

Aus der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde VI
(Schwerpunkt: Neonatologie, neonatologische Intensivmedizin)

**Cholin, Arachidonsäure und Docosahexaensäure
in der Muttermilch Frühgeborener**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Hövelmann, Julia
2022**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. W. Bernhard

2. Berichterstatter: Professor Dr. O. Kagan

Tag der Disputation: 30.09.2022

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Inhaltsverzeichnis..... | 1 |
| Tabellenverzeichnis | 4 |
| Abbildungsverzeichnis | 6 |
| Anhangsverzeichnis | 8 |
| Abkürzungsverzeichnis | 9 |
| 1 Einleitung | 11 |
| 1.1 Grundlagen der neonatalen Entwicklung | 11 |
| 1.2 Die Muttermilch | 14 |
| 1.3 Grundlagen zur Ernährung Frühgeborener | 16 |
| 1.4 Physiologische und Biochemische Grundlagen des Cholins und seiner Metabolite für die Frühgeborenenernährung | 18 |
| 1.4.1 Cholin - ein essentieller Nährstoff | 18 |
| 1.4.2 Cholinsynthese, Betain, Acetylcholin und Trimethylaminoxid | 20 |
| 1.4.3 Cholinhaltige Phospholipide - Stoffwechsel von..... | 24 |
| Phosphatidylcholin | 24 |
| 1.4.4 Entwicklungsphysiologische Bedeutung von Cholin | 27 |
| 1.4.5 Cholin in Schwangerschaft und perinataler Phase..... | 28 |
| 1.4.6 Cholin in Muttermilch und Formulanahrung | 29 |
| 1.5 Lipide - Grundlagen zum Arachidonsäure- & Docosahexaensäuremetabolismus bei Frühgeborenen | 32 |
| 1.5.1 Biochemische Grundlagen | 32 |
| 1.5.2 Verdauung der Fettsäuren | 33 |
| 1.5.3 Lipoproteine und der Transport von Triacylglyceriden, Fettsäuren und Phospholipiden | 35 |
| 1.5.4 Arachidonsäure, Docosahexaensäure und ihre Vorstufen | 36 |
| 1.5.5 Lipide in Schwangerschaft und Stillzeit | 43 |
| 1.5.6 Funktionelle Bedeutung von Arachidonsäure und Docosahexaensäure für die fetale und kindliche Entwicklung..... | 44 |
| 1.6 Ziel der Arbeit..... | 45 |
| 2 Material und Methoden | 46 |
| 2.1 Geräte, Chemikalien und Lösungsmittel | 46 |

| | | |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1.1 | Geräte | 46 |
| 2.1.2 | Substanzen | 46 |
| 2.1.3 | Lösungsmittel..... | 47 |
| 2.2 | Verbrauchsmaterialien und Software | 48 |
| 2.2.1 | Verbrauchsmaterialien | 48 |
| 2.2.2 | Software..... | 48 |
| 2.3 | Methoden | 49 |
| 2.3.1 | Studienablauf | 49 |
| 2.3.2 | Nahrungserfassung & Korrelation mit dem Plasma der Frühgeborenen . | 50 |
| 2.3.3 | Statistische Auswertung der Ergebnisse..... | 53 |
| 2.3.4 | Asservierung | 54 |
| 2.3.5 | Probenlagerung | 54 |
| 2.3.6 | Aufarbeitung der Muttermilch - Lipidextraktion nach Bligh & Dyer | 55 |
| 2.3.7 | Massenspektrometrische Analyse..... | 56 |
| 2.3.8 | Gaschromatographische Analyse | 62 |
| 3 | Ergebnisse | 66 |
| 3.1 | Demographische Daten | 66 |
| 3.2 | Zusammensetzung der Muttermilch | 67 |
| 3.2.1 | Cholin..... | 67 |
| 3.2.2 | Fettsäuren..... | 68 |
| 3.2.3 | Inter- und intraindividuelle Schwankungen..... | 71 |
| 3.2.4 | Tagesprofile von Cholin, Arachidonsäure und Docosahexaensäure..... | 73 |
| 3.2.5 | Berechnung der tageszeitenabhängigen Schwankungen von Cholin, Arachidonsäure und Docosahexaensäure | 74 |
| 3.2.6 | Cholin, Arachidonsäure und Docosahexaensäure im Verlauf des postnatalen Alters | 77 |
| 3.3 | Korrelation zwischen Arachidonsäure & Docosahexaensäure und ihren Prekusoren Linolsäure & α -Linolensäure in der Muttermilch und im kindlichen Plasma | 78 |
| 3.4 | Zufuhr der untersuchten Stoffe über die Muttermilch | 81 |
| 3.5 | Korrelation ausgewählter Parameter des Plasmas der Frühgeborenen mit der Muttermilch und gesamten Nahrungszufuhr | 83 |

| | | |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.5.1 | Cholin..... | 83 |
| 3.5.2 | Docosahexaensäure und Arachidonsäure | 88 |
| 4 | Diskussion..... | 94 |
| 4.1 | Diskussion der Ergebnisse..... | 95 |
| 4.1.1 | Material und Methoden | 95 |
| 4.1.2 | Demographische Daten | 96 |
| 4.1.3 | Ergebnisse zur Zusammensetzung der Muttermilch | 96 |
| 4.1.4 | Beziehung zwischen Zufuhr via Muttermilch/Formula und Konzentrationen im Plasma | 102 |
| 4.2 | Diskussion der Fragestellung / klinische Relevanz | 105 |
| 4.2.1 | Wird der Bedarf an Cholin, Arachidonsäure und Docosahexaensäure über die Muttermilch gedeckt? Welche Supplementierung sollte angestrebt werden? | 105 |
| 4.2.2 | Ausgleich interindividueller Schwankungen in der Muttermilch | 109 |
| 4.2.3 | Wirkung der Supplementierung von Cholin, Arachidonsäure und Docosahexaensäure | 109 |
| 4.2.4 | Art der Supplementierung von Cholin und der Fettsäuren | 111 |
| 4.3 | Schlussfolgerung aus der Arbeit | 114 |
| 5 | Zusammenfassung | 116 |
| 6 | Anhang..... | 119 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 123 |
| 8 | Erklärung zum Eigenanteil | 156 |
| 9 | Veröffentlichung | 157 |
| 10 | Danksagung..... | 158 |

TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 1: ESPGHAN Empfehlungen der Nährstoffe für Frühgeborene | 16 |
| Tabelle 2: Gehalt an ARA und DHA im braunen Fettgewebe bei Früh- und Reifgeborenen | 17 |
| Tabelle 3: Empfehlungen für die Zufuhr an Cholin | 19 |
| Tabelle 4: Verdauungsenzyme | 34 |
| Tabelle 5: Verwendete Geräte..... | 46 |
| Tabelle 6: Verwendete Substanzen..... | 47 |
| Tabelle 7: Verwendete Lösungsmittel..... | 48 |
| Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien | 48 |
| Tabelle 9: Verwendete Software | 48 |
| Tabelle 10: Übersicht über die vier Studiengruppen..... | 49 |
| Tabelle 11: Durchgeführte Korrelationen der Cholinkomponenten und Fettsäuren, Aufteilung nach Gruppen | 52 |
| Tabelle 12: Lipidextraktion der Muttermilch | 56 |
| Tabelle 13: Retentionszeiten der wasserlöslichen Zielanalyte | 60 |
| Tabelle 14: Erstellen des Probengemisches für die Messung mit einem Flüssigkeitschromatographen gekoppelten Massenspektrometer . | 60 |
| Tabelle 15: Flussrate und zugehörige Retentionszeit der im ESI-MS/MS gemessenen Lipide..... | 61 |
| Tabelle 16: Fettsäureveresterung für GC-Analytik | 63 |
| Tabelle 17: Temperaturanstieg abhängig von der Zeit in der GC-Methode..... | 64 |
| Tabelle 18: Referenzfettsäuren und ihre Charakteristika - GC Analyse. | 64 |
| Tabelle 19: Demographische Daten der Studie..... | 66 |
| Tabelle 20: Demographische Daten aufgeteilt in Studiengruppen..... | 66 |
| Tabelle 21: Konzentration von Gesamtcholin, der Cholinderivate und Methylkomponenten. | 68 |
| Tabelle 22: Komposition und Konzentration der Fettsäuren..... | 69 |
| Tabelle 23: Relationen polyunsaturierter Fettsäuren in den Neutrallipiden von MM und Plasma zueinander.. | 69 |
| Tabelle 24: Aufteilung der Gruppen nach Tageszeit.. | 75 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabelle 25: Menge an MM, Muttermilchsupplement bzw. Frühgeborenenernährung pro Frühgeborenes..... | 81 |
| Tabelle 26: Plasmakonzentrationen von Cholin und Betain in Relation zur Cholinzufuhr..... | 83 |
| Tabelle 27: Plasmakonzentrationen von ARA und DHA in Relation zur Zufuhr via MM..... | 88 |
| Tabelle 28: Plasmakonzentrationen von ARA und DHA in Relation zur Zufuhr von ARA und DHA über die Nahrung. | 91 |
| Tabelle 29: Fettsäurezusammensetzung der Milchlipide dieser Arbeit im Vergleich zu anderen Studien..... | 98 |
| Tabelle 30: Mediane Aufnahme, Empfehlungen und Fetale Plasmawerte von Cholin, ARA und DHA..... | 105 |
| Tabelle 31: Masse der Cholinsupplemente entsprechend 30mg Cholin..... | 106 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | | |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1: | Übersicht Cholinstoffwechsel. | 20 |
| Abbildung 2: | PEMT-Pathway. | 23 |
| Abbildung 3: | Kennedy-Pathway. | 24 |
| Abbildung 4: | Synthese von Sphingomyelin. | 26 |
| Abbildung 5 A+B: | Gesamtcholin in Formulanahrungen bei vollem Kostaufbau (A) und Zusammensetzung der Cholinlieferanten in Formulanahrung und MM (B).. | 31 |
| Abbildung 6: | Phosphatidylcholin C16:0/C20:4n-6 zur Veranschaulichung der Nomenklatur von Fettsäuren. | 32 |
| Abbildung 7: | Metabolismus der Omega-3-FS. | 37 |
| Abbildung 8: | Eicosanoidsynthese ausgehend von ARA. | 40 |
| Abbildung 9: | Metabolismus der Omega-6-FS. | 41 |
| Abbildung 10: | Flüssigchromatographie-gekoppeltes Triplequadrupol-Tandemmassenspektrometer mit Elektrosprayionisations-Interface. | 57 |
| Abbildung 11: | Gradientenprofil zur Messung der wässrigen Cholin Metabolite. | 59 |
| Abbildung 12 A+B: | Cholinkomponenten der MM (A). Zusammensetzung der Cholinkomponenten in der MM (B). | 67 |
| Abbildung 13: | ARA und DHA in MM und Plasma am Ende der Supplementierung. | 70 |
| Abbildung 14: | Inter- und intraindividuelle Ranges von Gesamtcholin in mg/L in der MM. | 71 |
| Abbildung 15 A+B: | Inter- und intraindividuelle Ranges von ARA (A) und DHA (B) in Mol% in der MM. | 72 |
| Abbildung 16: | Tagesprofile des Gesamtcholins in mg/L in der Muttermilch. | 73 |
| Abbildung 17 A+B: | Tagesprofile von ARA (A) und DHA (B) in Mol% in der Muttermilch. | 74 |

| | | |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 18: | Gesamtcholin, ARA und DHA in $\mu\text{mol/L}$ aller Muttermilchwerte, aufgeteilt nach postnatalem Alter (Tag 7-37)..... | 77 |
| Abbildung 19: | Gesamtcholingehalt aller Muttermilchen nach postpartalem Alter der Kinder in Tagen (0-40)..... | 78 |
| Abbildung 20 A+B: | Streudiagramm der Korrelation ARA vs. LA (A) und DHA vs. ALA (B) in MM..... | 79 |
| Abbildung 21 A+B: | Streudiagramm LA/ARA (A) und ALA/DHA (B) im Plasma.. | 80 |
| Abbildung 22 A+B: | Zufuhr an Gesamtcholin und Cholinkomponenten (A) sowie Fettsäuren der Gesamtlipide (B) über die Muttermilch..... | 82 |
| Abbildung 23 A+B: | Korrelation von Cholin (A) und Betain (B) im Plasma der Kinder mit dem Gesamtcholin der MM. | 84 |
| Abbildung 24 A+B: | Korrelation von Betain im Plasma der Kinder mit Cholin-Supplementation (A) und Cholin im Plasma der Kinder ohne Cholin-Supplementation (B) mit dem Gesamtcholin der MM. | 85 |
| Abbildung 25 A+B: | Korrelation von Cholin (A) bzw. Betain (B) im Plasma mit dem Gesamtcholin aus der Nahrung..... | 87 |
| Abbildung 26: | Korrelation von Cholin im Plasma der Kinder mit dem Gesamtcholin aus der Nahrung der Kinder ohne Cholin-Supplementation. | 87 |
| Abbildung 27 A+B: | Korrelation DHA-PC (A) und DHA-NL (B) im Plasma mit DHA in der MM bei den Kindern ohne DHA Supplementation. | 89 |
| Abbildung 28 A+B: | Korrelation ARA-PC (A) und ARA-NL (B) im Plasma mit ARA der MM bei den Kindern ohne DHA Supplementation. | 90 |
| Abbildung 29 A+B: | Korrelationen von DHA-NL (A) und DHA-PC (B) vs. DHA-Nahrungszufuhr bei allen Kindern. | 92 |
| Abbildung 30: | Korrelation von ARA-PC Plasma vs. ARA-Nahrungszufuhr bei den Kindern ohne DHA-Supplementation. | 93 |

ANHANGSVERZEICHNIS

| | | |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Anhang 1: | Spezialnahrung und Muttermilch-Fortifier für Frühgeborene und Reifgeborene. | 119 |
| Anhang 2: | Medianer Aufnahmewert relevanter Nährstoffe über die MM. | 120 |
| Anhang 3 A-C: | Inter- und intraindividuelle Ranges der Myristinsäure (A), Linolsäure (B) und Ölsäure (C) in Mol% in der MM. | 122 |
| Anhang 4: | Streudiagramm zur Korrelation zwischen Cholin und seinem Präkursor Betain im kindlichen Plasma. | 122 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| Verwendete Abkürzung | Vollständiger Trivialname |
|-----------------------------|--------------------------------------------|
| ρ | Korrelationskoeffizient nach Spearman |
| α -GPC | α -Glycerophosphocholin |
| ACN | Acetonitril |
| AdoHcy | S-Adenosylhomocystein |
| AdoMet | S-Adenosylmethionin |
| AI | Adequate Intake |
| ALA | Alpha-Linolensäure |
| AQP10 | Aquaporin10 |
| ARA | Arachidonsäure |
| BPD | Bronchopulmonale Dysplasie |
| COX | Cyclooxygenase |
| d | Tag |
| DHA | Docosahexaensäure |
| EAR | Estimated Average Requirement |
| EFSA | European Food Safety Authority |
| ELBW | Extremely low birth weight |
| EPA | Eicosapentaensäure |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ESI | Elektrospray Ionisation |
| FATP1 | Fattyacid transportprotein 1 |
| FG | Frühgeburt |
| FS | Fettsäuren |
| GC | Gaschromatograph |
| GLA | Gamma-Linolensäure |
| h | Stunden |
| Hcy | Homocystein |
| HDL | High Density Lipoprotein |
| IDL | Intermediate Density Lipoprotein |
| IOM | Institute of Medicine |
| IQR | Interquartile range (Interquartilsabstand) |
| IST | Interner Standard |
| kFS | kurzkettige Fettsäuren |
| IFS | Langkettige Fettsäuren |

| | |
|-----------------------------------------|---------------------------------------------|
| LA | Linolsäure |
| LBW | Low Birth Weight |
| LDL | Low Density Lipoprotein |
| LOX | Lipoxygenase |
| Lyso-PC | Lyso-Phosphatidylcholin |
| MeOh | Methanol |
| MW | Mittelwert |
| Mdn | Median |
| mFS | mittelkettige Fettsäuren |
| Min und Max | Minimum und Maximum |
| MM | Muttermilch |
| ESI-MS/MS | Tandemmassenspektrometer |
| NAM | National Academy of Medicine |
| NL | Neutallipide |
| NPCL1 | Niemann Pick Typ1 C1 |
| p. o. | Per os |
| PC | Phosphatidylcholin |
| PE | Phosphatidylethanolamin |
| PEMT | Phosphatidylethanolamin-N-Methyltransferase |
| PG | Prostaglandin |
| PI | Prostacyclin |
| Q _{0,25} und Q _{0,75} | Oberes und unteres Quartil |
| r | Korrelationskoeffizient nach Pearson |
| R | Spannweite |
| RDI | Recommended dietary allowance |
| SD | Standardabweichung |
| SM | Sphingomyelin |
| SRM | Selected reaction monitoring |
| SSW | Schwangerschaftswoche |
| TAG | Triacylglyceride |
| TIC | Total Ion Count |
| TMA | Trimethylamin |
| TMAO | Trimethylaminoxid |
| TXA | Thromboxan |
| VLBW | Very low birth weight |
| VLDL | Very Low Density Lipoprotein |
| WM | wasserlösliche Metabolite |

1 EINLEITUNG

Frühgeborene (FG) verlassen in einer Entwicklungsphase die Gebärmutter, in der sie noch weiterhin durch die Plazenta ernährt werden sollten. Um eine optimale Reifung der Kinder zu gewährleisten, stehen wir vor der Herausforderung sie qualitativ und quantitativ mit allen Nährstoffen zu versorgen, die der plazentaren Versorgung in der Gebärmutter entsprechen. Dies muss allerdings unter Berücksichtigung der metabolischen Veränderungen geschehen, die die Frühgeburt mit sich bringt.

Zum Wachstum ist der Aufbau von Strukturen notwendig, die in engen Grenzen konstante Konzentrationen von Nährstoffen bzw. ihren Syntheseprodukten enthalten z. B. Wasser, Proteine, Nukleinsäuren, Calcium und Phosphat. Drei wesentliche konstitutive Bestandteile aller Gewebe sind Cholin, Docosahexaensäure (DHA) und Arachidonsäure (ARA), und zwar vorwiegend als Strukturbausteine in Form von Phospholipiden und nicht als Kofaktoren, wie Vitamine. Sie sind für Fötus und Frühgeborene essenziell, weil ihre Eigensynthese nicht bzw. nicht in ausreichendem Maßstab stattfindet.

Diese Dissertation wird die Frage erörtern, warum die Nährstoffe Cholin, ARA und DHA von besonderer Bedeutung bei Frühgeborenen sind, ob bei Frühgeborenen ihre Zufuhr durch Muttermilch ausreicht und was beachtet werden muss, um ihre optimale Zufuhr bei der enteralen Ernährung von Frühgeborenen zu erreichen.

1.1 GRUNDLAGEN DER NEONATALEN ENTWICKLUNG

Die Schwangerschaft des Menschen umfasst von der Konzeption an in der Regel 38 Wochen. Sie wird in Trimester eingeteilt. Ein Trimester (=Trimenon) beträgt somit circa 13 Wochen.

Das erste Trimenon besteht aus Blastogenese, Embryonalphase und Beginn der Fetogenese. Nach der Befruchtung beginnt die Zygote damit, sich mitotisch zu teilen. Jenseits des Morula-Stadiums (64 Zellen) beginnt die Differenzierung: es entsteht die Blastozyste, die aus Zellen besteht, welche sich zu dem späteren Embryo entwickeln (Embryoblast). Zudem entwickelt sich der Trophoblast,

welcher die Hülle der Blastozyste bildet. Während der ersten zwei Schwangerschaftswochen (SSW) nistet sich diese Blastozyste in die Gebärmutter ein. Aus dem Trophoblasten (von griechisch: τροφή= Nahrung) differenziert sich die Plazenta (Moore et al. 2011, S. 47). Bereits in der zweiten SSW (Embryonalphase) entstehen die drei Keimblätter: Ektoderm, Mesoderm und Entoderm. Es bildet sich mit der Chorda dorsalis die Körperachse aus. Davon ausgehend beginnen sich die Organe ab der dritten SSW zu differenzieren (Schulze 2011, S. 24–26). Die ersten Gehirnanlagen entstehen, das Herz beginnt zu schlagen, die Arm- und Beinknospen differenzieren sich und der Embryo wächst von 4mm in der vierten SSW zu 30mm Länge am Ende der 8. SSW heran. Ab der 9. SSW bis über das 2. Trimenon (ab den 4. Schwangerschaftsmonat) hinaus findet die Fetogenese statt. Während dieser Wachstumsphase differenzieren sich die Organe (Schulze 2011, S. 12–13). Das dritte Trimenon beginnt mit dem 7. Schwangerschaftsmonat. Der Fetus nimmt fortschreitend an Gewicht zu, die Wachstumsrate verlangsamt sich jedoch ab der 30.-32. SSW. Damit einhergehend differenzieren sich die Organe. Die subkutane Fettschicht wie auch die Lunge wachsen progredient, das Gehirn, wie auch andere Sinneszellen und Organe bildet sich weiter aus. (Bernhard et al. 2019c; Moore et al. 2011, S. 119–121).

