der Laktationsdauer verändert. Frühgeborene werden durch eine reine Muttermilchernährung, wahrscheinlich durch den Gehalt an protektiven Peptiden, vor einer NEC geschützt. TFF 3 ist ein solches protektives Peptid, es wird vermutet, dass ein Mangel an TFF 3 ebenfalls mit einem erhöhten NEC-Risiko bei Frühgeborenen einhergeht.

Insgesamt wurden 197 Muttermilchproben von 70 Probandinnen untersucht, 62 Probandinnen wurden preterm entbunden. Wir fanden heraus, dass die TFF 3-Konzentration in Muttermilch primär deutlich höher ist als im Serum und innerhalb von zwei bis drei Wochen post partum in etwa auf das Niveau der Serumkonzentration gesunder Erwachsener absinkt. Nachfolglich haben wir die TFF 3-Konzentrationen in Muttermilch in Abhängigkeit vom Gestationsalter und im postpartalen zeitlichen Verlauf verglichen. Nur an Tag 17 post partum zeigte sich ein signifikanter Anstieg der TFF 3-Konzentration in Muttermilch mit steigendem Gestationsalter, an allen anderen Tagen waren die Unterschiede in den TFF 3-Konzentrationen nicht signifikant. Die TFF 3-Konzentration in Muttermilch nimmt innerhalb von 30 Tagen post partum, vor allem zwischen dem 17. und 30. Tag post partum signifikant ab, unabhängig vom Gestationsalter. Dies ist auch der Zeitraum, in dem die Inzidenz der NEC bei Frühgeborenen am höchsten ist. Es besteht kein Zusammenhang zwischen einem Amnioninfektionssyndrom, Infektionen oder anderen entzündlichen Erkrankungen der Probandinnen und der TFF 3-Konzentration in Muttermilch. Stuhlproben Neu- und Frühgeborener stellen keine geeignete Matrix zur Messung von TFF 3 und Prüfung auf eine entwicklungsabhängige Expression von TFF 3 im Darm dar. Wir konnten letztendlich zeigen, dass in der Zeit des höchsten Risikos eine NEC zu entwickeln, ein weiteres wichtiges protektives Peptid in der Muttermilch in reduzierter Konzentration vorliegt.

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Systemische und gastrointestinale Symptome einer NEC
Tabelle 2:	Gruppeneinteilung der Probandinnen
Tabelle 3:	Charakterisierung der Studienpopulation
Tabelle 4:	Anzahl der gesammelten Muttermilchproben der einzelnen Gruppen
Tabelle 5:	TFF 3-Konzentrationen aller gemessenen Stuhlproben
Tabelle 6:	TFF 3-Konzentrationen aller gemessenen Muttermilchproben
Tabelle 7:	Verteilung der TFF 3-Konzentrationen in Muttermilch abhängig vom Gestationsalter an definierten Tagen post partum (p.p.)
Tabelle 8:	TFF 3-Konzentrationen in Muttermilch der Gruppen A und B

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2:

Abbildung 1:	a) Pneumatosis intestinalis (Pfeil), b) freie Luft (extraluminal) im Abdomen durch NEC mit Perforation im Ileum
Abbildung 2:	Charakteristische Trefoil-Disulfid-Schleifen
Abbildung 3:	Lokalisation der TFF-Gene auf Chromosom 21q22.3
Abbildung 4:	Expression von TFF 3 in wachsendem Rattendarm, Westernblot
Abbildung 5:	TFF 3-Konzentration in Stuhl Früh- und Neugeborener an definierten Tagen post natum, Vergleich der Konzentrationen in der ersten mit der zweiten und dritten Lebenswoche
Abbildung 6:	Vergleich der TFF 3-Konzentrationen in Stuhl in Abhängigkeit vom Gestationsalter
Abbildung 7:	TFF 3-Konzentration in Stuhlproben Neugeborener an definierten Tagen post natum, in Abhängigkeit vom Gestationsalter bei Geburt
Abbildung 8:	Gesamtproteinkonzentration in Muttermilch in Abhängigkeit vom Gestationsalter, an definierten Tagen post partum
Abbildung 9:	TFF 3-Konzentration in Muttermilch in Abhängigkeit vom Gestationsalter
Abbildung 10:	TFF 3-Konzentrations-Zeit-Profile aller Probandinnen
Abbildung 11:	TFF 3-Konzentration im zeitlichen Verlauf, bezogen auf die Gesamtproteinkonzentration in Muttermilch