Nach der Geburt müssen sich die Organsysteme an eine vollkommen neue Umwelt anpassen. Die Lungen werden mit Luft gefüllt, der fetale Kreislauf stellt sich um. Die gesamte Sinneswelt ist mit einer neuen Umgebung konfrontiert. Auch die Ernährung schwankt von einer kontinuierlichen Ernährung durch die Plazenta, die selektiv wichtige Nährstoffe für den Fetus bereit stellt (Crawford 2000), zu einer enteralen Ernährung. Nun muss sich das Neugeborene auf eine veränderte Zusammensetzung der Nährstoffe und ein, wenn auch zu Beginn in noch sehr kurzen Abständen, intermittierendes Angebot einstellen (B. Koletzko et al 2013).

Die Termingeburt ist definiert durch die Geburt während der 38.-42. SSW (postmenstruationem). Kinder, die vor der vollendeten 37. SSW geboren werden, werden als Frühgeborene (FG) bezeichnet. Dabei lässt sich zwischen extrem

Frühgeborenen (<28.SSW), sehr Frühgeborenen (28.-32.SSW) und moderat Frühgeborenen (32.-37.SSW) unterscheiden (WHO 1977). Neugeborene unter 2,5kg werden als „low birth weight infants“ (LBWI) definiert, unter 1,5 kg als „very low birth weight infants“ (VLBWI) und unter 1kg als „extreme low birth weight infants“ (ELBWI) (WHO 2022). Etwa 8,5% aller Geburten in Deutschland sind Frühgeburten. Insgesamt 1,3% aller Kinder in Deutschland kommen als sehr kleine Frühgeborene vor der 32. SSW auf die Welt (Euro-Peristat 2015). Weltweit liegt die Rate an Frühgeborenen bei 11,1% wobei 9 von 11 Ländern, die eine Rate von über 15% verzeichnen in Afrika südlich der Sahara liegen (Blencowe et al. 2012). Frühgeburtlichkeit hat unterschiedliche Ursachen: Infektionen der Eihäute können zu vorzeitigen Wehen führen, bei Mehrlingsschwangerschaften kann es zur frühen Unterversorgung der Feten kommen oder ein vorzeitiger Blasensprung kann zu Infektionen führen, weshalb eine Geburt dann frühzeitig eingeleitet werden muss.

Die neonatale Mortalität (d.h. in den ersten 27 Lebenstagen) schwankt in Europa von 1,2 pro 1000 Geburten in Island bis 4,4 in Bulgarien. In Deutschland liegt sie bei 2,3. 45,2% der in Europa verstorbenen Kinder sind extrem, 12,1% sehr und 16,2 % moderat Frühgeborene. 26,5% aller verstorbenen Kinder sind reif geboren (Euro-Peristat 2015).

Das Gesamtüberleben Frühgeborener steigt mit dem Gestationsalter zur Geburt bis zur 40.SSW. So liegt die Mortalitätsrate von Frühgeborenen in England, die in der 24.SSW geboren werden noch bei 41%, sinkt dann kontinuierlich ab mit 11% in der 27.SSW und 1% in der 34.SSW. In der 40.SSW liegt sie bei 0,1% (Office for National Statistics 2013). In Ländern mit niedrigem Einkommen liegt die Mortalitätsrate bei 90% in der 28. SSW und 50% in der 34. SSW (WHO 2012). Dennoch steht die neonatale Intensivmedizin vor großen Herausforderungen. Für Frühgeborene typische Gefährdungen und akute ärztliche Herausforderungen sind unter anderem: ein persistierender Ductus arteriosus, das Atemnotsyndrom, neonatale Sepsen, Apnoen, sowie langfristig die bronchopulmonale Dysplasie, nekrotisierende Enterocolitis (NEC), Retinopathie und periventrikuläre

Leukomalazie. Follow-up Studien zeigen ein erhöhtes Risiko für Zentralpareesen, Seh- und Hörbehinderungen im Einschulungsalter (Speer 2019, S. 93).

1.2 DIE MUTTERMILCH

Muttermilch gilt als optimale Nahrungsquelle für mindestens die ersten sechs Monate im Leben reifgeborener Kinder. Durch von der Mutter stammende Leukozyten, Makrophagen, Chemokine, Glykoproteine (wie z.B. Lactoferrin) und Cytokine senkt Muttermilch die Infektionsrate und fördert das Immunsystem des Säuglings (Ballard und Morrow 2013). Die langfristige Gesundheit soll durch eine hochwertige Säuglingsernährung positiv beeinflusst werden. Dies wird als metabolische Programmierung bezeichnet. Das bedeutet, dass während der prä- und postnatalen Phase metabolische Einflüsse langfristige Auswirkungen auf die Gesundheit des Kindes, bis hin zum Erwachsenenalter, haben (B. Koletzko et al 2013). So gibt es Hinweise darauf, dass Stillen positive Effekte auf Blutdruck, Cholesterinwert, Übergewicht, Diabetes Mellitus Typ 2 sowie den IQ hat (Horta 2007). Es besteht zudem ein Zusammenhang zwischen der Ernährung von VLBW-Frühgeborenen mit Muttermilch und einem erniedrigten Risiko an NEC zu erkranken (Miller et al. 2018). Studien zufolge unterscheidet sich die Nährstoffzusammensetzung der Muttermilch weiterhin stark von denen der Formulanahrung (Qian et al. 2016; Shunova et al. 2020). Das deutet darauf hin, dass sich Muttermilch weiterhin nicht ohne Einbußen durch Formulanahrung ersetzen lässt.

Die Zusammensetzung der Muttermilch ist variabel und wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst. So verändert sie sich beispielsweise im Laufe der postnatalen Phase, während eines einzelnen Stillvorganges, abhängig von der Ernährung der Mutter und abhängig von genetischen Faktoren (G. Dockter 2002, S. 37; Maas et al. 2017).

Die Muttermilch der ersten 5 Tage nach Geburt wird als Kolostrum bezeichnet. Sie hat einen hohen Gehalt an unverdaulichen Proteinen (Immunglobulinen und Lactoferrin) und Leukozyten sowie myeloiden Suppressorzellen und trägt hiermit zum Infektionsschutz des Neugeborenen bei (Coppa et al. 1999; Köstlin et al. 2018). Ab Beginn der dritten Woche wird die Muttermilch als reif betitelt. Fett- und

Lactosekonzentration sowie die Menge der Muttermilch steigen im Laufe der ersten Wochen an. Reife Muttermilch enthält 3-5% Fett, 0,8-0,9% Proteine und 6,9-7,2% Kohlenhydrate (Jenness 1979).

Während eines einzelnen Stillvorgangs steigt die Fettkonzentration der Muttermilch um das 1,5- bis 3-fache an, während sie zu Beginn eher reich an Proteinen, Mineralstoffen und wasserlöslichen Vitaminen ist. Sie wird im Laufe des Stillens daher zunehmend energiereicher (Andreas et al. 2015).

Eine ausgewogene Ernährung Stillender ist essenziell für optimale Nährstoffgehalte der Muttermilch. Für die postnatale neuronale Entwicklung wird empfohlen, auf eine ausreichende Versorgung mit Jod, Eisen, Selen, Cholin, Zink, Vitamin A, D, B6 und B12, Folsäure und mehrfach ungesättigten Fettsäuren, beispielsweise der Omega-3-Fettsäure Docosahexaensäure (DHA) und der Omega-6-Fettsäure Arachidonsäure (ARA), zu achten (Bartmann 2002; Crawford et al. 1976; Innis 2014; Schwarzenberg und Georgieff 2018). Zudem können Toxine aus der Nahrung schädigend für den heranwachsenden Organismus sein (G. Dockter 2002, S. 39). Es wurde gezeigt, dass nicht die Konzentration, sondern die Zusammensetzung der Fettsäuren in der Muttermilch stark von der Ernährung der Stillenden abhängt. So wurde DHA in einem Umfang von 0,1-1 % und Linolsäure von 6-30% der Fettsäuren in der Muttermilch, abhängig von der Diät der Mutter, gemessen (Innis 2007b, 2014). Hierbei ist anzumerken, dass der Linolsäuregehalt in der Ernährung in Industrieländern in den letzten 50 Jahren von 6-7% auf 13-18% gestiegen ist (Innis 2014, 2004).

Genetische Polymorphismen für die endogene Bildung von Nährstoffen, wie beispielsweise Cholin, haben einen hohen Effekt auf ihre Konzentration in der Milch. So wurden Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) detektiert, welche über Interaktion mit beispielsweise Methyltetrahydrofolat-Reduktase (die beim Abbau von Homocystein zu Methionin beteiligt ist) die Dosis-Wirkungs-Kurve zwischen Cholinaufnahme und Cholingehalt in der Muttermilch beeinflussen. Diese Polymorphismen scheinen weit verbreitet zu sein. Um detailliertere Aussagen über diesen Zusammenhang zu machen werden weitere Forschungsdaten benötigt (Fischer et al. 2010a). Die Zusammensetzung der Milch Frühgeborener,

verglichen mit der Reifgeborener, ist zudem nicht bei allen Nährstoffen gleich. So wurde gezeigt, dass die CholinKonzentration in der Muttermilch nach Frühgeburt niedriger ist, als in der Milch nach Termingeburt (Maas et al. 2017).

Von zentraler Bedeutung ist die Frage, ob Muttermilch für die Ernährung Frühgeborener optimal ist. Diese ergibt sich aus der 4-fach höheren Wachstumsrate des Feten im 3. Trimenon gegenüber dem reifen Neugeborenen (Wiechers et al. 2021), wohingegen die Milchzusammensetzung und ihre Nährstoffkonzentration diesen erhöhten Bedarf nicht widerspiegeln (Maas et al. 2017). Entsprechend wird für Frühgeborene (FG) die Muttermilch mit Supplementen versetzt, um den Bedarf an Energie, Proteinen, Calcium, etc. zu gewährleisten. Dennoch wird ein erhöhter Anteil der zugeführten Energie und des Proteins als Fett eingelagert, als Ausdruck der Tatsache, dass das FG aus Protein bzw. Aminosäuren nicht hinreichend Parenchym bilden kann (Goswami et al. 2016). In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass kurz nach der Geburt die CholinKonzentration im Plasma rapide absinkt. Ähnliches gilt auch für ARA und DHA (Zeisel 2006; Crawford 2000; Bernhard et al. 2013)). Das geschieht zu einem für Frühgeborene, mit ihrer weiterhin hohen physiologischen Wachstumsrate, inadäquaten Zeitpunkt. Daraus ergibt sich folgende Perspektive zur verbesserten Ernährung von FG: Um eine optimale Entwicklung Frühgeborener zu gewährleisten, stehen wir vor der Herausforderung, sie ausreichend mit limitierenden Nährstoffen zu versorgen.

1.3 GRUNDLAGEN ZUR ERNÄHRUNG FRÜHGEBORENER

| Nährstoffe, Mengenangabe | Pro kg / Tag | Range (%) | |
|--------------------------|---------------------------------------------|--------------------|-----|
| Flüssigkeit, ml | 135-200 | +48 | |
| Energie, kcal | 110-135 | +23 | |
| Protein, g | <1kg Körpergewicht 1-1,8kg Körpergewicht | 4,0-4,5 3,5-4,0 | +13 |
| Fette, g | 4,8-6,6 | +37 | |
| Kohlenhydrat, g | 11,6-13,2 | +14 | |
| *DHA, mg | 12-30 | +150 | |
| *ARA, mg | 18-42 | +133 | |
| Zink, mg | 1,1-2,0 | +80 | |
| Eisen, mg | 2-3 | +50 | |
| Folsäure, µg | 35-100 | +185 | |
| Cholin, mg | 8-55 | +590 | |

Tabelle 1: ESPGHAN Empfehlungen der Nährstoffe für Frühgeborene (Agostoni et al. 2010). Die Range bezeichnet die Abweichung des Maximalwertes vom Minimalwert in %.

| Fettsäuren | Frühgeborene (%) | Reifgeborene (%) |
|------------|------------------|------------------|
| ARA | 10,2 (8,5-12,1) | 12,6 (8,7-14,3) |
| DHA | 7,5 (5,9-11,9) | 12,2 (7,9-17,0) |

Tabelle 2: Gehalt an ARA und DHA (in %) im braunen Fettgewebe bei Früh- und Reifgeborenen (Böckmann et al. 2020)

Für Frühgeborene unter 1800g gibt es Richtlinien der ESPGHAN (European Society for Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition), die den Makro- wie Mikronährstoffbedarf der Kinder festlegen (Agostoni et al. 2010). Einige Mikronährstoffe wie Zink und Eisen sind relativ genau angegeben. Docosahexaensäure (DHA) und Arachidonsäure (ARA) sind mit einer größeren Spannweite angegeben. Cholin, mit einem Range von ca. 590% zwischen unterem und oberem Empfehlungswert, ist sehr weit gefasst (s. Tabelle 1). Für die Poolgrößenzunahme während des Wachstumsschubes zwischen der 24. und 34. Woche Gestationsalter, in dem die Kinder im Durchschnitt 1600g an Gewicht zulegen (Apte und Iyengar 1972; Bernhard et al. 2019c; Voigt et al. 2006) werden 19 mg/kg/d Cholin in Form von PC und SM benötigt. Von der 34. bis zur 40. Woche immer noch 10mg/kg/d (Bernhard et al. 2019c). Somit liegt allein die Poolgrößenzunahme für Cholin über der unteren Empfehlung der ESPEGHAN (s. Tabelle 1). Die Abklärung dieser offensichtlichen Diskrepanz und Schaffung glaubwürdiger Referenzwerte für Cholin ist daher ein wichtiges Forschungsziel. Ähnliches gilt auch für die Empfehlungen für ARA und DHA, die auch einen höheren Wertebereich haben und weit unter den Daten von Clanidin et al sowie Lapillonne und Jensen liegen. Beide Forschergruppen sind zu einem deutlich höheren Bedarf von 140mg/kg/d für ARA (Clanidin et al. 1981) und 43mg/kg/d für DHA (Lapillonne und Jensen 2009) gekommen.

1.4 PHYSIOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE GRUNDLAGEN DES CHOLINS UND SEINER METABOLITE FÜR DIE FRÜHGEBORENENERNÄHRUNG

1.4.1 CHOLIN - EIN ESSENTIELLER NÄHRSTOFF

Cholin ist ein einwertiger Alkohol mit einer quartären Ammoniumgruppe und daher ein Kation (s. Abbildung 1). Es ist ein wasserlöslicher Metabolit und essenzieller Nährstoff, der lange Zeit wenig Beachtung fand. In den letzten Jahren haben seine Wahrnehmung und das wissenschaftliche Interesse jedoch zugenommen, weil durch Forschung die Relevanz von Cholin als Nährstoff zunehmend bestätigt wird. 1998 bzw. 2016 haben das US-amerikanische Institute of Medicine (IOM; heute National Academy of Medicine, NAM) und die European Food Safety Authority (EFSA) den essenziellen Charakter von Cholin anerkannt und Zufuhrempfehlungen veröffentlicht. Die Essenzialität ist dadurch gegeben, dass die limitierte endogene Synthese nicht dem Bedarf entspricht.

1.4.1.1 EXOGENE ZUFUHR VON CHOLIN

Cholin wird mit der Nahrung aufgenommen oder in begrenztem Umfang von der Leber synthetisiert (siehe unten: PEMT-Pathway). Einen hohen Cholingehalt haben Nahrungsmittel wie Eier, Rindfleisch und einige Pilzsorten (Patterson et al. 2015). Über die Bioverfügbarkeit von Cholin in den oben genannten Nahrungsmitteln besteht noch unzureichende Klarheit. Der Transport von Cholin in die Zellen erfolgt proportional zur Plasmakonzentration (Lockman und Allen 2002).

1.4.1.2 EMPFOHLENE ZUFUHRMENGEN VON CHOLIN

Eine „recommended-dietary-allowance“ (RDI) oder „estimated-average-requirement“ (EAR) für Cholin gibt es derzeit noch nicht. Die RDI steht für einen Wert, mit dem der Bedarf 98% aller gesunden Mitglieder einer Bevölkerungsgruppe zu decken ist. Für den EAR muss der Bedarf von 50% gedeckt sein. Bisher wird mit dem „adequate intake“ (AI) gearbeitet. Dieser legt den Bedarf an Cholin für gesunde Erwachsene durch Schätzung der gemessenen Aufnahme über die Nahrung auf Grund von Experimenten fest. Bei Cholin wurde dies durch Studien festgelegt, die herausgefunden haben, ab welcher Zufuhrmenge ein Cholinmangel zu Organdysfunktionen führt. In der

folgenden Tabelle werde ich die Empfehlungen der USA über das IOM/NAM und der EFSA angeben.

| Alter / Status | Empfehlungen des IOM/NAM (Institute of Medicine (U.S.) 1998) | | | Empfehlungen der EFSA |
|----------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------|-------------|-----------------------|
| | Männlich (mg/Tag) | Weiblich (mg/Tag) | Mg/kg/Tag | Mg/Tag |
| 0 - 6 Monate | 125* | 125* | 18mg/kg/Tag | 120 |
| 7-12 Monate | 150** | 150** | | 160 |
| 4 - 6 Jahre | 250 | 250 | | 170 |
| > 19 Jahre | 550*** | 425*** | 7mg/kg/Tag | 400 |
| Schwangere | - | 450**** | | 480 |
| Stillende | - | 550***** | | 520 |

Tabelle 3: Empfehlungen für die Zufuhr an Cholin

* orientierend an der Aufnahme von Cholin durch die Muttermilch

** hochgerechnet aus Daten der 0-6 Monate alten Säuglinge mit Gewichts- & Wachstumsverhältnis

*** Mindestbedarf für den Schutz vor hepatischen Schäden

****AI erwachsener Frauen + fetale + plazentare Akkumulation

*****AI erwachsener Frauen + Bedarf um ausreichend Cholin in der MM herzustellen

(EFSA 2016; Institute of Medicine (U.S.) 1998)

Die tägliche Höchstaufnahme von Cholin wird von der IOM/NAM mit 3,5g für Erwachsene angegeben, basierend auf Studien, durch welche eine Gabe von >7g Cholin pro Tag zum Abfall des Blutdrucks um ca. 10mmHg führt (Wallace et al. 2018). Zudem wurden AI-Werte für Säuglinge und ältere Kinder aus den Gehalten der Muttermilch und der normalen Ernährung abgeleitet. Diese AI-Werte wurden genutzt, um den AI Frühgeborener mit geringerem Körpergewicht und höherer Wachstumsrate zu extrapolieren, mit dem anfänglichen Ergebnis von 27,4 mg/kg/Tag für ein medianes Geburtsgewicht von 735g. Bei Neugeborenen mit geringerem Geburtsgewicht ist der Bedarf höher, ihre reale Versorgung aber oft niedriger (Bernhard et al. 2013). Die ESPGHAN-Empfehlung von 8-55mg/kg/d (s. Tabelle 1) hingegen entbehrt jeder wissenschaftlichen Grundlage und entspricht dem Bereich zwischen AI Erwachsene (550mg≈8mg/kg/d) und dem oberen Toleranzwert (3500mg≈55mg/kg/d). Allein der Cholinzuwachs in Form von Membranphospholipiden umfasst jedoch 19mg/kg/d im 3. Trimenon (Bernhard et al. 2019c). Anders als es bei beispielsweise Fettsäuren der Fall ist, gibt es keinen nennenswerten endogenen Speicher für Cholin (Li und Vance 2008). Das zeigt sich auch an dem rapiden Abfall von Cholin innerhalb von 48h nach Frühgeburt (Bernhard et al. 2015).

1.4.2 CHOLINSYNTHESE, BETAIN, ACETYLCHOLIN UND TRIMETHYLAMINOXID

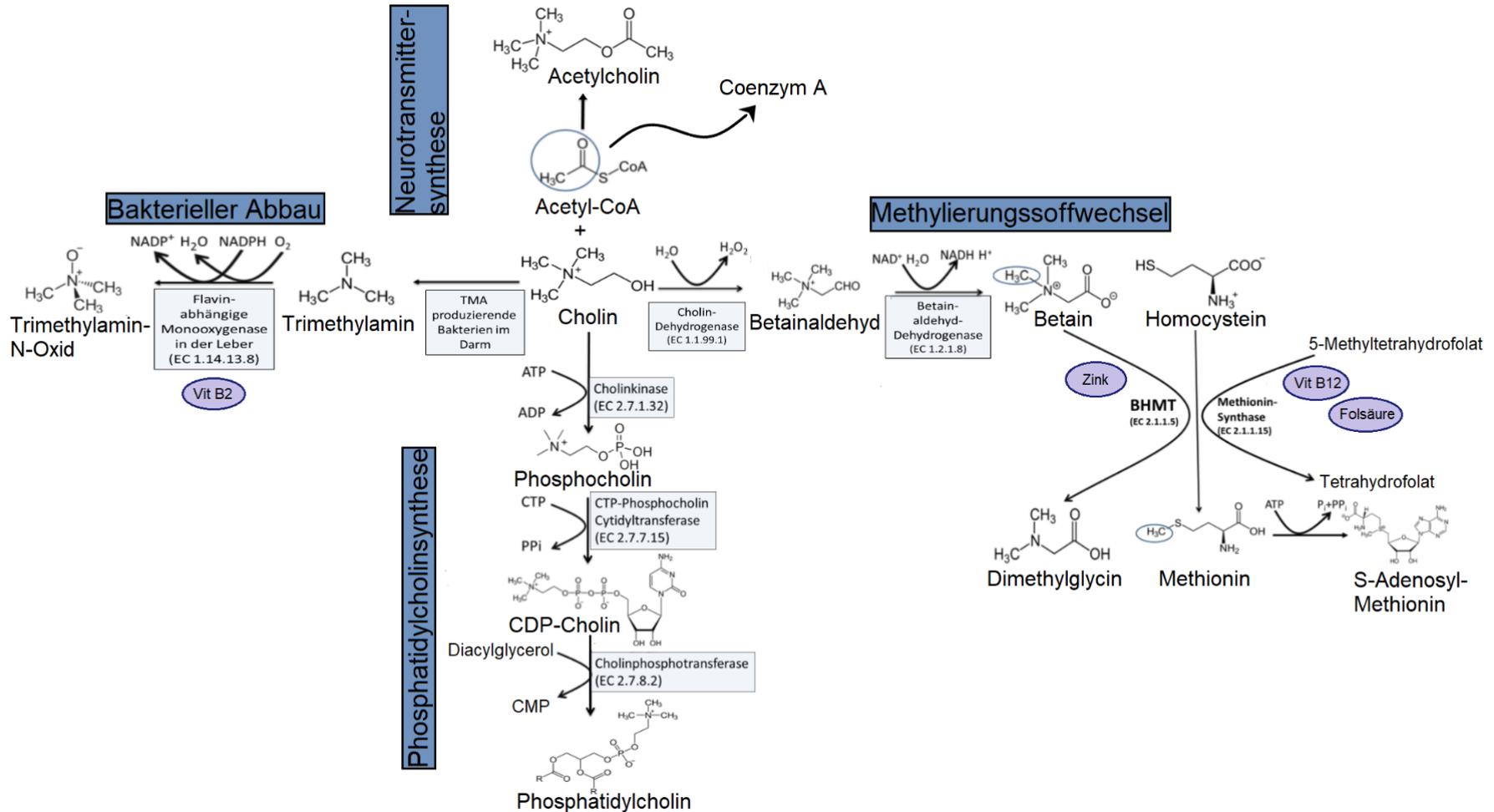


Abbildung 1: Übersicht Cholinstoffwechsel. Dargestellt ist die von Cholin ausgehende Betain Synthese, die Verwendung von Betain als Methylgruppendonator (die Methylgruppe ist blau markiert), die Acetylcholinsynthese, der Umbau von Cholin zu TMAO sowie der Kennedy-Pathway; Abkürzungen: NADP- Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, NADP⁺-oxidierte Form, NADPH-reduzierte Form, TMAO-Trimethylamin-N-Oxid, ATP-Adenosintriphosphat; ADP-Adenosindiphosphat; CTP-Cytidintriphosphat; PPi-Diphosphat; CMP-Cytidinmonophosphat, BHMT- Betain-Homocystein Methyltransferase

Die Abb. 1 gibt einen Überblick über den Cholinstoffwechsel. Im ersten Teil werde ich den Stoffwechsel von Cholin und seiner wasserlöslichen Metabolite erläutern, im zweiten werde ich auf den der cholinhaltigen Lipide und ihre Metabolite eingehen.

1.4.2.1 STOFFWECHSEL VON CHOLIN UND SEINEN WASSERLÖSLICHEN METABOLITEN

Cholin kann mit Acetyl-CoA zu dem wichtigen Botenstoff Acetylcholin metabolisiert werden (Loewi 1922; Rand 2007). Das spielt qualitativ, neben der Herstellung des amphiphilen Phospholipids Phosphatidylcholin (PC) via Kennedy-Pathway (s. Abbildung 3), eine große Rolle für das Nervensystem und seine Entwicklung sowie für andere Zellen.

Quantitativ sind zudem seine wasserlöslichen „Downstream“-Metabolite für den Stoffwechsel übertragbarer Ein-Kohlenstoff- bzw. Methylgruppen sehr wichtig. In Leber und Nieren wird Cholin über zwei Oxidationsschritte (Cholindehydrogenase, EC 1.1.99.1.; Betinaldehyddehydrogenase, EC 1.2.1.8.) zu Betain umgewandelt (Lambou et al. 2013; Ueland 2011). Betain ist ein wichtiger Osmolyt, z. B. zum Schutz von Proteinen vor Denaturierung in der Niere und ist gleichzeitig Quelle für die Methioninsynthese via Übertragung einer Methylgruppe auf Homocystein. Dies geschieht mit der Zink-abhängigen Betain-Homocystein-S-Methyltransferase (BHMT). Das entstandene Dimethylglycin und weitere Downstream Metabolite (Monomethylglycin) dienen auch der Methioninsynthese aus Homocystein. Hier entsteht 5,10-Methylentetrahydrofolat (5,10-CH₂-THF), das nach Reduktion durch die Methylentetrahydrofolat-Reduktase (EC 1.5.1.20) zu 5-Methyltetrahydrofolat (5-CH₃-THF) in einer Vitamin-B12-abhängigen Reaktion ebenfalls eine Methylgruppe auf Homocystein überträgt (Methioninsynthese EC 2.1.1.15.) (Ueland 2011). Somit ist Cholin über seine „Downstream“-Metabolite Betain und Dimethylglycin wesentlicher Lieferant für die Synthese von Methionin aus Homocystein und damit Lieferant für fast alle Methylierungsreaktionen im Körper (Bernhard et al. 2019c).

Betain wird nicht nur endogen aus Cholin gebildet, sondern kann insbesondere durch pflanzliche Nahrungsmittel wie Getreide, Spinat und Quinoa aufgenommen

werden (Ross et al. 2014; Ueland 2011). Betain sowie das über Dimethylglycin und Monomethylglycin gebildete 5-Methyltetrahydrofolat bewirken die letztlich cholinabhängige Methioninsynthese und damit die Methylierungsreaktionen (via S-Adenosylmethionin) (Ueland 2011; Zeisel 2006). Beide Synthesewege sind komplementär, so dass bei Vitamin B12- und/oder Folsäuremangel mehr Betain für die BHMT-Reaktion (siehe oben) benutzt wird (Ueland 2011). Ein Mangel an Methylgruppendonatoren (S-Adenosylmethionin) führt über DNA-Hypomethylierung zu einer veränderten Genexpression (Zeisel 2006). So führt eine frühe Cholinunterversorgung während der fetalen und neonatalen Phase von Mäusen und Ratten zu einer veränderten Epigenetik (metabolische Programmierung). Gerade die Unterversorgung im frühen Lebensalter kann lebenslange Auswirkungen haben (Zeisel 2017). Eine randomisierte kontrollierte Studie mit 480mg vs. 930mg Cholin-Supplementation zeigte, dass durch erhöhte Cholingabe die genetische Expression in der Plazenta signifikant verändert wird. Sie führte dazu, dass die Vaskularisierung und die Reaktion auf Stressfaktoren verbessert wurden. Fms-like-tyrosin-kinase-1, ein Risikofaktor für Präeklampsie, wurde verringert (Jiang et al. 2013).

1.4.2.2 BAKTERIELLER CHOLNABBAU

Mikroben im Darm können Cholin und Betain zu Trimethylamin (TMA) metabolisieren. Dies geschieht, wenn diese Komponenten vor der Resorption mit Bakterien in Kontakt kommen, d.h. wenn die Substanzen nicht resorbiert werden (z.B. aufgrund einer Resorptionsstörung), sondern in den Dickdarm gelangen oder wenn der Dünndarm mit Bakterien fehlbesiedelt ist. TMA wird resorbiert, über die Pfortader abtransportiert und dann in der Leber zu Trimethylaminoxid (TMAO) oxidiert (Al-Waiz et al. 1992; Zeisel und Warrier 2017).

1.4.2.3 CHOLIN SYNTHESE IN DER LEBER, DER PEMT-PATHWAY

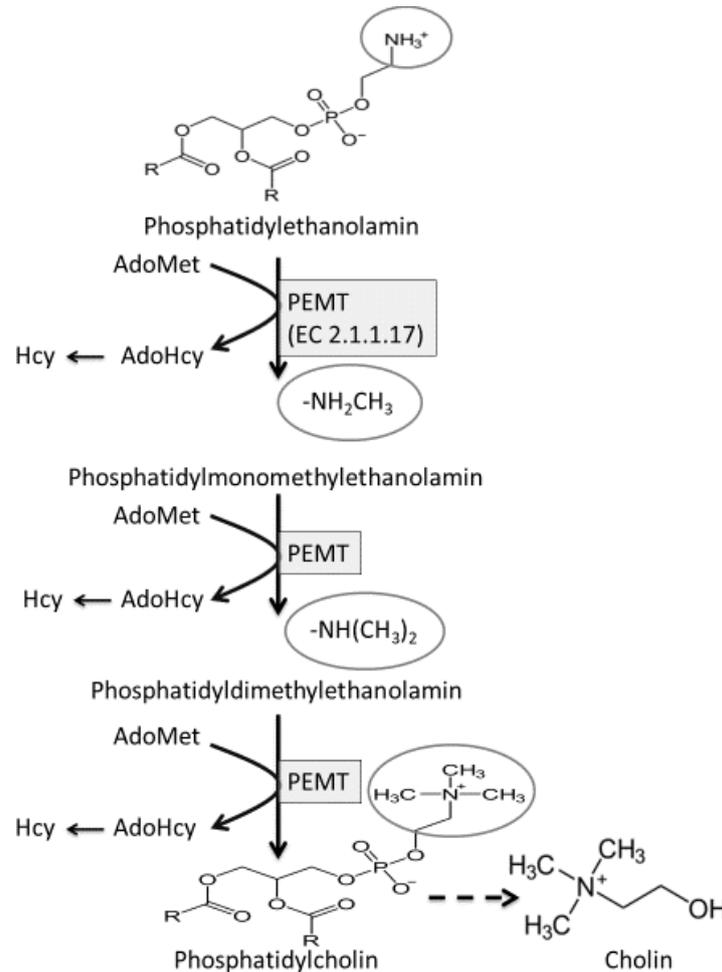


Abbildung 2: PEMT-Pathway. Abkürzungen: AdoMet-S-adenosylmethionin, AdoHcy-S-adenosylhomocystein, Hcy-Homocystein; PEMT- Phosphatidylethanolamin-N-Methyltransferase

In der Leber kann Cholin indirekt aus Phosphatidylethanolamin (PE) gebildet werden. Die Phosphatidylethanolamin-N-Methyltransferase (PEMT; EC 2.1.1.17) überträgt sequenziell die Methylgruppen von drei S-Adenosylmethionin auf PE, einer damit Methionin-abhängigen Reaktion. Das dadurch entstandene Phosphatidylcholin (PC) hat die Fettsäurezusammensetzung des PE. Bei Versuchstieren entstehen 30% des PC über den PEMT-Pathway, beim Menschen ist der Anteil aufgrund von Einzelnukleotid Polymorphismen (SNP) unterschiedlich (van der Veen et al. 2017). Aus dem PC kann Cholin anschließend durch Phospholipasen freigesetzt werden. Allerdings werden für die Synthese des Methionins auch Methylgruppen aus dem exogenen Cholin/Betain genutzt (Grothe et al. 2015), sodass dieser Stoffwechselweg teilweise von der Cholin- und Betainzufuhr abhängig ist. Bei Feten und

Frühgeborenen spielt dieser Stoffwechselweg nur eine untergeordnete Rolle, wird aber durch hohe Cholinzufuhr stimuliert (Bernhard et al. 2019a; Goss et al. 2020).

1.4.2.4 REGULATION DES PEMT-PATHWAYS

Östrogen spielt eine wichtige Rolle in der Aktivität des „PEMT-Pathways“. Ein hoher Östrogenspiegel bewirkt einen geringeren Cholinbedarf (Zeisel 2006). Der Cholinbedarf variiert interindividuell dennoch stark. Häufige genetische Variationen wie Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) des PEMT-Gens und anderer Gene (bis 50%) erhöhen den Bedarf an Cholinzufuhr (Fischer et al. 2010a). Zudem treten solche SNPs vermehrt in bestimmten Teilen dieser Welt auf als in anderen, sodass zumindest Erwachsene, je nach Herkunft, einen unterschiedlich hohen Cholinbedarf haben (da Costa et al. 2014).

1.4.3 CHOLINHALTIGE PHOSPHOLIPIDE - STOFFWECHSEL VON PHOSPHATIDYLCHOLIN

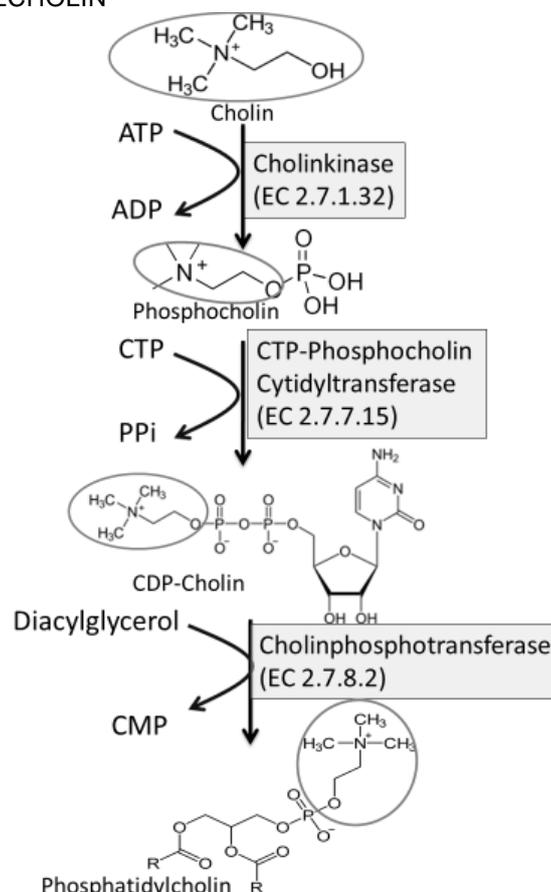


Abbildung 3: Kennedy-Pathway. Die Strukturformel des Cholins ist jeweils blau umrandet; Abkürzungen: ATP-Adenosintriphosphat; ADP-Adenosindiphosphat; CTP-Cytidintriphosphat; PPi-Diphosphat; CMP-Cytidinmonophosphat

Cholin ist in quantitativer Hinsicht hauptsächlich Substrat für die Neusynthese des amphiphilen Phospholipids Phosphatidylcholin (PC) via CDP-Cholin-Pathway (Kennedy-Pathway, Abbildung 3). Hier ist Cholin Ausgangssubstrat für die sequenzielle Aktivierung zu Cytidindiphosphocholin (CDP-Cholin). Über die Cholin kinase wird es zunächst phosphoryliert (Phosphocholin), anschließend über die CTP-Cholinphosphat-Cytidylyltransferase zu CDP-Cholin aktiviert. Die Cholinphosphotransferase überträgt dann ein Phosphocholin auf Diacylglycerol, sodass PC *de novo* unter Verwendung von exogenem Cholin entsteht. Dieser Stoffwechselweg ist ubiquitär (McMaster 2018). Cholinhaltige Metabolite des PC sind Lyso-PC und α -Glycerophosphocholin sowie Sphingomyelin (SM) (s. Abbildung 1 und Abbildung 4).

1.4.3.1 FUNKTIONEN VON PHOSPHATIDYLCHOLIN

PC ist durch seine amphiphile Struktur zur Ausbildung von Doppelschichten fähig. Diese sind für Membranen essenziell. PC befindet sich bevorzugt im äußeren Blatt der Plasmamembran (Löffler 2007, S. 149–150). Dort fungiert es besonders in der Leber und der grauen Substanz des Gehirns als Reservoir für langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Arachidonsäure und Docosahexaensäure (Pynn et al. 2011; Sastry 1985). PC ist Hauptphospholipid lipidhaltiger Sekrete, insbesondere der Galle (Angelico et al. 1992), Lipoproteine und des Surfactants (Buckingham S. und Avery M.E. 1962; Dobbie 1996). In der Galle fungiert es als Emulgator (Hofmann und Hagey 2014). Zudem dient PC zur Bildung von Sphingomyelin (s. nächstes Kapitel).

PC ist wichtig für die Bildung von „Very-Low-Density-Lipoproteins“ (VLDL) in der Leber, der Chylomikronen in den Enterozyten des Darms und der „High-Density-Lipoproteins“ (HDL) in anderen Organen wie z. B. der Lunge. 95% des durch die Galle in den Verdauungstrakt abgegebenen PCs wird über einen enterohepatischen Kreislauf reabsorbiert (Li und Vance 2008). Ein Cholinmangel führt zu einer verringerten Bildung von Lipoproteinen in der Leber, sodass sich eine Hepatosteatose entwickelt (Zeisel 2006). Ca. 80% der (konditionell) essenziellen polyunsaturierten Fettsäuren DHA und ARA werden im Blut als PC-Anteil der Lipoproteine transportiert (Bernhard et al. 2018; Bernhard et al. 2019c).

Es wurde gezeigt, dass Supplementierung von Cholin die Konzentration DHA-PC bei nicht Schwangeren und Frühgeborenen steigert, nicht jedoch bei Schwangeren (Bernhard et al. 2019a; West et al. 2013) .

Lyso-PC fungiert als Mediator zahlreicher Funktionen im Körper, beispielsweise Apoptose und Angiogenese (Rivera und Chun 2008), Leukozytenattraktion, Wundheilung und Thrombozytenaggregation (Moolenaar 1995). α -Glycerophosphocholin stabilisiert, ähnlich wie Betain, das osmotische Gleichgewicht der Niere (Zablocki et al. 1991). Ferner kann es durch die Blut-Hirn-Schranke treten und wird für die Bildung von Acetylcholin genutzt (Parnetti et al. 2007).