- Abbildung 12: TFF 3-Konzentrationen aller Muttermilchproben im zeitlichen Vergleich
- Abbildung 13: Abnahme der TFF 3-Konzentration (pmol/l) in Muttermilch im Verlauf von 30 Tagen
- Abbildung 14: TFF 3-Konzentration in Muttermilch bei Studienpatientinnen mit bzw. ohne AIS an definierten Tagen
- Abbildung 15: TFF 3-Konzentration in MM am definierten Tagen post partum in Abhängigkeit von der peripartalen CrP-Konzentration

9. Literaturverzeichnis

1. Alison MR, Chinery R, Poulsom R, et al. Experimental ulceration leads to sequential expression of spasmolytic polypeptide, intestinal trefoil factor, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha messenger-RNAs in rat stomach. *J.Pathol.* 1995;175:405-414
2. Amer MD, Hedlund E, Rochester J, Caplan MS. Platelet-activating factor concentration in the stool of human newborns. *Biol.Neonate.* 2004;85(3):159-166
3. Anderson DM, Kliegman RM. The relationship of neonatal alimentation practices to the occurrence of endemic necrotizing enterocolitis. *Am.J.Perinatol.* 1991;8:62-67
4. Babyatsky MW, deBeaumont M, Thim L, Podolsky DK. Oral trefoil peptides protect against ethanol-induced and indomethacin-induced gastric injury in rats. *Gastroenterology* 1996;110:489-497
5. Baker ME. Oestrogen-induced pS2 protein is similar to pancreatic spasmolytic polypeptide and the kringle domain. *Biochem.J.* 1988;253:307-309.
6. Bell MJ, Ternberg JL, Feigin RD, et al. Neonatal necrotizing enterocolitis - therapeutic decisions based upon clinical staging. *Ann.Surg.* 1978;187:1-7
7. Berseth CL. Gestational evolution of small intestine motility in preterm and term infants. *J.Pediatr.* 1989;115:646-651
8. Buchmiller TL, Shaw KS, Lam ML, et al. Effect of prenatal dexamethasone administration: fetal rabbit intestinal nutrient uptake and disaccharidase development. *J.Surg.Res.* 1994;57:274-279
9. Bury RG, Tudehope D. Enteral antibiotics for preventing necrotizing enterocolitis in low birthweight or preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2001(1):CD000405
10. Caplan MS. Probiotic and prebiotic supplementation for the prevention of neonatal necrotizing enterocolitis. *J Perinatol* 2009;29(2):S2-S6
11. Caple J, Armentrout D, Huseby V et al. Randomized controlled trial of slow versus rapid feeding volume advancement in preterm infants. *Pediatrics* 2004;114:1597-1600
12. Chinery R, Williamson J, Poulsom R. The gene encoding human intestinal trefoil factor (TFF 3) is located on chromosome 21q22.3 clustered with other members of the trefoil peptide family. *Genomics* 1996;32:281-284
13. Claud EC, Lu L, Anton PM, et al. Developmentally regulated IkappaB expression in