1.4.3.2 CHOLINHALTIGE SPHINGOLIPIDE – STOFFWECHSEL VON SPHINGOMYELIN

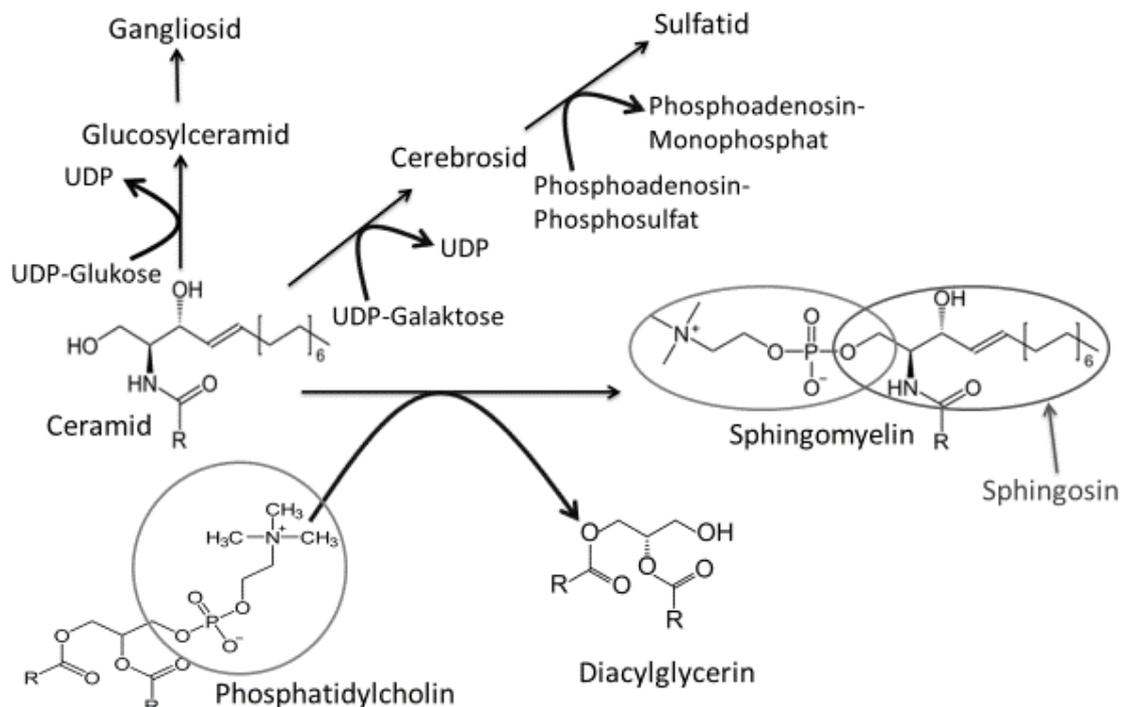


Abbildung 4: Synthese von Sphingomyelin. Abkürzungen: UDP - Uridindiphosphat

Sphingolipide sind die Überbezeichnung von Verbindungen mit dem Aminodialkohol Sphingosin. Ausgangsmolekül für die Synthese aller Sphingolipide ist Ceramid, dass durch die Verknüpfung einer Fettsäure mit der Aminogruppe des Sphingosins entsteht. Aus Ihnen kann, wie in Abbildung 4 gezeigt, durch die Reaktion mit PC das cholinhaltige Sphingomyelin (SM) entstehen. Es ist das mengenmäßig vorherrschende Sphingolipid. Weitere

Sphingolipide sind Cerebroside, Sulfatide und Ganglioside (Löffler 2007, S. 285–286). Sphingolipide inklusive Sphingomyelin werden auch über die Nahrung aufgenommen, zum Beispiel durch Milch, Fleisch, Leber, Eier und Hülsenfrüchte (Vesper et al. 1999).

1.4.3.3 FUNKTIONEN VON SPHINGOMYELIN

SM befindet sich vor allem in dem äußeren Blatt der Zellmembranen, ähnlich wie PC. Es ist wichtig für den Membranaufbau und die Bildung funktioneller Domänen, sogenannter „Lipid rafts“ (Löffler 2007, S. 149–150). Zudem ist SM ein wichtiger Bestandteil der „high density lipoproteins“ (HDL), moduliert gemeinsam mit PC die Funktion von Lipoproteinen (Hammad et al. 2010) und wirkt protektiv gegen Koronarerkrankungen (Martínez-Beamonte et al. 2013). SM scheint die Absorption anderer Fette aus der Nahrung, gerade von Cholesterin, in Mäusen zu verringern und somit Entzündungen sowie die Zunahme an Fettgewebe, zu verringern (Norris et al. 2017). Es wird vermutet, dass sich SM protektiv auf kolorektale Karzinome auswirkt. Zudem könnte es sich durch die Interaktion mit dem Mikrobiom positiv auf entzündliche Prozesse wie Colitis ulcerosa auswirken (Duan und Nilsson 2009). Untersuchungen zeigen jedoch auch, dass SM durch seinen Metaboliten Ceramid zu proinflammatorischen Prozessen im Colon führen kann, wohingegen PC dem entgegenwirkt (Leucht et al. 2014). Dennoch wirkt Gabe von SM p. o. in vivo intestinal anti-inflammatorisch (Furuya et al. 2008).

1.4.4 ENTWICKLUNGSPHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG VON CHOLIN

Cholin ist für die neuronale Entwicklung essenziell. In Versuchen mit Nagern, die während der Schwangerschaft cholinreich ernährt wurden, wurde beim Nachwuchs eine höhere Proliferation hippocampaler Stammzellen und später, ein verbessertes Langzeitgedächtnis gefunden (Zeisel 2006). Kinder, die ausschließlich mit Muttermilch ernährt wurden, oder eine Formulanahrung erhalten haben, die viele ungesättigte Fettsäuren, Cholin, Folsäure, Sphingomyelin und Phosphatidylcholin enthält, entwickeln die höchste Myelinisierung der grauen Substanz im Gehirn (Deoni et al. 2018). Zudem spielt Cholin eine wichtige Rolle für die Proliferation und Differenzierung von retinalen

Vorläuferzellen. Bei Mäusen führte eine Cholindeprivation in utero zu Defekten der Photorezeptoren (Trujillo-Gonzalez et al. 2019). Ob und in welcher Konzentration eine Cholin-Supplementierung zu einer verbesserten neurokognitiven Entwicklung bei menschlichen Feten führt, ist bisher ungeklärt. Marie Caudill et al haben herausgefunden, dass es mindestens eine Verdopplung der Zufuhr an Cholin bedarf um signifikante Unterschiede im kognitiven Verhalten der Kleinkinder zu messen (Caudill et al. 2018). Zudem kommt eine Studie von Wu et al zu dem Ergebnis, dass eine erhöhte Zufuhr an Cholin und Betain in der 16. SSW mit einer verbesserten motorischen Entwicklung bei 18 Monate alten Säuglingen korreliert (Wu et al. 2012). Bei Supplementierung der gleichen Menge von freiem Cholin und PC steigt Cholin im Plasma über 1,5 Mal stärker und länger an als durch Gabe von freiem Cholin (Hirsch et al. 1978).

Die Toxizität von Cholin wird oft durch seinen Metaboliten Trimethylaminoxid (TMAO) angegeben. Es wird vermutet, dass TMAO mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert ist (Zeisel und Warrier 2017). Eine hohe TMAO-Konzentration, scheint mit dem Mikrobiom assoziiert zu sein. So wurde herausgefunden, dass bei Individuen, die vermehrt TMAO produzieren, eine erhöhte Anzahl von Bakterien wie den Firmicutes gefunden wurde (Wallace et al. 2018). Eine Ernährung mit bis zu drei Eiern täglich führt, laut Studienlage, jedoch nicht zu einer signifikanten Veränderung des TMAO Spiegels (DiMarco et al. 2017). In Fisch und Meeresfrüchten ist TMAO besonders stark vorhanden (Landfald et al. 2017).

1.4.5 CHOLIN IN SCHWANGERSCHAFT UND PERINATALER PHASE

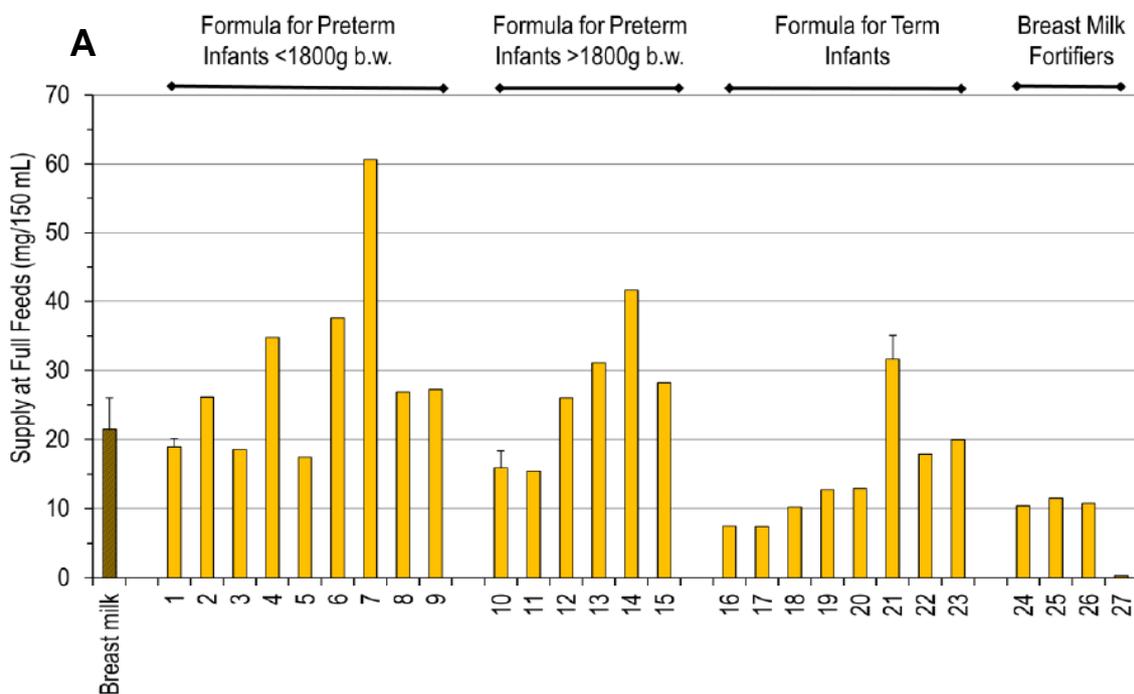
Der Fetus wird in utero durch die Plazenta mit hohen Cholinmengen versorgt. Daher ist im fetalen Plasma die Cholinkonzentration 3-4x höher, als im mütterlichen Plasma (36µmol/l vs. 10-12µmol/l) (Bernhard et al. 2015; Zeisel 2006). Studien weisen darauf hin, dass eine unzureichende Cholinversorgung zu Neuralrohrdefekten bei Feten führt. Schwangere, die unter 150mg/Tag Cholin mit der Ernährung aufnehmen, haben ein 4-Fach höheres Risiko dass ihre Kinder Neuralrohrdefekte aufweisen (Shaw et al. 2004).

Die CholinKonzentration sinkt im Plasma Frühgeborener in den ersten Tagen des Lebens schneller ab als bei Reifgeborenen, von 40 auf 20µmol/l innerhalb von 48h-post partum (Bernhard et al. 2015). Wohingegen sie bei Reifgeborenen in der ersten Woche nach Geburt hoch bleibt (von 35 auf 31µmol/L) und erst nach 3 Wochen (auf 23,6µmol/L) abgefallen ist (Ilcol et al. 2005). Nach den ersten 48h, sinkt die CholinKonzentration Frühgeborener nicht weiter, was darauf deuten kann, dass periphere Organe Cholin abgeben, anstatt es für ihre Entwicklung zu nutzen (Bernhard et al. 2019c). Tierexperimentell wurde dies für die Lunge gezeigt, die auf Cholin für die PC-Synthese angewiesen ist, im Cholinmangel aber die Leber via HDL mit PC versorgt (Li et al. 2007b). Besonders wichtig könnte dies bei einer CholinKonzentration unter 14µmol sein, denn ab dieser wird peripheren Organen Cholin zur Leberversorgung entzogen (Klein et al. 1990). Eine Studie mit 96 Probanden und Probandinnen zeigte, dass die enterale Ernährung in den ersten elf Lebenstagen eines Frühgeborenen initial sehr schwankt und erst nach Tag 11 ein Plateau erreicht. Die parenteralen Lipide können den Cholinbedarf nicht ausgleichen, da parenterale Lipidemulsionen bislang kein freies Cholin enthalten. Bei aktuellen Behandlungsmethoden wird erst an Tag 11 ein mittleres Level von 21,7mg/kg/Tag erreicht. Nur 1-2% der Frühgeborenen erreichten eine Gesamtcholinzufuhr ihrer bislang angenommenen adäquaten Zufuhr von $\geq 27,4$ mg/kg/Tag und sie sank während intensivmedizinischer Krisen auf bis zu 0mg/kg/Tag. Es zeigte sich, dass die Behandlung Frühgeborener nach aktuellem Forschungsstand den Bedarf an Cholin wahrscheinlich nicht hinreichend reflektiert (Bernhard et al. 2013).

1.4.6 CHOLIN IN MUTTERMILCH UND FORMULANAHRUNG

Die Hauptmenge des Cholins in Muttermilch liegt nicht als freies Cholin vor, sondern in Form von organischen Estern, die überwiegend wasserlöslich sind: Phosphocholin (s. Abbildung 3) ist die häufigste Form, gefolgt von Glycerophosphocholin (GPC) und freiem Cholin. Daneben sind es fettlösliche Substanzen, namentlich die Phospholipide PC, SM (s. Abbildung 4) und Lyso-PC. Der Bedarf nach der Stillphase wird vorwiegend über PC und SM gedeckt (Maas et al. 2017; Wiedeman et al. 2018a). Wasserlösliche und fettlösliche

Cholinkomponenten werden unterschiedlich resorbiert und dem Körper zur Verfügung gestellt. Erstere gehen als freies Cholin oder nach Oxidation zu Betain via Portalvene zur Leber, wobei die Bioverfügbarkeit von GPC möglicherweise besser ist als die von freiem Cholin (Cheng et al. 1996). PC hingegen wird nach Spaltung zu Lyso-PC resorbiert und zu 50% als Chylomikronen-PC via Lymphe in die periphere Strombahn freigesetzt (Zeisel 1981). SM wird kontinuierlich entlang des ganzen Darms als komplettes Molekül resorbiert und intrazellulär metabolisiert (Zeisel 1981).



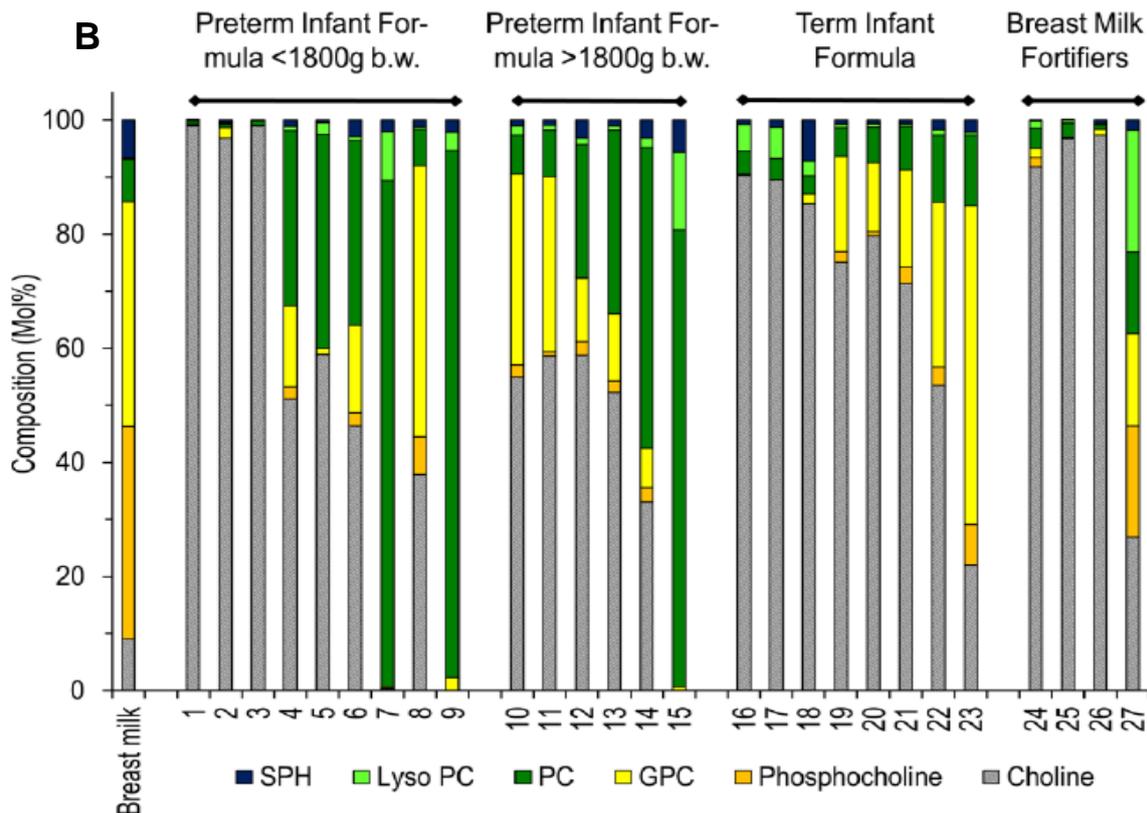


Abbildung 5 A+B: Gesamtcholin in Formulanahrungen bei vollem Kostaufbau (A) und Zusammensetzung der Cholinlieferanten in Formulanahrung und MM (B). Die Gruppen sind aufgeteilt in Formulanahrung für Frühgeborene $>/< 1800\text{g}$ Körpergewicht und Formula für Reifgeborene, sowie Muttermilch-Fortifier. Die Produktnummern lassen sich aus Anhang 1 entnehmen. Die Daten sind als Mediane mit Standardabweichungen dargestellt. Es wurde keine Standardabweichung dargestellt, wenn nicht mehr als 3 unterschiedliche Chargen getestet worden sind. Abkürzungen: GPC-Glycerophosphocholin; PC-Phosphatidylcholin; LysoPC-Lyso-phosphatidylcholin; SPH-Sphingomyelin (Shunova et al. 2019; Shunova et al. 2020).

Muttermilch und Formulanahrung unterscheiden sich stark in Ihrer Cholinkonzentration und auch in der Zusammensetzung ihrer Cholinkomponenten. Die Konzentrationen liegen bis auf wenige Ausnahmen unter denen der Muttermilch und es ist in Formulanahrung häufig mehr freies Cholin und weniger Phosphocholin und Glycerophosphocholin enthalten (s.

Abbildung 5 A+B; (Shunova et al. 2020)). Der Gehalt an (Gesamt-)Cholin in der Muttermilch Frühgeborener variiert nach bisherigen Untersuchungen stark (9-54 mg/150ml mit einem Median von 23,7mg/150ml und 25% unter 20mg/150ml). Er ist im Median niedriger, als der Gehalt der Muttermilch Reifgeborener (21-51 mg/l mit Median 39mg/l) (Maas et al. 2017).

In einer Metaanalyse von Studien zur Zufuhr von Cholin wurde gezeigt, dass sich die Zufuhr von Cholin bei Stillenden international stark unterscheidet, z. B.

263mg/Tag in Mexiko bis hin zu 374mg/Tag in Schweden (Wiedeman et al. 2018a). Ob die Variabilität der CholinKonzentration in der Milch jedoch ausschließlich durch die Nahrungsaufnahme repräsentiert wird, ist fraglich, weil die Konzentrationen an wasserlöslichen CholinKomponenten in der Muttermilch bei kanadischen Stillenden und kambodschanischen Stillenden trotz unterschiedlicher Nahrungszufuhr nicht signifikant verschieden ist (Wiedeman et al. 2018c).

1.5 LIPIDE - GRUNDLAGEN ZUM ARACHIDONSÄURE- & DOCOSAHEXAENSÄUREMETABOLISMUS BEI FRÜHGEBORENEN

1.5.1 BIOCHEMISCHE GRUNDLAGEN

Lipide sind die Bestandteile von Organismen, die sich in apolaren Lösungsmitteln (z.B. Chloroform, Methanol) lösen lassen. Sie lassen sich nach ihrem chemischen Aufbau in unterschiedliche Lipidklassen einteilen. Für diese Arbeit von Bedeutung sind unter anderem die Triglyceride (auch Neutralfette genannt), Cholesterin, Phospholipide, Sphingolipide, Fettsäuren und die Derivate langkettiger polyunsaturierter Fettsäuren (Eicosanoide, Docosanoide) (Rassow 2012, S. 13–15).

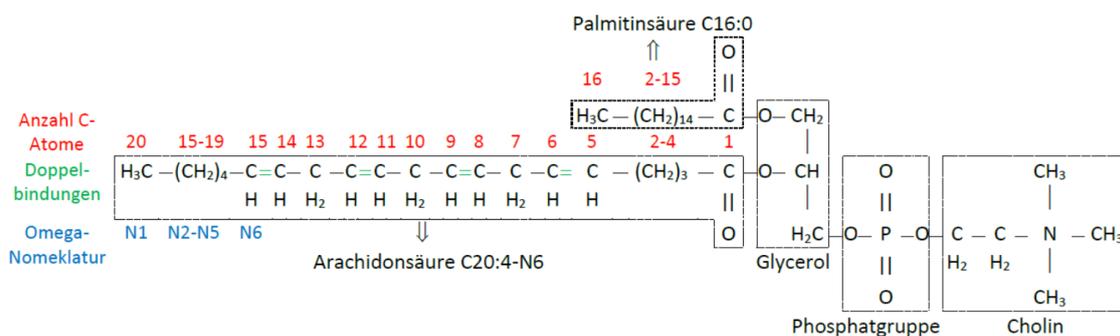


Abbildung 6: Phosphatidylcholin C16:0/C20:4n-6 zur Veranschaulichung der Nomenklatur von Fettsäuren. Es wurde die Valenzstrichformel zur Übersichtlichen Darstellung verwendet. Abkürzungen: n-Abstand vor der Doppelbindung; C-Kohlenstoff; H-Wasserstoff; O-Sauerstoff; P-Phosphat; N-Stickstoff.

Fettsäuren bestehen aus einer meist unverzweigten Kette aus 1-28 Kohlenwasserstoffresten mit einem Carboxylende (Nič et al. 2009). Eine einfache numerische Nomenklatur beschreibt die Anzahl der Kohlenstoffgruppen vor dem Doppelpunkt, die hinter dem Doppelpunkt stehende Zahl die Anzahl der Doppelbindungen. n-3, n-6, n-9 und andere geben den Abstand der ersten

Doppelbindung vor dem Methylgruppenende an (s. Abbildung 6). C22:6n-3, Docosahexaensäure, hat somit 22 Kohlenwasserstoffreste und 6 Doppelbindungen, wobei die letzte dieser Doppelbindungen 3 Kohlenstoffatome vom terminalen CH₃-Ende entfernt liegt. Komplexe Lipide enthalten mehrere, meist unterschiedliche Fettsäuren, sodass eine Vielzahl unterschiedlicher molekularer Spezies mit einer organotypischen Zusammensetzung vorliegt. PC16:0/18:2 enthält beispielsweise einen Palmitinsäure- und einen Linolensäurerest. Somit ist PC16:0/18:2 eine Spezies unter vielen Phosphatidylcholinen (Bernhard et al. 2014 Online Resource 2).

1.5.2 VERDAUUNG DER FETTSÄUREN

Lipide werden über die Nahrung in Form von Triacylglyceriden (TAG), Phospholipiden, Sphingolipiden, freien Fettsäuren und Cholesterin aufgenommen, wobei TAG den größten Anteil ausmachen. Letztere bestehen aus Glycerin, welches mit drei Fettsäuren verestert ist. Die Verdauung von Fetten geschieht in mehreren Schritten: Sie beginnt bereits mit der Zungengrund- und Magenlipase, die die Esterbindungen von Triacylglycerid in Fettsäuren und Diacylglycerid hydrolysiert. Die Magenlipase ist besonders bei Neugeborenen sehr aktiv (Ménard et al. 1995). Nach Sekretion ins Duodenum wird Nahrungsfett mittels Galle und den in der Galle vorhandenen PC emulgiert, um es durch Oberflächenvergrößerung für Lipasen (Bspw. Pankreaslipasen) angreifbarer zu machen. Anschließend werden z.B. TAG in Fettsäuren und Monoacylglycerin und Cholesterinester in Cholesterin und Fettsäuren gespalten (Hofmann und Hagey 2014). Tabelle 4 zeigt die spezifischen Enzyme mit ihrer Lokalisation und Funktion. Gallensäuren bewirken, dass die gespaltenen Fettsäuren, sowie andere Produkte (Beispielsweise fettlösliche Vitamine) sich zu Mizellen formatieren (Hofmann und Hagey 2014). Mizellen bestehen aus einer Lipiddoppelmembran mit einem hydrophilen Lumen, ermöglichen den Transport von Fettsäuren im wässrigen Darmlumen und werden durch die Enterozyten endozytiert (Hofmann und Borgstroem 1964). Einige langkettige FS werden direkt über Fettsäuretransportproteine und freies Cholesterin direkt über Niemann-Pick Typ 1 C1 in die Enterozyten aufgenommen (Rassow 2012, S. 223–

225). Um die Enterozyten zu verlassen, werden die Spaltprodukte der resorbierten TAG am endoplasmatischen Retikulum (ER) wieder zu TAG synthetisiert. Sie lagern sich mit Cholesterinestern, Cholesterin, fettlöslichen Vitaminen und Phospholipiden zu Chylomikronen zusammen. Chylomikrone bestehen zu 85% aus TAG, 3% Cholesterinester, 2% Cholesterin und 8% Phospholipiden, hauptsächlich PC, das aus dem gespaltenen und als Lyso-PC resorbierten Galle-PC synthetisiert wird. PC und ein geringer Anteil von freiem Cholesterin bilden hierbei die äußere Schicht. An Ihnen sind unter anderem die Apolipoproteine ApoB48 und Apo-A1 gebunden. Nun verlassen sie die Enterozyten über die Lymphe. Den Blutkreislauf erreichen sie im linken Venenwinkel (William W Christie 2019).

| Enzym | Funktion |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Zungengrundlipase | Hydrolyse von ca. 10% der Lipide |
| Magenlipase | Überführung eines Großteils der Lipide in eine Emulsion und Spaltung dieser. |
| Gallensäuren | Herauslösen der Lipide aus der Nahrung und Emulgation in aus Gallensäuren, TAG, Phospholipiden und Cholesterin bestehende Aggregate |
| Pankreaslipase | Hydrolyse der TAG zu 2-Monoacylglycerin und freier Fettsäure |
| Colipase (Pankreas) | Öffnung des aktiven Zentrums der Pankreaslipase |
| Phospholipase (Pankreas) | Hydrolyse der Esterbindung glycerinhaltiger Phospholipide, Spaltung zu 1-Lyso-PC und freier Fettsäure |
| Cholesterinesterase (Pankreas) | Hydrolyse von Lipidestern, unter anderem Cholesterinester |

Tabelle 4: Verdauungsenzyme (Rassow 2012, S. 221–223); Abkürzung: TAG-Triacylglyceride

Kurze und mittellange Fettsäuren werden nicht in Chylomikronen eingebaut. Es ist zurzeit unklar, ob sie mittels bestimmter Transporter, mit Cl^- oder HCO_3^- oder pH abhängig durch nichtionische Diffusion in die Enterozyten geschleust werden (Schönfeld und Wojtczak 2016). Es wird vermutet, dass kurzkettige FS die Enterozyten über einen Austausch mit Bicarbonat verlassen (McNeil et al. 1978; Schönfeld und Wojtczak 2016). Mittellange FS werden direkt an das Blut abgegeben und binden zum großen Teil an Albumin. Im Blut werden kurz- und mittelkettige FS über die Pfortader direkt zur Leber transportiert (Schönfeld und Wojtczak 2016). Glycerin wird durch das Membranprotein Aquaporin AQP10 aufgenommen und dann zur Bildung von TAG genutzt oder direkt ins Blut abgegeben (Rassow 2012, S. 224).

1.5.3 LIPOPROTEINE UND DER TRANSPORT VON TRIACYLGLYCERIDEN,

FETTSÄUREN UND PHOSPHOLIPIDEN

Im Blut werden komplexe Lipide über Lipoproteine transportiert. Dabei hat Cholin in Form von PC und SM eine zentrale Rolle: Lipoproteine bestehen aus einer äußeren Schicht von polaren Lipiden, insbesondere PC, SM und PE, sowie Cholesterin und Apolipoproteinen. Im Kern enthalten sie apolaren Lipide (TAG, Cholesterinester) (Rassow 2012). PC dient als Fettsäurequelle für die Veresterung von Cholesterin und ist Carrier für den Transport von ARA und DHA (Bernhard et al. 2018). Apolipoproteine dienen der Bindung des Lipoproteins an die Zellen der Zielgewebe, in die seine Komponenten transportiert werden sollen. Sie binden Lipide, verbinden sich mit den Rezeptoren der Zielzellen oder aktivieren Enzyme zum Abbau der Lipoproteine (Rassow 2012). Die Lipoproteinlipase beispielsweise sitzt am Gefäßendothel und hydrolysiert TAG in Monoacylglyceride und freie Fettsäuren sodass diese ihr Zielgewebe erreichen können (Olivecrona 2016). Phospholipide bilden durch ihren hydrophilen Kopf eine Möglichkeit die Fette im wässrigen Blut zu transportieren. 60-80% der Phospholipide bestehen aus PC, das zweitwichtigste Phospholipid ist PE (van der Veen et al. 2017). Die Lipoproteine lassen sich entweder nach den in Ihnen vorhandenen Apolipoproteinen oder nach Dichtegrad in die bereits erwähnten Chylomikronen, in die Very-Low-Density-Lipoproteins (VLDL), Intermediate-Density-Lipoproteins (IDL), Low-Density-Lipoproteins (LDL) und die High-Density-Lipoproteins (HDL) einteilen (William W Christie 2019).

Chylomikronen, die aus der Lymphe das Blut erreichen dienen hauptsächlich der Energiebereitstellung für periphere Gewebe mit TAG, die diese über Lipoproteinlipasen gewinnen. Was übrig bleibt sind cholesterinreiche Reste, Apo-B48 und Apo-E. Über Apo-E werden diese Reste nun in die Leber aufgenommen und dem Blutkreislauf entzogen (William W Christie 2019).

Very-Low-Density-Lipoproteins (VLDL) werden in der Leber aus PC, TAG und Cholesterin mit Hilfe von Apo-B100 gebildet. Sie enthalten 20% PC, 55% TAG und 20% Cholesterin (William W Christie 2019). PC ist für die Bildung der VLDL essentiell (Vance und Vance 1990). VLDL binden, genau wie Chylomikronen, an

Lipoproteinlipasen. Dort wird das PC in Lyso-PC und freie Fettsäuren gespalten und resorbiert. Ebenso werden die TAGs abgespalten und aufgenommen. Aus den VLDL werden über Intermediate-Density-Lipoproteins (IDL) – Low-Density-Lipoproteins (LDL) gebildet. Diese enthalten bis zu 50% Cholesterin, 10% TAG und 30% Phospholipide und dienen hauptsächlich der Versorgung peripherer Gewebe mit Cholesterin. Sie enthalten Apo-B100, welches ihre Verbindung mit den LDL-Rezeptoren des Gewebes vermittelt und dazu führt, dass der komplette Partikel endozytiert und die enthaltenen Fettsäuren sowie das frei werdende Cholin in der Zelle freigesetzt werden (Rassow 2012, S. 246–247).

HDL entsteht in Leber, Darm und Lunge aus proteinreichen Partikeln die unter anderem aus Apo-A1 bestehen. In der Lunge sezernieren Typ-II-Pneumozyten basolateral (via ABC-A1) PC und Cholesterin und übertragen diese auf Apo-A1 (Zhou et al. 2004). Im Blut werden über Transferproteine Phospholipide, Sphingomyelin und Cholesterin zwischen Plasma und anderen Lipoproteinen ausgetauscht. HDL dienen dem reversen PC- und Cholesterin-Transport zur Leber sowie der Versorgung Steroidhormon produzierender Zellen mit Cholesterin. Ein Teil des Cholesterins wird in der Leber für die Synthese von Gallensäuren genutzt (William W Christie 2019). In summa, HDL versorgen im Cholinmangel die Leber mit Cholin, indem PC aus peripheren Organen, wie der Lunge, zur Leber transportiert wird (Li et al. 2007a).

1.5.4 ARACHIDONSÄURE, DOCOSAHEXAENSÄURE UND IHRE VORSTUFEN

Ein Hauptthema dieser Arbeit sind die mehrfach ungesättigten omega-3-Fettsäuren alpha-Linolensäure (ALA, C18:3n-3), Eicosapentaensäure (EPA, C20:5n-3) und Docosahexaensäure (DHA, C22:6n-3) sowie die omega-6-Fettsäuren Linolsäure (LA, C18:2n-6) und Arachidonsäure (ARA, C20:4n-6).

1.5.4.1 OMEGA-3-FETTSÄUREN

Alpha-Linolensäure (ALA) ist eine dreifach-ungesättigte Fettsäure mit omega-3-Stellung der terminalen Doppelbindung (C18:3n-3). Sie ist ein essenzieller Nährstoff, weil es in Säugern keine $\Delta 15$ -Desaturasen gibt, und ist in vielen pflanzlichen Ölen, besonders in den Ölen der Samen von Chia, Lein, Walnuss, Hanf und Raps vorhanden. Sie ist Ausgangsfettsäure für die Synthese von EPA und DHA (s. Abbildung 7). Die ersten Schritte der Desaturierung und Elongation bis 24 Kohlenwasserstoffeinheiten erfolgen im endoplasmatischen Retikulum. Lediglich der letzte Schritt, ein β -Oxidationsschritt mit Verkürzung auf 22 Einheiten, findet im Peroxisom statt (Burdge und Calder 2005; Yagi et al. 2017). Hauptcarrier für DHA im Plasma ist PC (Bernhard et al. 2018).

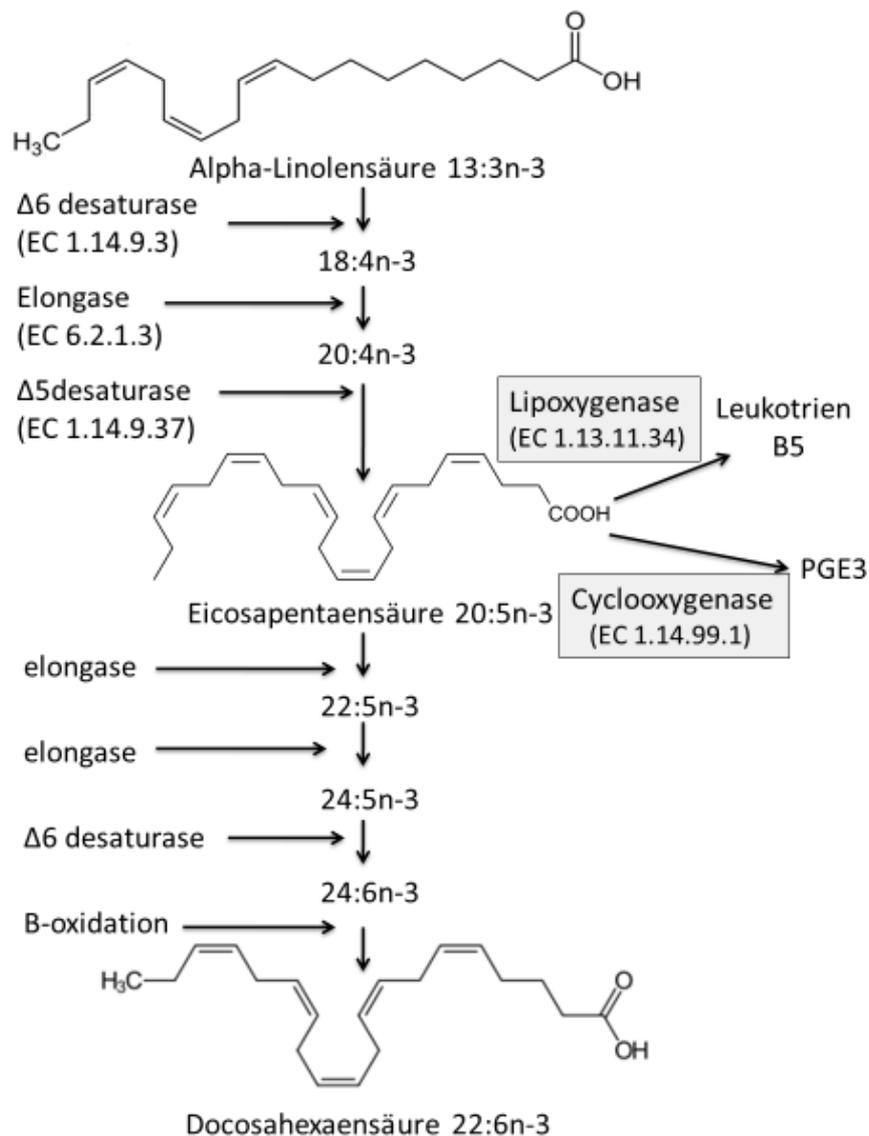


Abbildung 7: Metabolismus der Omega-3-FS; Abkürzungen: PGE5-ProstaglandinE5

Eicosapentaensäure (EPA, C20:5n-3) ist Intermediärprodukt der Synthese von DHA und wird mit der Nahrung hauptsächlich über Fisch aufgenommen. Das Vorkommen von EPA ist sehr gering beim Fetus, sodass davon auszugehen ist, dass EPA für Frühgeborene keine wesentliche Bedeutung hat (Bernhard et al. 2014; Makrides et al. 1994). Aus EPA können durch Lipoxygenasen und Cyclooxygenasen die entzündungshemmenden Eicosanoide entstehen. Diese weichen in Ihrer Funktion und Aufbau von den Eicosanoiden der Arachidonsäure (ARA) ab. So werden aus EPA beispielsweise Prostaglandine der Serie 3 (PG-E3, mit drei Doppelbindungen) und Leukotriene der Serie 5 (mit fünf Doppelbindungen) gebildet (Borow et al. 2015). Diese hemmen die Eicosanoidsynthese durch ARA und hemmen somit die entzündungsfördernde Wirkung der von ARA abstammenden Eicosanoide (Larsson et al. 2004). Es wurde berichtet, dass EPA die Oxidation von LDL-Lipoproteinen hemmt und somit Arteriosklerose entgegen wirkt (Mason und Jacob 2015). Zudem scheint EPA einen besonders positiven Effekt auf Depressionen zu haben (Martins 2009).

Docosahexaensäure (DHA, C22:6n-3) ist in der grauen Substanz des Gehirns und in der Retina in hohem Anteil vorhanden (Innis 2003). Sie ist die einzige quantitativ bedeutsame Omega-3-Fettsäure im Gehirn (Crawford 2006; Menard et al. 1998). DHA stimuliert die Genexpression zum Wachstum und Entwicklung des Gehirns und stimuliert die Synapsenbildung (Kitajka et al. 2004).

DHA kann im Körper aus ALA bzw. EPA hergestellt werden, jedoch ist diese Synthese vermutlich nicht ausreichend (Baker et al. 2016). Über die Nahrung kann DHA über Fisch und Mikroalgen aufgenommen werden (Adarme-Vega et al. 2012). In Fischen und Meeressäugern wird DHA über die Nahrungskette durch den primären Konsum von Algen anreichert. Diese Algen akkumulieren mehrfach ungesättigte Fettsäuren, um die Membranfluidität ihrer Zellen zu erhalten. Die Konzentration an mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Algen ist temperatursensibel. So reichern Algen in kaltem Gewässer vermehrt DHA an, um ihre Fluidität zu erhalten. In wärmeren Gewässern steigt die Konzentration gesättigter Fettsäuren in den Zellmembranen, wobei der DHA-Gehalt sinkt (Arts

und Kohler 2009; Guschina und Harwood 2006). Da es voraussehbar ist, dass die globale Wassertemperatur bedingt durch den Klimawandel steigen wird, ist zu vermuten, dass dadurch die globale Verfügbarkeit von DHA für den Menschen sinken wird. Colombo et al. (2019) postulieren, dass unter der aktuellen klimatischen Entwicklung die Verfügbarkeit von DHA im globalen Durchschnitt um 58% sinken wird. Besonders betroffen ist hier der afrikanische Kontinent sowie wirtschaftlich strukturschwache Länder, die ihren DHA-Bedarf nicht durch technischen Fortschritt oder Import decken können (Colombo et al. 2019). Es ist von Nöten neue Herangehensweisen zu finden, um trotz der aktuellen Herausforderungen hinsichtlich Überfischung (Coll et al. 2008) und Klimawandel global eine optimale Zufuhr zu gewährleisten. Mehrere Studien belegen, dass DHA-Supplemente, die aus Algen gewonnen werden, eine gleiche oder gar bessere Bioverfügbarkeit für DHA aufweisen. Zudem wurden keine relevanten Nebenwirkungen gemessen (Arterburn et al. 2007; Arterburn et al. 2008; Ryan und Symington 2015).

1.5.4.2 OMEGA-6-FETTSÄUREN

Linolsäure (LA; C18:2n-6) ist eine zweifach-ungesättigte Fettsäure und Ausgangssubstanz für die Bildung von ARA. Sie ist essenziell, da der Organismus keine delta-12-Desaturase besitzt und deshalb Ölsäure nicht zu Linolsäure desaturieren kann. Die ARA-Bildung geschieht über gamma-Linolensäure (GLA) als Zwischenstufe. Aus ARA wird durch Fettsäureelongation zudem eine weitere Omega-6-Fettsäure, die Docosatetraensäure (C22:4n-6, Adrensäure), gebildet (s. Abbildung 8). LA ist in tierischen und pflanzlichen Produkten zu finden. Die meisten pflanzlichen Öle, wie Distelöl, Sonnenblumenöl und Sojaöl enthalten viel Linolsäure. Somit ist Linolsäure in der westlichen Diät reichlich vorhanden (Whelan und Fritsche 2013), mit erheblichem Einfluss auf die Zusammensetzung des Milchfettes (Innis 2014).