- intestinal epithelium and susceptibility to flagellin-induced inflammation. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 2004;101:7404-7408
14. Cotten CM, Taylor S, Stoll B, et al. Prolonged duration of initial empirical antibiotic treatment is associated with increased rates of necrotizing enterocolitis and death for extremely low birth weight infants. *Pediatrics* 2009;123:58-66
 15. Davey AM, Wagner CL, Cox C, Keding JW. Feeding premature infants while low umbilical artery catheters are in place: a prospective randomized trial. *J.Pediatr.* 1994;124:795-799
 16. Dignass A, Lynch-Devaney K, Kindon H, Thim L, Podolsky DK. Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta independent pathway. *J.Clin.Invest.* 1994;94(1):376-383
 17. Dunn SP, Gross KR, Dalsing M et al. Superoxide: a critical oxygen-free radical in ischemic bowel injury. *J.Pediatr.Surg.* 1984;19:740-744
 18. Dvorak B, Fituch CC, Williams CS et al. Increased epidermal growth factor levels in human milk of mothers with extremely premature infants. *Pediatric Research* 2003;54(1):1-5
 19. Ewaschuk JB, Unger S, Harvey S et al. Effect of pasteurization on immune components of milk: implications for feeding preterm infants. *Appl.Physiol.Nutr.Metab.* 2011;36(2):175-82
 20. Fança-Berthon P, Michel C, Pagniez A et al. Intrauterine growth restriction alters postnatal colonic barrier maturation in rats. *Pediatric Research* 2009;66(1):47-52
 21. Fowlie PW. Intravenous indomethacin for preventing mortality and morbidity in very low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2000(2):CD000174
 22. Futura GT, Turner JR, Taylor CT et al. Hypoxia-inducible factor 1 -dependent induction of the trefoil factor protects barrier function during hypoxia. *J.Exp.Med.* 2001;193(9):1027-1034
 23. Gibson GR. Dietary modulation of the human gut flora using prebiotics. *Br.J.Nutr.* 1998;80:S209-S212
 24. Gordon PV, Attridge JT. Emerging trends in acquired neonatal intestinal disease: is it time to abandon Bell's criteria? *J.Perinatol.* 2007;27:661-671
 25. Grønbaek H, Vestergaard EM, Hey H et al. Serum trefoil factors in patients with inflammatory bowel disease. *Digestion* 2006;74:33-39
 26. Guillet R, Stoll BJ, Cotten CM et al. Association of H2-Blocker therapy and higher incidence of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics*

2006:117(2):E137-E506

27. Guthmann F, Kluthe C, Bühner C. Probiotics for Prevention of Necrotizing Enterocolitis: an Updated Metaanalysis. *Klin.Padiatr.* 2010:222:284-290
28. Halliday HL, Ehrenkranz RA, Doyle LW. Early (< 8 days) postnatal corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants (Review). *Cochrane Database Syst Rev* 2010(1):CD001146
29. Hamosh M. Protective function of proteins and lipids in human milk. *Biol.Neonate.* 1998:74:163-176
30. Harmsen HJM, Wideboer-Veloo Ac, Raangs GC et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Ped Gastroenterol.Nutr.* 2000:30:61-67
31. Hesselund Samson M, Vestergaard EM, Milman N et al. Circulating serum trefoil factors increase dramatically during pregnancy. *Scand.J.Clin.* 2008;68(5):369-374
32. Horbar JD, Carpenter J, Badger GJ et al. Mortality and Neonatal Morbidity among infants 501 to 1500 grams from 2000 to 2009. *Pediatrics* 2012:129:1019-1026
33. Israel EJ, Schiffrin EJ, Carter EA, Freiberg E, Walker WA. Prevention of necrotizing enterocolitis in the rat with prenatal cortisone. *Gastroenterology* 1990:99:1333-1338
34. Jilling T, Simon D, Lu J, et al. The roles of bacteria and TLR4 in rat and murine models of necrotizing enterocolitis. *J.Immunol.* 2006:177(5):3273-3282
35. Jakowlew SB, Breathnach R, Jeltsch JM, Masiakowski P, Chambon P. Sequence of the pS2 induced by estrogen in the human breast cancer cell line MCF 7. *Nucleic Acids Res.* 1984:12:2861-2878
36. Jørgensen KH, Jørgensen KD, Thomsen J, Thim L. Spasmolytic polypeptide 1979 UK Patent Application 2059970
37. Kanto WP jr, Hunter JE, Stoll BJ. Recognition and medical management of necrotizing enterocolitis. *Clin.Perinatol.* 1994:21:335-346
38. Kelly EJ, Newell SJ, Brownlee KG et al. Gastric acid secretion in preterm infants. *Early Hum.Dev.* 1993:35(3):215-220
39. Kindon H, Pothoulakis C, Thim L, Lynch-Devaney K, Podolsky DK. Trefoil peptide protection of intestinal epithelial barrier function – cooperative interaction with mucin glycoprotein. *Gastroenterology* 1995:109:516-523
40. Kliegman RM. Models of the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J.Pediatr.* 2008:117(1):S2-S5
41. Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ et al. Role of spasmolytic polypeptide in

- healing of stress-induced gastric lesions in rats. *Regul. Peptides* 1997;68:71-79
42. Kouznetsova I, Peitz U, Vieth M et al. A gradient of TFF 3 (trefoil factor family 3) peptide synthesis within the normal human gastric mucosa. *Cell.Tissue.Res.* 2004;316:155-165.
43. Langer G, Jagla W, Behrens-Baumann W, Walter S, Hoffmann W. Ocular TFF-peptides: new mucus-associated secretory products of conjunctival goblet cells. *Adv.Exp.Med.Biol.* 2002;506:313-316.
44. Lebenthal A, Lebenthal E. The ontogeny of the small intestine epithelium. *J.Parenter.Enteral.Nutr.* 1999;23(5):S3-S6
45. Lin J, Holzman IR, Jiang P, Babyatsky MW. Expression of intestinal trefoil factor in developing rat intestine. *Biol.Neonate.* 1999;76:92-97
46. Lin J, Nadroo AM, Chen W. Ontogeny and prenatal expression of trefoil factor 3/ ITF in the human intestine. *Early.Hum.Dev.* 2003;71:103-109
47. Lin PW, Stoll BJ. Necrotising enterocolitis. *Lancet* 2006;368(9543):1271-1283
48. Longman RJ, Douthwaite J, Sylvester PA, et al. Coordinated localisation of mucins and trefoil peptides in the ulcer associated cell lineage and the gastrointestinal mucosa. *Gut* 2000;47:792-800
49. Lucas A, Cole TJ. Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet* 1990;336:1519-1523
50. Lucas A, Gibbs JH, Baum JD. The biology of drip breast milk. *Early.Hum.Dev.* 1978;2(4):251-261
51. Madsen J, Nielsen O, Tornoe I et al. Tissue localization of human trefoil factor 1,2 and 3. *J.Histochem.Cytochem.* 2007;55:505-513
52. Mallick ICH, Yang W, Winslet MC, Seifalian M. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig.Dis.Sci.* 2004;49:1359-1377
53. Marchildon MB, Buck BE, Abdenour G. Necrotizing enterocolitis in the unfed infant. *J.Pediatr.Surg.* 1982;17(5):620-624
54. Martin CR, Walker WA. Intestinal immune defences and the inflammatory response in necrotizing enterocolitis. *Semin.Fetal.Neonatal.Med.* 2006;369-377
55. Mashimo H, Podolsky DK, Fishman MC. Structure and expression of murine intestinal trefoil factor: High evolutionary conservation and post natal expression. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1995;210:31-37
56. Mashimo H, Wu DC, Podolsky DK. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science* 1996;274:262-265