Arachidonsäure (ARA; 20:4n-6). kann aus Linolsäure synthetisiert werden, jedoch ist auch hier die endogene Produktion zu gering, um den hohen Bedarf von Fetten und Frühgeborenen zu decken (Hadley et al. 2016). Über die Nahrung ist Arachidonsäure im hohen Anteil in Eigelb, Schweineschmalz, Fleisch, Leber

und sonstigen tierischen Produkten vorhanden (Taber et al. 1998). ARA ist Ausgangssubstanz für die Produktion von Eicosanoiden, sprich Leukotrienen, Thromboxanen, und Prostaglandinen (Simmons et al. 2004) (s. Abbildung 9).

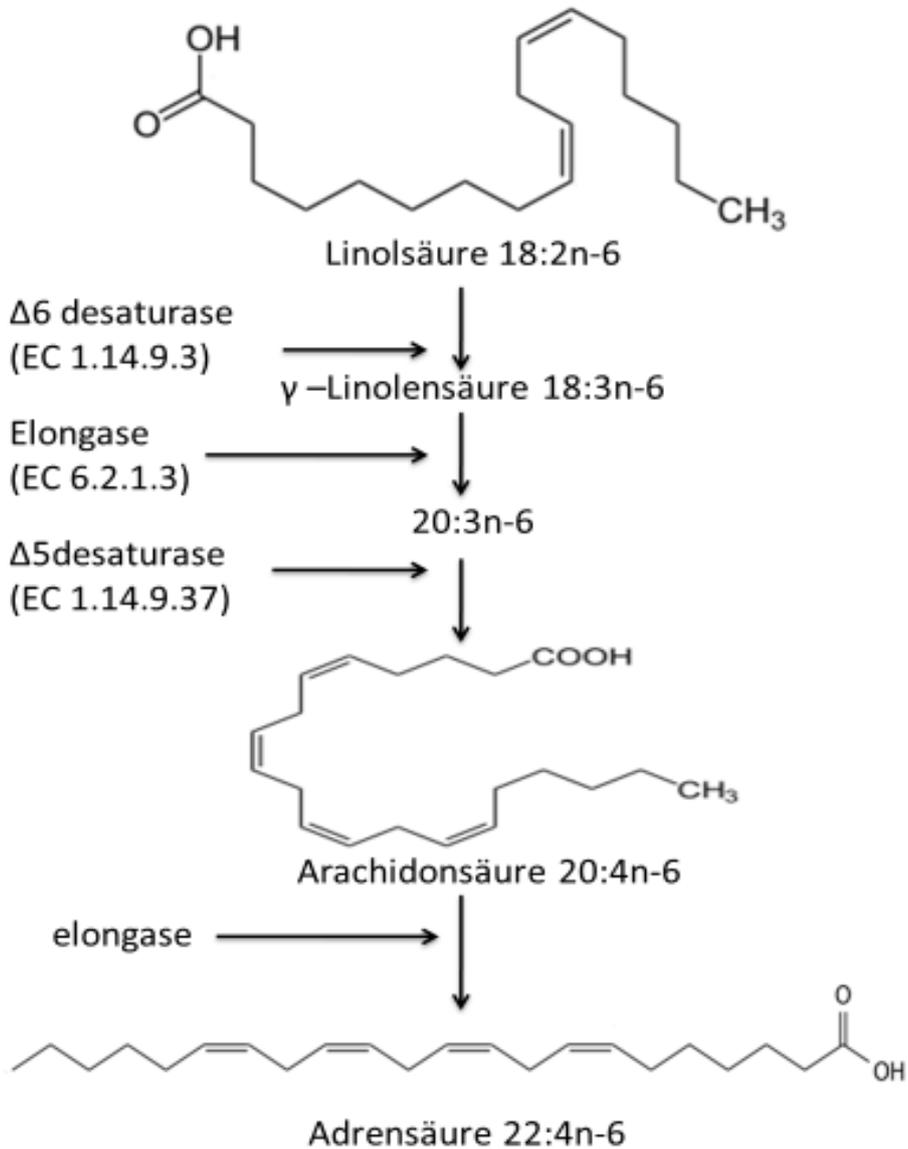


Abbildung 8: Eicosanoidsynthese ausgehend von ARA

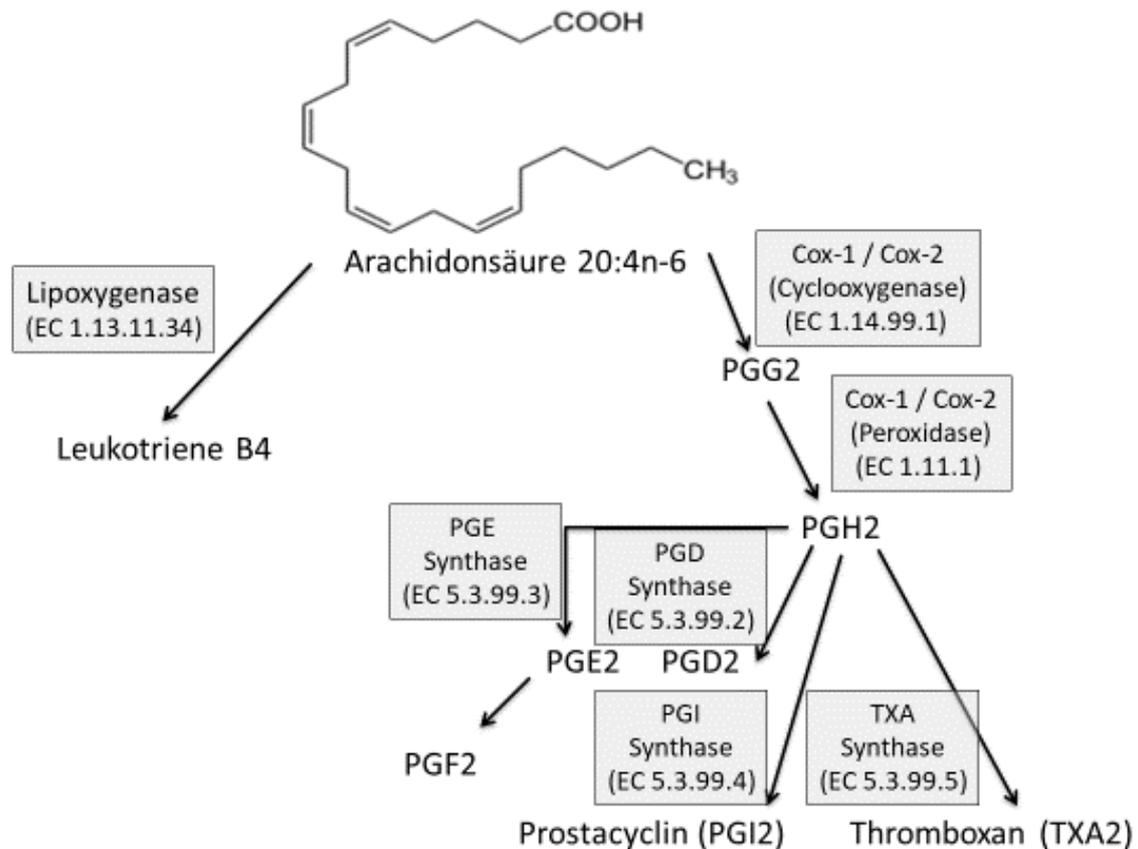


Abbildung 9: Metabolismus der Omega-6-FS Abkürzungen: PG – Prostaglandin; G₂, H₂, E₂, D₂ & F₂ – Derivate des Prostaglandins

ARA ist in den Phospholipiden der inneren Zellmembran vorhanden, vor allem in den für die Frühgeborenenentwicklung kritischen Organen wie Leber, Gehirn und Lunge. Zudem ist ARA immer in einem höheren Maße als DHA in den Organen vorhanden (Bernhard et al. 2014). Das innere Blatt der Plasmamembran beinhaltet viele Rezeptoren, Ionenkanäle und Enzyme. Es ist die Basis der Organisation der Zelle (Crawford et al. 2015). Im Gehirn sind ARA und seine Metabolite, die Eicosanoide, und sein Elongationsprodukt, die Adrensäure (C₂₂:4n-6) an einer Vielzahl von Funktionen mitbeteiligt (Hadley et al. 2016). Adrensäure ist beispielsweise vermehrt in der Myelinschicht von Nervenzellen vertreten (Bosetti 2007; Hadley et al. 2016). ARA-Derivate spielen zudem bei der Nervenzellerregung eine Rolle (Kaufmann et al. 1996; Sanchez-Mejia et al. 2008) modulieren Neurotransmitter (Chapman und Dickenson 1992; Vijayaraghavan et al. 1995), erhöhen das Langzeitpotential (Williams et al. 1989) und tragen zur Erhaltung der hippocampalen Plastizität bei (Fukaya et al. 2007). ARA ist auch an der Modulierung des SNARE-Komplexes beteiligt, welcher die Exozytose

bewirkt (Darios et al. 2010). Andererseits spielt ARA eine Rolle in Ischämie bedingten neuronalen Schäden des Gehirns, indem sie zum Teil durch direkte Interaktion mit den endothelialen Zellen die vaskuläre Permeabilität erhöht und so zu Hirnödemen beiträgt (Katsuki und Okuda 1995; Ohnishi et al. 1992). Zudem werden einige von ARA abstammende Eicosanoide mit kanzerogenen Mechanismen wie Beispielsweise einem erhöhten Überleben von Tumorzellen in Verbindung gebracht (Larsson et al. 2004). Eicosanoide, welche von ARA abstammen, haben pro- wie auch antiinflammatorische Eigenschaften (Hadley et al. 2016). Bemerkenswert ist eine Studie mit 6 Monate alten Säuglingen, die zeigte, dass sich ARA antiproportional zu den Zytokinen IL 2 und 17 verhält. Das bedeutet, dass durch hohe ARA-Werte das Risiko für Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise Asthma vermindert werden könnte (Muc et al. 2015).

Die Supplementation mit ARA und EPA führt bei Ferkeln mit nekrotisierender Enterokolitis, entgegen der Befürchtung, dass ARA proinflammatorisch wirkt, zu einer schnelleren Heilung (Jacobi et al. 2012). Auch für Muskelaufbau und die Bildung der Knochensubstanz ist ARA essentiell (Hadley et al. 2016). Die Adrensäure ist besonders im Gehirn vorhanden und scheint dort für die Myelinisation von Bedeutung zu sein (Makrides et al. 1994; Wijendran et al. 2002).

Die Bildung von EPA und DHA aus ALA wird von denselben Enzymen katalysiert, die die Bildung von ARA aus LA bewirken (Mantzioris et al. 1994). Unsere moderne westliche Nahrung, besteht zu großen Teilen aus Linolsäure und enthält meist, für den Körper kaum förderliche, Transfettsäuren. Dies führt dazu, dass das LA:ARA:DHA Verhältnis zu Gunsten von LA verschoben ist und ARA und DHA in Ihren Anteilen verdrängt werden (Innis 2007a). Studien kommen zu dem Ergebnis, dass sich die Bildung von EPA und DHA durch eine ALA-reiche Ernährung und eine LA-ärmere Ernährung steigern lässt (Mantzioris et al. 1994; Novak et al. 2012). Jedoch scheint sie für das schnelle Wachstum während der Fetalzeit nicht hinreichend zu sein, weshalb ARA und DHA in großen Mengen diaplazentar angereichert werden (Crawford et al. 2003).

1.5.5 LIPIDE IN SCHWANGERSCHAFT UND STILLZEIT

Bereits für die Entwicklung und Vaskularisation der Placenta ist ARA essentiell und wird dort, vor Allem im ersten Trimenon, angereichert (Bitsanis et al. 2005). Es wird vermutet, dass ARA und DHA für die Funktion der Plazenta wichtig sind und ein Mangel zur Eklampsie beiträgt (Crawford 2000). Der Fetus erhält über die Placenta selektiv und kontinuierlich ARA und DHA. ARA wird in einer 3fach höheren Rate als DHA und ARA in einer 1,3-1,6fach höheren Rate als Linolsäure transportiert (Foreman-van Drongelen et al. 1995; Lapillonne et al. 2013; Nilsson et al. 2019). Zudem ist das Depotfett reifgeborener Kinder reich an ARA und DHA (Foreman-van Drongelen et al. 1995). Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht von 1300g haben zudem nur ein Fettdepot von ~30g, gegenüber ~340g bei reifgeborenen Kindern mit 3500g Geburtsgewicht, und somit kein nennenswertes ARA- und DHA Reservoir (Clandinin et al. 1981). Postnatal sinkt bei Frühgeborenen der Anteil von ARA-PC (~40→20%) und DHA-PC (~12→6% des Plasma-PC%) (Bernhard et al. 2014). In Fettgewebe, Plasma und Erythrozyten Frühgeborener zum regulären Geburtstermin, d. h. nach 1-3 Monaten stationärer Behandlung, sind ARA und DHA deutlich gegenüber reifen Neugeborenen erniedrigt und LA erhöht (Böckmann et al. 2020). Brenna et al haben eine durchschnittliche Konzentration von 0,47% ARA und 0,32% DHA in der Muttermilch gemessen (Brenna et al. 2007), Maas et al hingegen 0,81% für ARA und 0,43% für DHA (Maas et al. 2017). Über die Muttermilch erhalten die FG somit nur ca. 300mg/L ARA und 159mg/L DHA. Bei 150ml/kg/d Nahrungsaufnahme werden damit Werte von 45mg/kg/d ARA und 24mg/kg/d DHA erreicht (Maas et al. 2017). Zudem werden höchstens 80% des verabreichten DHA im Darm absorbiert (Carnielli et al. 1998). Die aus der Fetalentwicklung abgeleitete empfohlene Zufuhr für FG mit 1300g Gewicht und 17g Wachstumsrate pro Tag beträgt jedoch ~140mg/kg/d für ARA und ~43mg/kg/d für DHA (Clandinin et al. 1981; Lapillonne und Jensen 2009).

1.5.6 FUNKTIONELLE BEDEUTUNG VON ARACHIDONSÄURE UND

DOCOSAHEXAENSÄURE FÜR DIE FETALE UND KINDLICHE ENTWICKLUNG

Es wird vermutet, dass die Einnahme von Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren immunologische Prozesse beeinflusst und die Widerstandsfähigkeit einiger Organe erhöht. In einer Studie, in der Säuglinge während der Stillzeit zusätzlich ARA und DHA erhielten, zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen der Einnahme von ARA und DHA und der Entwicklung von Allergien im Alter von 4 Jahren (Foiles et al. 2016). Zudem wächst und entwickelt sich das Gehirn im letzten Trimester der Schwangerschaft und noch einige Jahre über die Geburt hinaus, was eine adäquate Versorgung mit ARA und DHA voraussetzt. Sie machen gemeinsam ca. 25% der Fettsäuren im Gehirn aus (Crawford und Sinclair 1971) und sind in ähnlichem Anteil vorhanden, wobei ARA den Anteil von DHA leicht übersteigt (Hadley et al. 2016; Makrides et al. 1994). Demnach ist der Bedarf an ARA und DHA gerade während der ersten Lebensjahre von besonderer Bedeutung (Crawford und Broadhurst 2012; Innis 2007a). Der stark erniedrigte Anteil von ARA und DHA im Fettgewebe Frühgeborener gegenüber reifgeborenen Kindern (Böckmann et al. 2020) impliziert einen erheblich geringeren Vorrat dieser Fettsäuren und eine ggf. beeinträchtigte neuronale Entwicklung.

1.6 ZIEL DER ARBEIT

Cholin, ARA und DHA wurden als essenzielle Nahrungsbestandteile für die fetale Entwicklung, und damit auch die von Frühgeborenen, lange Zeit vernachlässigt. Dies wird aktuell aufgrund mehrerer Publikationen revidiert und erfordert die Klärung von Fragen zu ihrer hinreichenden Zufuhr. Dies gilt für Frühgeborene angesichts ihres hohen Bedarfs für Wachstum und Entwicklung, da sie nicht „physiologisch“ in utero über die Plazenta versorgt werden. Insbesondere wurde herausgestellt, dass Cholin, ARA und DHA aufgrund ihrer Interaktionen im Stoffwechsel der Phospholipide nicht isoliert betrachtet werden dürfen.

Diese Doktorarbeit beschäftigt sich als Teil einer registrierten Supplementierungs-Studie mit Cholin und DHA bei stabilen Frühgeborenen unter 32w PMA (Nummer NCT02509728; www.clinicaltrials.gov) mit der Zufuhr von Cholin, ARA und DHA über die Muttermilch und der Korrelation dieser Werte mit deren Konzentrationen im Plasma der Kinder. Es sollten Daten über die täglichen intra- und interindividuellen Schwankungen dieser Stoffe in der Muttermilch und deren Zufuhr bei den Frühgeborenen erhoben werden. Ich wollte über die Basiszufuhr von Cholin, ARA und DHA durch die Muttermilch anhand konkreter individueller Zufuhrdaten herausfinden, welchen Stellenwert Muttermilch als Lieferant für diese Stoffe bei Frühgeborenen hat. Zudem beschäftigte ich mich mit der Frage, ob die enterale Aufnahme mit den Konzentrationen von Cholin, ARA und DHA sowie ihren Derivaten im Plasma dieser Säuglinge korreliert. Berücksichtigt wurden dabei die verschiedenen Lipidkomponenten und wasserlöslichen Derivate, in denen Cholin, ARA und DHA in Muttermilch und Plasma vorkommen. Des Weiteren untersuchte ich die Korrelationen zwischen ARA und DHA und seinen Präkursoren, LA und ALA in der Muttermilch.