57. May FE, Westley BR. Expression of human intestinal trefoil factor in malignant cells and its regulation by oestrogen in breast cancer cells. *J.Pathol.* 1997;182:404-413
58. Mc Guire W, Anthony MY. Formula milk versus term human milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2001(2): CD002971
59. Mc Guire W, Bombell S. Slow advancement of enteral feed volumes to prevent necrotising enterocolitis in very low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2008(2):CD001241
60. McLean M, Bisits A, Davies J et al. A placental clock controlling the length of human pregnancy. *Nat.Med.* 1995;1(5):460-463
61. Meinzen-Derr J, Poindexter B, Wrage L et al. Role of human milk in extremely low birth weight infants` risk of necrotizing enterocolitis or death. *J.Perinatol.* 2008:1-6
62. Moisan J, Mattei M, Mandel J. Chromosome localisation and polymorphism of an oestrogen-inducible gene specifically expressed in some breast cancers. *Hum.Genet.* 1988;79:168-171
63. Morgan J, Young L, McGuire W. Delayed introduction of progressive enteral feeds to prevent necrotising enterocolitis in very low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2011(3):CD001970
64. Moro G, Minoli J, Mosca M, et al. Dosage-related bifidogenic effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-fed term infants. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 2002;34:291-5
65. Moss RL, Kalish LA, Duggan C, et al. Clinical parameters do not adequately predict outcome in necrotizing enterocolitis: a multi-institutional study. *J.Perinatol.* 2008;28:665-74
66. Mukaida N. Interleukine-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *Int.J.Hematol.* 2000;72:391-8
67. Newburg DS, Walker WA. Protection of the neonate by the innate immune system of developing gut and of human milk. *Pediatric Research* 2007;61(1):2-8
68. Ochoa TJ, Noguera-Obenza M, Ebel F et al. Lactoferrin impaires type III secretory system function in enteropathogenic Escherichia coli. *Infect.Immun.* 2003;71:5149-5155
69. Ostlie DJ, Spilde TL, StPeter SD et al. Necrotizing enterocolitis in full-term infants. *J.Pediatr.Surg.* 2003;38:1039-1042
70. Penders J, Thijs C, Vink C et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 2006;118(2):511-521

71. Pietzcker J, Kluthe C, Klinghammer K et al. Developmental delay in hypoxia-induced HO-1 expression predisposes to gut injury. *J.Perinat.Med.* 2001:1-7
72. Playford RJ, Macdonald E, Johnson WS. Colostrum and milk-derived peptide growth factors for the treatment of gastrointestinal disorders. *Am.J.Clin.Nutr.* 2000:72(1):5-14
73. Playford RJ, Marchbank T, Goodlad RA, Poulsom R, Hanby AM. Transgenic Mice that Overexpress the Human Trefoil Peptide pS2 have Increased Resistance to Intestinal Damage. *Proc.Nat.Acad.Sci. USA* 1996; 93:2137
74. Podolsky DK, Gerken G, Eysing A, Cario E. Colitis-associated variant of TLR 2 causes impaired mucosal repair because of TFF 3 deficiency. *Gastroenterology* 2009:137(1):209-220
75. Podolsky DK, Lynch-Devaney K, Stow JL et al. Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion. *J.Biol.Chem.* 1993:268:6694-6702
76. Poulsom R, Henby AM, Lalani EN et al. Intestinal trefoil factor (TFF 3) and pS2 (TFF 1) but not spasmolytic polypeptide (TFF 2) mRNAs are coexpressed in normal, hyperplastic and neoplastic human breast epithelium. *J.Pathol.* 1997:183:30-38
77. Quigley MA, Henderson G, Anthony MY, McGuire W. Formula milk versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2007(4):CD002971
78. Rossier A, Sarrot S, Delplanque J. L'enterocolite ulcéronecrotique du premature. *Sem.Hop.Paris* 1959:35:1428
79. Sántulli TV, Schullinger JN, et al. Acute necrotizing enterocolitis in infancy: a review of 64 cases. *Pediatrics* 1975:55:376-387
80. Schanler RJ, Schulman RJ, Lau C, Smith EO, Heitkemper MM. Feeding strategies for premature infants: Randomized trial of gastrointestinal priming and tube-feeding method. *Pediatrics* 1999:103:434-439
81. Seib T, Blin N, Hilgert K et al. The three human trefoil genes TFF 1, TFF 2 and TFF 3 are located within a region of 55 kb on chromosome 21q22.3. *Genomics* 1997:40:200-202
82. Seib T, Dooley S, Welter C. Characterization of the genomic structure and the promoter region of the human intestinal trefoil factor. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1995:214:195-199.
83. Semple JI, Newton JL, Westley BR, May FE. Dramatic diurnal variation in the

- concentration of the human trefoil peptide TFF 2 in gastric juice. *Gut* 2001;48:648-655
84. Shi L, Zhang BH, Yu HG et al. Intestinal trefoil factor in treatment of neonatal necrotizing enterocolitis in the rat model. *J.Perinat.Med* 2007;35:443-446
85. Shub MT, Pang KY, Swann DA, Walker WA. Age-related changes in chemical composition and physical properties of mucus glycoproteins from rat small intestine. *Biochem.J.* 1983;215:405-411
86. Shulman RJ, Schanler RJ, Lau C et al. Early feeding, antenatal glucocorticoids, and human milk decrease intestinal permeability in preterm infants. *Pediatr.Res.* 1998;44:519-523
87. Siebold AE. Brand in der kleinen Curvatur des Magens eines atrophischen Kindes. *Jornal für Geburtshilfe, Frauenzimmer und Kinderkrankheiten* 1825;5:3-5
88. Stark AR, Carlo WA, Tyson JE, et al. Adverse effects of early dexamethasone in extremely-low-birth-weight infants. *N.Engl.J.Med.* 2001;344:95-101
89. Stoll BJ. Epidemiology of necrotizing enterocolitis. *Clin.Perinatol.* 1994;21:205-18
90. Suemori S, Lynch-Devaney K, Podolsky DK. Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor; Tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 1991;88:11017-11021
91. Szabo JS, Mayfield SR, Oh W, Stonestreet BS. Postprandial gastrointestinal blood flow and oxygen consumption: effects of hypoxemia in neonatal piglets. *J.Pediatr.Res.* 1987;21:93-98
92. Taupin DR, Kinoshita K, Podolsky DK. Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 2000;97:799-804
93. Teng X, Xu LF, Zhou P, Sun HW, Sun M. Effects of trefoil peptide 3 on expression of TNF-alpha, TLR 4, and NF-kappaB in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis mice. *Inflammation* 2009;32(2):120-129
94. Thim L. Trefoil peptides: from structure to function. *Cell.Mol.Life.Sci.* 1997(53):888-903
95. Thim L, Madsen F. Effect of trefoil on the viscoelastic properties of mucus gel. *European.J.Clin.Investigation.* 2002;32:519-527
96. Thim L, Woldike HF, Nielsen PF, et al. Characterization of human and rat intestinal trefoil factor produced in yeast. *Biochemistry* 1995;34:4757-4764
97. Tomasetto C, Rio M, Gautier C et al. hSP, the domain-duplicated homolog of pS2 protein is co-expressed with pS2 in the stomach but not in breast carcinoma.