Ich erwartete, mit dieser Studie weitere Erkenntnisse über die reale Zufuhr von Cholin, ARA und DHA bei Frühgeborenen im Kontext der Ernährung mit Muttermilch zu gewinnen. Zudem war mein Ziel, das Verständnis über die Variationen im Gehalt dieser Nährstoffe, ihrer Metabolite sowie der anderen Fettsäuren in der Muttermilch zu erweitern.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 GERÄTE, CHEMIKALIEN UND LÖSUNGSMITTEL

2.1.1 GERÄTE

| Gerät | Firma; Sitz |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Analytische Waage (SI234 A) | Denver Instruments; Denver, USA |
| Blocktermostat BT 200 | Kleinfeld; Gehrden, Deutschland |
| Eppendorf Mulipette®plus | Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland |
| Eppendorf Research Pipetten 100, 250, 500, 1000µl | Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland |
| Gaschromatograph, Agilent 7890A | Agilent Technologies; Santa Clara, Vereinigte Staaten |
| Gefrierschrank Electrolux -30°C | Electrolux AG (Medical Refrigeration); Zürich, Schweiz |
| Gefrierschrank SANYO -80°C | Stiehl Kälte-und Klimatechnik; Tübingen, Deutschland |
| Kühlschrank (computer control cooler) | Robert Bosch GmbH; Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland |
| Magnetrührer (Reacti-Therm III Heating/Stirring module) | PIERCE; Rockford, USA |
| Massenspektrometer <ul style="list-style-type: none"> • TSQ Quantum – Discovery Max • Quaternäre HPLC Pumpe, Finnigan Surveyor MS Pump Plus • Automatischer Probenaufgeber – Finnigan Surveyor Autosampler Plus • Xcalibur 2.0.7 data acquisition software | Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich, Deutschland |
| Messzylinder Duran 25ml, 50ml, 500ml, 1000ml | DWK Life Sciences GmbH; Wertheim/Main, Deutschland |
| Mikroliterspritze Hamilton 0,1ml, 0,025ml, 0,5ml | Hamilton Company; Reno, Nevada, USA |
| Multidispenser Handy Step®S | Brand GmbH & CO KG; Wertheim, Deutschland |
| Pyrex®-Röhrchen 16x100mm Wiederverschließbar | Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich, Deutschland |
| Vortex (Reax Top)- Rüttler | Heidolph Instruments GmbH & CO. KG; Schwabach, Deutschland |
| Zentrifuge (Megafuge 1.0) | Heraeus Holding GmbH; Hanau, Deutschland |

Tabelle 5: Verwendete Geräte

2.1.2 SUBSTANZEN

| Reagenz | Firma;Sitz | Lagerung |
|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------|
| 13,16,19 Docosatriensäure, 10 µg/ml in Toluol+Methanol (3+1) | Larodan Fine Chemicals; Monroe, Vereinigte Staaten | Kühlschrank (+4°C) |
| 19 (20) DiHDPA 50µg/ml | Cayman Chemicals; Michigan, Vereinigte Staaten | Kühlschrank (+4°C) |
| Acetylchlorid | Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland | Raumtemperatur |

| | | |
|----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------|
| Ammoniumacetat | Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland | Raumtemperatur |
| Betainmonohydrat | Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland | Raumtemperatur |
| D2142 Cholin – D ₉ Chlorid | CDN Isotopes; Quebec, Kanada | Raumtemperatur im Vakuum |
| Cholinchlorid | AppliChem; Darmstadt, Deutschland | Raumtemperatur im Vakuum |
| Cholinchlorid | Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland | Raumtemperatur im Vakuum |
| Cholin-1,1,2,2-d ₄ Chlorid | CDN Isotopes; Quebec, Kanada | Raumtemperatur im Vakuum |
| N-(Carboxymethyl)- N,N,N-trimethyl-d ₃ - ammonium Chlorid | CDN Isotopes; Quebec, Kanada | Raumtemperatur im Vakuum |
| N,N-Dimethyl-d ₆ - glycerine HCl | CDN Isotopes; Quebec, Kanada | Raumtemperatur im Vakuum |
| DL-Homocystein | Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland | Kühlschrank (+4°C) |
| Sn-Glycero-3- Phosphocholin | Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland | Kühlschrank (+4°C) |
| Kaliumcarbonat | Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland | Raumtemperatur im Vakuum |
| L-Carnitin-d ₃ HCl | CDN Isotopes; , Quebec, Kanada | Raumtemperatur im Vakuum |
| L-Carnitin-Hydrochlorid | Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland | Raumtemperatur |
| L-Methionin | AppliChem; Darmstadt, Deutschland | Raumtemperatur |
| L-Methionin-d ₃ | CDN Isotopes; , Quebec, Kanada | Kühlschrank (+4°C) |
| N,N-Dimethylglycin- Hydrochlorid | Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland | Kühlschrank (+4°C) |
| Phosphocholin-Chlorid, Calcium Salz Tetrahydrat | Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland | Kühlschrank (+4°C) |
| Phosphocholin-d ₉ Chlorid, Calcium Salz | CDN Isotopes; , Quebec, Kanada | Raumtemperatur im Vakuum |
| S-Adenosyl- Homocystein | Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland | Kühlschrank (+4°C) |
| Trimethylamin | Fluka Analytical; | Kühlschrank (+4°C) |

Tabelle 6: Verwendete Substanzen

2.1.3 LÖSUNGSMITTEL

| Chemikalie | Firma; Sitz | Aufbewahrung |
|--------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Acetonitril | Honeywell; Morristown, USA | Raumtemperatur im Sicherheitsschrank |
| Ameisensäure | Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland | Raumtemperatur im Sicherheitsschrank |
| Butylhydroxytoluol | Merck; Hohenbrunn, Deutschland | Raumtemperatur im Vakuum |
| Chloroform | J.T. Baker; Gliwice Poland | Raumtemperatur im Sicherheitsschrank |
| Ethanol | Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland | Raumtemperatur im Sicherheitsschrank |

| | | |
|-------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Methanol | Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland | Raumtemperatur im Sicherheitsschrank |
| n-Hexan | Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland | Raumtemperatur im Sicherheitsschrank |
| Propanol - 2 | Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland | Raumtemperatur im Sicherheitsschrank |
| Propanol - 2 | Honeywell; Morristown, USA | Raumtemperatur im Sicherheitsschrank |
| Toluol | Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland | Raumtemperatur im Sicherheitsschrank |
| Trifluoroethanol -2,2,2 | Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland | Raumtemperatur im Sicherheitsschrank |
| Wasser (gereinigt) | Honeywell; Morristown, USA | Raumtemperatur im Sicherheitsschrank |

Tabelle 7: Verwendete Lösungsmittel

2.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN UND SOFTWARE

2.2.1 VERBRAUCHSMATERIALIEN

| Material | Firma; Sitz | Methode |
|----------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 1 ml Spritzen (Inject® - F) | B. Braun AG; Melsungen, Deutschland | Aufbewahrung der MM |
| Eppendorf-Cups | Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland | Aufbewahrung der präparierten MM |
| Glaspipette - Pasteur Pipetten | WU MAINZ; Bamberg, Deutschland | Lipidextraktion |
| GC Säule (HP-88; 100 m×0.25 mm×0.2 µm) | Agilent Technologies; Böblingen, Deutschland | Gaschromatographie |
| Hilic Plus Säule | Agilent Technologies; Böblingen, Deutschland | Massenspektrometrie (polare Oberphase) |
| Pipettenspitzen | Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland | Lipidextraktion |
| Polaris 3 Si-A Säule | Agilent Technologies; Böblingen, Deutschland | Massenspektrometrie (lipidhaltige Unterphase) |
| Verex™ Certified Vials 2ml Glass Amber | Phenomenex Ltd.; Aschaffenburg, Deutschland | Massenspektrometrie |
| Probengefäße Borosilikatglas 4ml | Neolab Migge GmbH, Heidelberg Deutschland | Aufbewahrung der Lipidextrakte |

Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien; Abkürzungen: MM - Muttermilch

2.2.2 SOFTWARE

| Software | Firma; Sitz | Methode |
|-----------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Agilent Chem Station | Agilent Technologies; Santa Clara, USA | Programmierung des Massenspektrometers |
| Citavi | Swiss Academic Software; Wädenswil | Zitierprogramm |
| File Maker Pro 13 | FileMaker; Santa Clara, USA | Erfassung der Ernährungsfragebögen |
| Microsoft Excel | Microsoft Corporation; Redmont, USA | |
| Microsoft Word | Microsoft Corporation; Redmont, USA | |
| Microsoft PowerPoint | Microsoft Corporation; Redmont, USA | |
| SPSS Statistik 24 | IBM; New York, USA | Statistische Analyse |
| XCalibur 2.0.7 (2008) | Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich, Deutschland | Integration der Peaks |

Tabelle 9: Verwendete Software

2.3 METHODEN

2.3.1 STUDIENABLAUF

Es wurde eine randomisierte, teilverblindete Studie an 24 Frühgeborenen, geboren mit einem Gestationsalter von 24+0/7 bis 31+6/7 SSW, an Tag 8-28 in die Studie eingeschlossen. Die Studie ist registriert unter NCT02509728. Die Kinder waren überwiegend enteral ernährt und wurden in vier Behandlungsarme à N=6 randomisiert. Die Behandlungen bestanden aus 30mg/kg/d Cholin in Form von 40mg Cholinchlorid, 60mg/kg/d DHA oder 30mg/kg/d Cholin + 60mg/kg/d DHA zusätzlich zur Standardernährung für jeweils 10 Tage vs. Kontrollgruppe (Standardernährung, N=6/Gruppe) (s. Tabelle 10).

Im Rahmen der Poweranalyse (Power 80%, Signifikanzniveau 0,05) sollten insgesamt n=40 Frühgeborene, in die Studie eingeschlossen werden (Maas C, Franz A, Bernhard W, Poets C 2014). Aufgrund der während der Studie publizierten Ergebnisse der australischen N3RO-Studie, die die Wirkung von Docosahexaensäure (DHA) auf die Prophylaxe der bronchopulmonalen Dysplasie (BPD) untersuchte und eine Erhöhung statt Erniedrigung der BPD bzw. Sterblichkeit durch isolierte Gabe von 60mg/kg DHA ergeben hat, wurde unsere Studie nach 24 Patienten und Patientinnen abgebrochen (Collins et al. 2017). Drei der Kinder waren Zwillingspaare und ein Kind wurde nicht gestillt, sodass 423 Muttermilchproben von insgesamt 20 Müttern gewonnen wurden.

| Gruppe | Supplementierung |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kontroll-Gruppe | Keine zusätzliche Supplementierung (N = 6) |
| Cholin Gruppe | 30mg/kg/d Cholin in Form von 40mg Cholinchlorid (N = 6) |
| DHA Gruppe | 30mg/kg/d DHA (Premneo®) (N = 1), ab Juli 2015 60mg/kg/d (N = 5) |
| DHA und Cholin Gruppe | 30mg/kg/d Cholin + 30mg/kg/d DHA (Premneo®) (N = 1) 30mg/kg/d Cholin + 60mg/kg/d ab Juli 2015 (N = 5) |

Tabelle 10: Übersicht über die vier Studiengruppen; Abkürzungen: DHA – Docosahexaensäure, N – Anzahl der Frühgeborenen mit dieser Merkmalsausprägung

Die Gabe der Supplemente erfolgte mit den Mahlzeiten zusätzlich zur Standardernährung (vorwiegend Muttermilch). Der DHA-Supplementierung diente Premneo® (Clover Corporation Limited, Sydney, Australien), eine aus Fischöl hergestellte Emulsion mit 120mg DHA/ml. Premneo® ist durch die Food

and Drug Administration (FDA) als „generally regarded as safe“ (GRAS) zertifiziert. Die Cholin-Supplementierung wurde mit einer Cholinchloridlösung (10mgCholin/ml in aqua ad inj.) aus der Apotheke der Universitätsklinik Tübingen durchgeführt. Tag 1 (d1) wurde festgelegt als der Tag, an dem eine komplette Supplementierung erfolgte. Die Studientage liefen von 14:00 Uhr des Ersten bis 13:59 Uhr des Folgetages.

Mitte Juni 2015 wurde mit der Studie begonnen. Am 21. Juli 2015, nach Behandlung je eines Frühgeborenen pro Gruppe, beschloss die Forschungsgruppe die DHA-Dosis von 30mg/kg/d auf 60mg/kg/d zu erhöhen, da die meisten DHA-Supplementierungsstudien mit mindestens 60mg/kg/d arbeiteten und diese Dosis als unbedenklich galt. Es sollte mit der Erhöhung der Dosis ausgeschlossen werden, dass die DHA-Effekte durch eine zu geringe Dosis unter dem Signifikanzniveau lagen (Katsuki und Okuda 1995; Prof. Dr. med. Axel Franz). Die Gabe von DHA erfolgte auf 3-4 Mahlzeiten verteilt, die von Cholin aufgrund seiner kurzen Plasmahalbwertszeit (Bernhard et al. 2019c) über alle (6-8) Mahlzeiten verteilt.

Die Mütter der teilnehmenden Frühgeborenen erhielten einen Fragebogen, um Ernährungsgewohnheiten, Erkrankungen, Unverträglichkeiten und Nahrungsergänzungsmittel sowie eingenommene Medikamente zu erfassen. Die Proben der Kinder wie auch die Proben der Muttermilch wurden verblindet auf Cholin, DHA und die anderen Metabolite untersucht.

2.3.2 NAHRUNGSERFASSUNG & KORRELATION MIT DEM PLASMA DER

FRÜHGEBORENEN

Mithilfe der klinikinternen Software (File Maker Pro 13) wurde die Ernährung der Frühchen mit Muttermilch, Ersatzmilch (Beba Stufe 1), weiteren Nahrungsergänzungen (Beba Fm 85, Aptamil Eiweiß+ und Duocal) und dem Studiensupplement (Premneo und Cholinchloridlösung), unter Berücksichtigung des verworfenen Magenrestes (ml/d) ermittelt. Zudem konnte aus der Software das Tagesgewicht (g) und das postnatale Alter (d) erhoben werden.

Um aus den molaren Massen (M) der Stoffe die Masse (m) zu ermitteln, wurde diese mit der Stoffmenge (n) multipliziert $m = M \times n$. Die Ergebnisse wurden, wenn nicht anders beschrieben, in Medianen und Interquartilrange angegeben. Um die Werte darzustellen und sie miteinander zu korrelieren habe ich in der Regel für Cholin und seine Metabolite die Konzentration (mg/L oder $\mu\text{mol/L}$) und für Fettsäuren die Zusammensetzung (Mol%) herangezogen. Die Begründung hierfür folgt in der Diskussion (s. 4.1.1). Außerdem wurde aus allen Proben eines Studientages (14:00-13:59) der Median ermittelt, sodass für d1-d10 ein Muttermilchtagesprofil dargestellt werden konnte. Dieses habe ich anschließend mit der Menge der pro Tag aufgenommenen Muttermilch multipliziert und durch das Körpergewicht geteilt. So habe ich die Masse einer Substanz erhalten, die ein Kind pro kg Körpergewicht an einem Tag über die Muttermilch erhalten hatte (mg/kg/d). Da die Kinder jedoch zum Teil Ersatzmilch, Nahrungsergänzungsmittel und/oder das Studiensupplement erhielten und wir bereits durch Messungen dieser Substanzen (Shunova et al. 2020) deren Zusammensetzung bestimmt haben, habe ich diese im weiteren Schritt noch individuell addiert. Somit konnte ich bestimmen wie hoch die Masse der aufgenommenen Fette (insbesondere ARA und DHA) und Cholinkomponenten (insbesondere das Gesamtcholin) über die gesamte Nahrungszufuhr war.

Um nun den Gehalt von Cholin, Betain, ARA oder DHA im Plasma der Kinder mit der über die Muttermilch bzw. über die komplette Nahrungszufuhr aufgenommenen Menge zu korrelieren habe ich die Korrelationen in drei verschiedene Gruppen aufgeteilt. Zum Einen habe ich alle Gruppen gesammelt miteinander verglichen. Zum Anderen habe ich die Plasmaproben je nach vorhergegangener Studiensupplementation bzw. ohne Supplementation aufgeteilt (s. Tabelle 11). Für die Korrelation aller Werte wurden die betreffenden Stoffe im Plasma der Blutabnahmen von Tag 0, 8 und 10 mit den Medianen der Tage 1, 7 und 9 verglichen (N = 69). Da an Tag 0 noch keine Daten zur Nahrungsaufnahme, sowie keine Muttermilchproben gesammelt wurden habe ich die Plasmaproben von Tag 0 mit den Muttermilch-/Gesamtnahrungsdaten von Tag 1 korreliert. Für die Korrelation der Fettsäuren der Werte nach DHA-Supplementation wurden die Plasmawerte von Tag 8 und 10 der Kinder mit DHA-

Supplementation mit den Medianen der Tage 7 und 9 der zugehörigen Muttermilch/Gesamtnahrung verglichen (N = 22). Gleiches erfolgte für die Korrelation der Cholinkomponenten mit den Werten der Kinder mit Cholin-Supplementation (N = 22). Für die Korrelation der Kinder ohne Supplementation wurden die Werte im Plasma an Tag 0, 8 und 10 der Kinder ohne entweder DHA- oder Cholin-Supplementation sowie an Tag 0 der Kinder mit Supplementation mit den Medianen der jeweiligen Tage (1, 7 und 9) in der zugehörigen Muttermilch/Gesamtnahrung verglichen (N = 47).

Bei den Korrelationen der Fettsäuren, wurde die Zusammensetzung dieser Fettsäuren in den Neutrallipiden (Mol%) sowie der an PC gebundenen Fettsäure (Mol% vom Gesamt-PC) im Plasma mit den durch die MM bzw. gesamten Nahrungszufuhr aufgenommenen Menge der FS (mg/kg/d) korreliert. Für die Korrelation der FS nur mit der MM habe ich lediglich die Plasmawerte mit den Muttermilchwerten korreliert in denen (noch) keine Supplementation stattgefunden hat. Da Proband oder Probandin 16 keine MM erhielt, wurde er oder sie aus der Berechnung ausgeschlossen.

| | Korrelationen mit Cholin/Betain | Korrelationen mit FS |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Alle Studiengruppen | Plasmacholin- /betainwerte ($\mu\text{mol/L}$) von d 0, 8 und 10 vs. Gesamtcholin der MM/Nahrung (mg/kg/d) von d 1, 7 und 9 in allen Gruppen (Kontrolle, Cholin, DHA, Cholin+DHA) (N = 69) | DHA/ARA-PC/NL (Mol%) von d 0, 8 und 10 vs. DHA/ARA der Nahrung (mg/kg/d) von d 1, 7 und 9 in allen Gruppen (Kontrolle, Cholin, DHA, Cholin+DHA) (N = 69) |
| Mit Supplementierung | Plasmacholin- /betainwerte ($\mu\text{mol/L}$) von d 8 und 10 vs. Gesamtcholin der MM/Nahrung (mg/kg/d) von d 7 und 9 in den Gruppen Cholin und Cholin+DHA (N = 22) | DHA/ARA-PC/NL (Mol%) von d 8 und 10 vs. DHA/ARA der Nahrung (mg/kg/d) von d 7 und 9 in den Gruppen DHA und Cholin+DHA (N = 22) |
| Ohne Supplementierung | Plasmacholin- /betainwerte ($\mu\text{mol/L}$) von d 0, 8 und 10 vs. Gesamtcholin der MM/Nahrung (mg/kg/d) von d 1, 7 und 9 in den Gruppen Kontrollgruppe und DHA + Plasmacholin- /betainwerte ($\mu\text{mol/L}$) von d 0 vs. Gesamtcholin der MM/Nahrung (mg/kg/d) von d 1 in den Gruppen Cholin und Cholin+DHA (N = 47) | DHA/ARA-PC/NL (Mol%) von d 0, 8 und 10 vs. DHA/ARA der MM/Nahrung (mg/kg/d) von d 1, 7 und 9 in den Gruppen Kontrollgruppe und Cholin + DHA/ARA-PC/NL (Mol%) von d 0 vs. DHA/ARA der MM/Nahrung (mg/kg/d) von d 1 in den Gruppen DHA und Cholin+DHA (N = 47) |

Tabelle 11: Durchgeführte Korrelationen der Cholinkomponenten und Fettsäuren, Aufteilung nach Gruppen. Abkürzungen: d – Tag; MM – Muttermilch; DHA – Docosahexaensäure; ARA – Arachidonsäure; vs. – versus; PC – Phosphatidylcholin; NL - Neutrallipide

2.3.3 STATISTISCHE AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die statistische Analyse erfolgte mit der Software SPSS®-Statistic24. Die Balkendiagramme wurden mit Excel erstellt.

Um Korrelationen zu berechnen wurde zu Beginn die Normalverteilung geprüft. Dies erfolgte, indem ich die Schiefe und Kurtosis, das Q-Q Diagramm, das Histogramm sowie den Box-Plot ausgewertet habe. Bei Unklarheit auf Normalverteilung habe ich außerdem noch den Shapiro-Wilk-Test angewendet (Mohd Razali und Wah 2011). Um die Stärke des linearen Zusammenhangs zwischen zwei Variablen zu ermitteln, wurde die Produkt-Moment-Korrelation eingesetzt. Bei Normalverteilung wurde das Signifikanzniveau nach Pearson (r) berechnet, ansonsten nach Spearman (ρ). Als signifikant wurde $p < 0,05$ festgelegt. Außerdem wurde ein Streudiagramm erstellt. Die X-Achse stellt die unabhängige Variable dar, die Y-Achse die abhängige Variable. Aus der Regressionsgeraden des Streudiagramms ergab sich R^2 .

Um zu prüfen, ob sich die Werte, abhängig von der Tageszeit, voneinander unterscheiden habe ich vier Gruppen (morgens, mittags, abends und nachts) erstellt und diese mittels „einfaktorieller ANOVA“ gegeneinander geprüft. Hierfür wurden die Werte mittels Box-Plot auf Ausweißer und anschließend auf Normalverteilung geprüft. Um die ANOVA hinreichend zu interpretieren wurde die Überprüfung der Varianzhomogenität (die Streuung der Punkte um eine Gerade) durchgeführt. Diese erfolgte mit dem Levene-Test (Levene 1960). Bei einem signifikanten Ergebnis ($p < 0,05$) müssen wir von einer Verletzung der Varianzhomogenität ausgehen. Bei Verletzung der Varianzhomogenität wurden die Ergebnisse mit dem Games-Howel post-hoc Test interpretiert. Bei Gleichheit der Varianzen ($p > 0,05$) wurde die Signifikanz unter den Gruppen mittels post Hoc Tukey Test berechnet (Timischl 2013). Die einfaktorielle ANOVA wurde außerdem mit dem F-Wert angegeben. Um den F-Wert zu bestimmen wird die Streuung zwischen den Stichprobenmittelwerten durch die Streuung innerhalb der Stichproben geteilt. Der F-Wert zeigt also an, dass zwischen den Gruppen die Mittelwerte unterschiedlich sind. Ein größerer F-Wert steht für eine stärkere Streuung (Eckey et al. 2002). Die Effektstärke wurde nach Cohan berechnet (Eta-

Quadrat). Die Effektstärke wird als Maß verwendet um zu zeigen wie groß der statistisch relevante Unterschied zwischen den Gruppen ist. Cohen bezeichnet Effektstärken zwischen 0,01 und 0,06 als kleinen Effekt, zwischen 0,06 und 0,14 als mittleren Effekt und über 0,14 als großen Effekt (Cohen 1988).