EMBO.J. 1990(9):407-414

98. Tomasetto C, Rockel N, Mattei MG, Fujita R, Rio MC. The gene encoding the human spasmolytic protein (SML1/ hSP) is in 21q22.3, physically linked to the homologous breast cancer marker gene BCE1/ pS2. *Genomics* 1992;13:1328-1330
99. Tyson JE, Kennedy KA. Trophic feeding for parenterally fed infants. *Cochrane Database Sys Rev* 2005;3:CD000504
100. Vestergaard EM, Nexø E, Wendt A, Guthmann F. Trefoil factors in human milk. *Early.Hum.Dev.* 2008;84:631-635
101. Vestergaard EM, Poulsen S, Grønbaek H et al. Development and evaluation of an ELISA for human trefoil factor 3. *Clin.Chemistry.* 2002;48(10):1689-1695
102. Walsh MC, Kliegman RM. Necrotizing enterocolitis: treatment based on staging criteria. *Pediatr.Clin.North.Am.* 1986;33:179-201
103. Wang Y, Hoeng JD, Malin KJ et al. 16S rRNA gene-based analysis of fecal microbiota from preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. *ISME J.* 2009;3:944-954
104. Wright NA, Pike C, Elia G. Induction of a novel epidermal growth factor-secreting cell lineage by mucosal ulceration in human gastrointestinal stem cells. *Nature* 1990;343:82-85.
105. Wright NA, Poulsom R, Stamp G et al. Trefoil Peptide gene expression in gastrointestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1992;104:12-20
106. Young CM, Kingma SDK, Neu J. Ischemia-Reperfusion and Neonatal Intestinal Injury. *J.Pediatr.* 2011;158:E25-E28
107. Zhang BH, Yu HG, Sheng ZX, Luo HS, Yu JP. The therapeutic effect of recombinant human trefoil factor 3 on hypoxia-induced necrotizing enterocolitis in immature rat. *Regulatory Peptides* 2003;116:53-60
108. Zillner E: Ruptura flexurae sigmoidis neonati inter partum. *Virchows Arch (A)* 1884;96:267-318

10. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Anke Wendt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Nekrotisierende Enterokolitis und Trefoilfaktor 3 im Darm Frühgeborener und in Muttermilch“ 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 („Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit meinem Betreuer PD Dr. F. Guthmann, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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 erfolgter Publikation

Anke Wendt hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Vestergaard EM, Nexø E, Wendt A, Guthmann F. Trefoil factors in human milk. *Early.Hum.Dev.* 2008;84:631-635

Beitrag im Einzelnen: Anke Wendt war in die Planung des Studiendesigns der Pilot- und Hauptstudie zum Thema „Nekrotisierende Enterokolitis und Trefoilfaktor 3 im Darm Frühgeborener und in Muttermilch“ mit einbezogen, für die Rekrutierung und Aufklärung der Probanden, Probenacquisition und Datenerfassung zuständig, und war an der statistischen Auswertung und an der Erstellung des Manuskriptes der Publikation (Revision) beteiligt.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Publikationsliste:

End-of-life opioid administration on neonatal and pediatric intensive care units: Nurses' attitudes and practice; Garten L, Daehmlow S, Reindl T, Wendt A et al. European Journal of Pain Volume: 15 Issue: 9 Pages: 958-965 Published Oct. 2011

Sinus vein thrombosis in an ELBW (extremely low birth weight) with maternal antiphospholipid syndrome and other thrombotic risk factors; restitution ad integrum under hirudin therapy. Schmitz-Parpart J, Wendt A, Ziemer S, et al. Klinische Padiatrie Volume: 222 Supplement: 1 Pages: S94-S95 Published: Jun. 2010

Trefoil factors in human milk; Vestergaard E M, Nexø E, Wendt A, et al. Early Human Development Volume: 84 Issue: 10 Pages: 631-635 Published: Oct. 2008

11. Lebenslauf

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

12. Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. F. Guthmann für die Überlassung des Themas, Bereitstellung der Materialien und für die umfassende Betreuung und seine konstruktiven Vorschläge während all der Zeit. Frau Dr. E.M. Vestergaard danke ich vielmals für die unkomplizierte Zusammenarbeit und Bearbeitung der Proben, was mit die Durchführung dieser Arbeit mit ermöglicht hat. Ich bedanke mich bei allen Kinderkrankenschwestern und ärztlichen Kollegen der Klinik für Neonatologie der Charité für die kooperative Zusammenarbeit. Meiner Familie danke ich von ganzem Herzen dass sie mir immer beigestanden hat und immer an mich geglaubt hat.