Zur statistischen Planung und Auswertung habe ich Hilfe vom Institut für klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen erhalten.

2.3.4 ASSERVIERUNG

Während der Studiendauer (d0-10) wurden Muttermilch (MM)-Proben gewonnen. Hierzu wurde ein Aliquot der zuvor homogenisierten MM in 1ml Spritzen aufgezogen. An d0 und d7 wurde von jeder Portion Muttermilch, mit der an diesen Tagen die Frühgeborenen ernährt wurden, eine Probe asserviert (je 1,5ml in einem Eppendorf®Cup). An den weiteren Tagen wurde einmal täglich eine der Muttermilchproben asserviert. So war es möglich an d0 und d7 ein Tagesprofil und von d0-d10 ein Verlaufsprofil zu erstellen.

Vor Versuchsbeginn (d0), 48h vor Versuchsende (d8) und an d10 wurde den Kindern Blut entnommen. Zu d7,5 wurde den Kindern einmalig 3,6mg/kg D9-Cholinchlorid per os (anstatt von nativem Cholinchlorid) gegeben, so dass die folgenden Blutentnahmen 12h und 60h nach der D9-Cholingabe stattfanden. Die Blutentnahmen für die Studie erfolgten zeitgleich zu klinisch indizierten Blutentnahmen, sodass für die Studie kein zusätzlicher Nadelstich erfolgte. Die Untersuchungen am Plasma der Frühgeborenen wurden nicht als Teil dieser Doktorarbeit durchgeführt.

2.3.5 PROBENLAGERUNG

Die Muttermilchproben wurden im Kühlschrank (+4°C) der neonatologischen Intensivstation gelagert und nach spätestens zwei Tagen bei -30°C eingefroren. Von dort wurden sie gefroren ins Labor transportiert, wo ich sie bei -80°C lagerte oder direkt verarbeitete.

2.3.6 AUFARBEITUNG DER MUTTERMILCH - LIPIDEXTRAKTION NACH BLIGH & DYER

Die MM-Proben wurden zur Extraktion der wasser- und lipidlöslichen Komponenten nach dem Verfahren von Bligh & Dyer (Bligh und Dyer 1959) mit Chloroform und Methanol extrahiert. Das Verfahren basiert auf der Herstellung eines ternären Gemisches mit Chloroform und einem Überschuss Methanol, in dem alle Zielanalyte gelöst sind. Anschließend wird durch Zugabe von Wasser und Chloroform eine Phasentrennung induziert, sodass die wasserlöslichen (Cholin-)Komponenten in der oberen Wasser-Methanol-Phase gelöst sind, während alle Lipide sich in der chloroformhaltigen Unterphase befinden. Ergänzt wurde das Verfahren durch die Zugabe von Deuterium-markiertem Cholin (D₄-Cholinchlorid) als internem Standard zur Quantifizierung von Cholin und seinen wasserlöslichen Derivaten (Bernhard et al. 2019c). Die Lipidstandards (siehe unten) wurden nach der Extraktion zugegeben, da sie mit der Fettsäurebestimmung interferiert hätten. Die verwendeten Extraktionsgefäße bestanden aus Glas und wurden zur Entfernung von Spülmittelresten und Weichmachern mit Methanol vorgereinigt.

2.3.6.1 HERSTELLUNG DER D₄-CHOLIN-STANDARDLÖSUNG

Zur Herstellung der Stammlösung des D₄-Cholinstandards für die wasserlöslichen Metabolite wurden 15mg D₄-Cholinchlorid in 17,85ml reinem Wasser (Aqua bidest.) gelöst, sodass eine 3,75mMol/L Stammlösung entstand. Diese wurde im Kühlschrank gelagert. Von dieser Lösung wurde, vor der Probenaufarbeitung 200µl abpipettiert und mit 4800µl Aqua bidest. verdünnt (150µMol/L D₄-Cholin-Gebrauchslösung als interner Standard).

| Schritt | Verfahren |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. | 15mg D ₄ -Cholinchlorid + 27,85mL aqua bidest. → 3,75mmolare D ₄ -Cholinchlorid-Stammlösung |
| 2. | 200 µl D ₄ -Cholinchlorid-Stammlösung + 4800µl H ₂ O → 150µmolare D ₄ -Cholin-Standard-Gebrauchslösung |
| 3. | 100µl D ₄ -Cholin-Standard-Gebrauchslösung (150µmolar) + 5µl BHT-Lösung (20mg/ml) + 100µL Probe + 600µL Aqua bidest. |
| 4. | Mischen |
| 5. | + 2400µl Methanol + 800µL Chloroform |
| 6. | Mischen |
| 7. | 1h im Kühlschrank ruhen |
| 8. | Mischen |

| | |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 9. | + 2400µl Chloroform + 1600µl Aqua bidest. |
| 10. | Mischen |
| 11. | Zentrifugieren (3000xg, 20min) |
| 12. | Oberphase in 4ml Vial überführen Unterphase entnehmen und mit Chloroform:Methanol (2:1) auf 4ml auffüllen |

Tabelle 12: Lipidextraktion der Muttermilch

2.3.6.2 DURCHFÜHRUNG DER EXTRAKTION

Es wurden 5µl BHT-Lösung (20mg/ml Ethanol) als Antioxidans sowie 100µl D4-Cholin Standardgebrauchslösung (150µmol/L) in ein mit Schraubdeckel verschließbares 10-ML-Glasröhrchen pipettiert. Anschließend wurden 100µl Probe (Milch) und 600µl Aqua bidest. hinzu pipettiert. Die Lösung wurde daraufhin mit dem Rüttler für 30 sec. homogenisiert und anschließend mit 2400µl Methanol und 800µl Chloroform aufgefüllt und erneut homogenisiert, um das ternäre Gemisch herzustellen. Nach einer Stunde im Kühlschrank (4°C) und anschließender Homogenisierung wurde zur Phasentrennung nochmals Chloroform (2400µl) und Aqua bidest (1600µl) hinzu pipettiert und wieder homogenisiert, um eine Phasentrennung zwischen Chloroformphase (höhere Dichte, mit Lipiden) und Aqua bidest. /Methanol-Phase (mit wasserlöslichen Metaboliten) herzustellen. Die Phasen wurden durch Zentrifugation (20min bei 3000xg, Raumtemperatur) getrennt.

2.3.6.3 EXTRAKTAUFBEWAHRUNG

Die für unsere Untersuchung irrelevanten Proteine befanden sich zwischen den Phasen. Die Lipid-Unterphase wurde komplett in ein 4ml-Vial überführt und mit Chloroform:Methanol (2+1) auf 4ml aufgefüllt. Die Oberphase wurde ebenfalls in ein 4ml-Vial gefüllt. Die Extrakte wurden bei -80°C bis zur Analyse aufbewahrt.

2.3.7 MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE

2.3.7.1 ALLGEMEIN

Mittels Massenspektrometrie können ionisierbare Moleküle einer verdampfbaren Lösung quantifiziert werden, so dass Konzentrationen dieser Stoffe und die Zusammensetzung von Proben oder ihren Extrakten bestimmbar sind. Die Auftrennung der Moleküle geschieht in einem rotierenden elektrischen Feld, so dass nur ionisierbare Stoffe bestimmt werden können. Vorteilhaft ist für diese Studie, dass alle Zielanalyte nur einfach ionisierbar (+H⁺) bzw. einfach positiv

geladen ist. Dadurch sind Masse/Ladung (m/z) eindeutig, z. B. $m/z=+104,17$ für Cholin. Zur höheren Präzision, weil es viele Moleküle mit gleichen m/z -Werten gibt, wird in der Tandem-Massenspektrometrie der ionisierte Zielanalyt fragmentiert. Die Quantifizierung erfolgt über ein charakteristisches („diagnostisches“) Fragment, z.B. $m/z=+104 \rightarrow +60$ für Cholin, nicht aber für die meisten anderen Stoffe mit $m/z=+104$. Um die Eindeutigkeit weiter sicherzustellen, werden die Zielanalyte chromatographisch getrennt. Damit kann z.B. Dimethylglycin ($m/z = +104 \rightarrow +59$ und $+60$) vom Cholin getrennt werden.

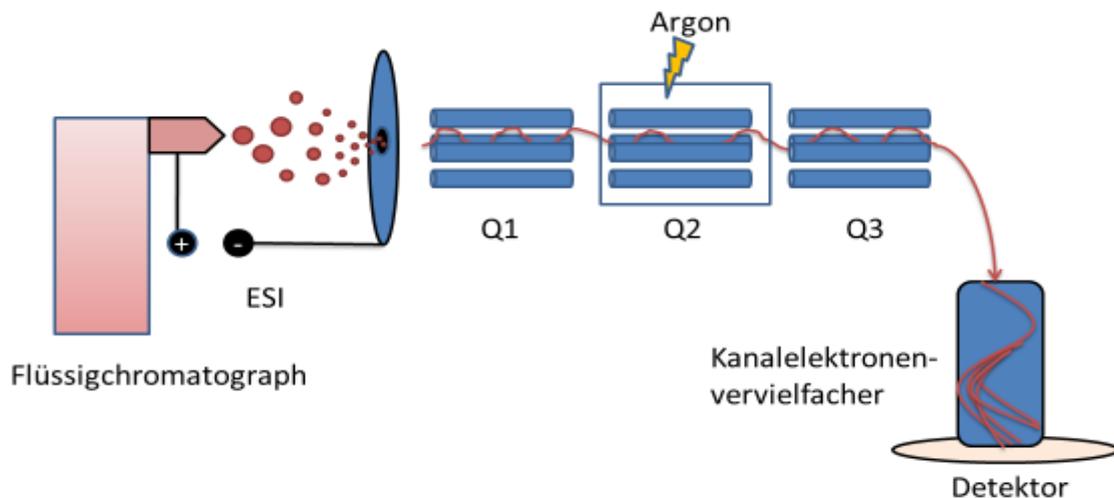


Abbildung 10: Flüssigchromatographie-gekoppeltes Triplequadrupol-Tandemmassenspektrometer mit Elektrosprayionisations-Interface (LC-ESI-MS/MS)

Das Massenspektrometer besteht aus einem Einlasser, dem meist ein Flüssigchromatograph vorgeschaltet ist, einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor (Budzikiewicz und Schäfer 2013).

Das Zusammenschalten eines Flüssigkeitschromatographen mit einem Massenspektrometer ermöglicht eine genauere Bestimmung der Stoffe, da zu jedem Peak des Chromatogramms ein Massenspektrum zugehörig ist (Zhou et al. 2012). Der Flüssigkeitschromatograph trennt Stoffe aufgrund ihrer Löslichkeit und Polarität mittels einer mobilen Phase (Laufmittel), die das applizierte Stoffgemisch (Probe) sequenziell von der stationären Phase (Säulenmatrix-hier Silica-Säule zur Trennung der Lipide) eluiert (Zhou et al. 2012).

Als Ionenquelle wurde die schonende Elektrospray-Ionisation (ESI) genutzt, bei der die zu untersuchende Lösung durch eine Kapillare fließt, an deren Ende eine positive oder negative Spannung liegt. Die Analyte werden bei ESI nur ionisiert,

nicht aber gespalten. Je nachdem, wie das elektrische Feld angelegt wird, entstehen positive oder negative Ionen. Wasser ist die Quelle der Protonen für die hier benutzte positive Ionisierung, sodass zuvor ungeladene Komponenten einen Massenzuwachs um 1Da erfahren. Die Ionisierung führt dazu, dass die Teilchen einander abstoßen und über immer kleiner werdende geladene Tröpfchen zu einem Gas aus geladenen Teilchen werden. Das Verdampfen des Lösungsmittels wird durch die angelegte Temperatur gewährleistet. Über die sog. Transferkapillare wird das Gas ins innere Vakuum gesogen (Budzikiewicz und Schäfer 2013). Nun laufen die Teilchen durch den Analysator, in diesem Fall einem Triple-Quadrupol Analysator (Thermo TSQ Quantum Discovery Max).

Die Teilchen fliegen im Hochvakuum (10^{-3} - 10^{-7} mbar) durch 3 Quadrupole, bestehend aus vier Stabelektroden, auf denen eine rotierende Wechselspannung liegt. Die Quadrupole 1 (Q1) und 3 (Q3) selektieren die Teilchen mittels ihrer Masse und Ladung. Nur die Teilchen, die in der Frequenz der Wechselspannung schwingen können, passieren die Analysatoren. Durch verschieden angelegte Wechselspannungen können unterschiedliche Teilchen gemessen werden. So werden die Teilchen in Q1 selektiert. In dem 2. Quadrupol werden sie mit Argon als Kollisionsgas fragmentiert. Dabei entstehen typische, „diagnostische“ (s.o.) Fragmente der Moleküle die wiederum in Q3 gemessen werden (Budzikiewicz und Schäfer 2013). Für diese Arbeit wurden zwei verschiedene Untersuchungsverfahren genutzt. Beim „selected reaction monitoring“ (SRM) werden für den ersten und zweiten Quadrupol jeweils Massen festgelegt, sodass nur spezifische Ionen (Q1) bzw. Fragmente dieser Ionen (Q3) passieren können (Zhi et al. 2011). Zum anderen sind im „neutral loss scan“ die Quadrupole so festgelegt, dass Q3 einen spezifischen Massenverlust eines geladenen Moleküls aus Q1 misst. Somit misst der neutral loss scan alle Moleküle, die bei der Fragmentation das gleiche ungeladene Fragment verlieren (Louris et al. 1985). Das „neutral loss scan“ verfahren wurde für die Messung der Phosphatidylethanolamin-Komponenten verwendet.

Die Ionen werden anschließend durch einen Kanalelektronenvervielfacher detektiert. Der Kanal besteht aus einem speziellen halbleitenden Glas. Das Ion,

welches in den Kanal einfällt und an die Glaswand stößt, emittiert dadurch sogenannte sekundäre Elektronen. Diese werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt, stoßen ebenfalls an die Glaswand und emittieren weitere Elektronen. Mit der Vervielfachung dieser Elektronen lässt sich zum Schluss eine induzierte Stromstärke messen. Aus dieser Information entsteht das Massenspektrogramm (Mahaffy 2013).

2.3.7.2 ANALYSE DER WASSERLÖSLICHEN CHOLIN-METABOLITE

PROBENAUFBEREITUNG

Für die Messung von Cholin, seinen wasserlöslichen Cholinderivaten (freies Cholin, Phosphocholin, Glycerophosphocholin, Phosphatidylcholin, Lyso-Phosphatidylcholin und Sphingomyelin) und D₄-Cholin als internem Standard wurde ein Aliquot der H₂O-Methanol (MeOH)-Oberphase 1:21 mit einer 20%igen wässrigen Acetonitril-Lösung verdünnt. Hiervon wurden 20µL über den Probenaufgeber (Finnigan Surveyor Autosampler Plus®) auf die Trennsäule (Hilic Plus®, Agilent Technologies; Böblingen, Deutschland) injiziert. Die Trennung erfolgte bei 600µl/min und 40°C mittels eines Gradienten aus Laufmittel A (90% Acetonitril, 0,1% Ameisensäure) und B (50% Acetonitril, 0,1% Ameisensäure). Das Gradientenprofil ist in Abbildung 11 dargestellt.

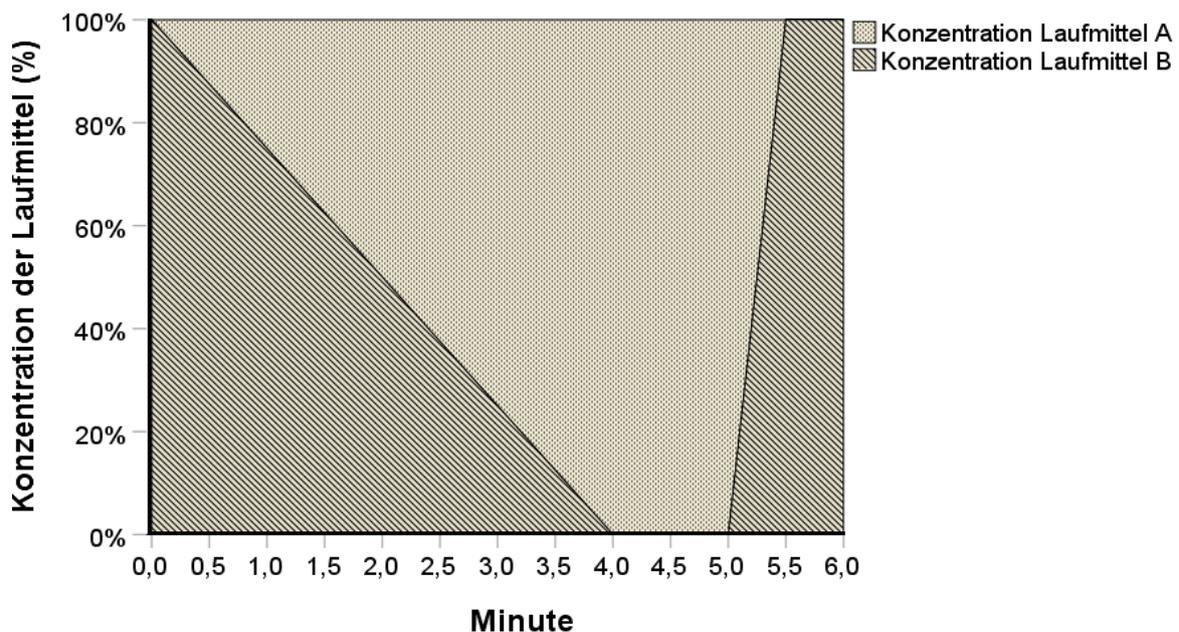


Abbildung 11: Gradientenprofil zur Messung der wässrigen Cholin Metabolite. Dargestellt ist die Konzentration (in %) der Laufmittel A (90% Acetonitril, 0,1% Ameisensäure) und B (50% Acetonitril, 0,1% Ameisensäure) gegenüber der Zeit in Minuten.

ANALYSE

| Cholin und Cholin-Metaboliten | Retentionszeit (min) |
|-------------------------------|----------------------|
| Methionin | 1,3 |
| TMAO | 1,7 |
| Carnitin | 2,15 |
| Cholin | 2,3 |
| Dimethylglycin | 3,0 |
| Betain | 3,2 |
| Glycerophosphocholin | 4,25 |
| Phosphocholin | 4,5 |
| CDP-Cholin | 4,9 |

Tabelle 13: Retentionszeiten der wasserlöslichen Zielanalyte

Die polare Extrakt-Oberphase diente der Analyse von Cholin, Phosphocholin, Glycerophosphocholin, sowie Trimethylaminoxid, Betain, Dimethylglycin, Methionin und Carnitin (s. Tabelle 13). Die einzelnen Komponenten wurden in positiver Ionisation im SRM-Untersuchungsverfahren ermittelt. Die Originaldaten (TICs) wurden in eine Excel-Tabelle überführt und dann in ein Makro übertragen, in dem sie ausgewertet wurden. Konzentrationen wurden über die „total ion counts“ (TICs) im Verhältnis zu denen des internen Standard und externen Kalibrationskurven bestimmt (Bernhard et al. 2015).

2.3.7.3 ANALYSE DER LIPIDHALTIGEN UNTERPHASE

PROBENAUFBEREITUNG

| Schritt | Verfahren |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. | 500µM PC20:0/20:0 + 200µM PC14:0/14:0 + 50 µM PG14:0/14:0 + 50µM SPH17:0 + 50µM Ceramide17:0 + 50µM LysoPC13:0 + 50µM LysoPC19:0 (in Trifluoroethanol gelöst) → 1:400 verdünnt → 1,25µM Standard |
| 2. | 60ml Chloroform + 38ml Methanol + 2ml Ammoniumacetat (300-milimolar) → Laufmittel |
| 3. | 100µl Extrakt der Unterphase + 750µl Laufmittel +25µl Standard → Zu messende Lösung |

Tabelle 14: Erstellen des Probengemisches für die Messung mit einem Flüssigkeitschromatographen gekoppelten Massenspektrometer

Zum Messen der Lipide in den Proben mittels ESI-MS/MS wurden 100µl Extrakt-Unterphase mit 750µl mobiler Phase (s.u.) und 25µl Standard-Lösung in ein 2ml-Probengefäß pipettiert (s. Tabelle 14). Hiervon wurden 25µl auf die Trennsäule aufgetragen. Die Trennung der Lipidklassen geschah isokratisch mittels einer Silica-Säule (Polaris 3 Si-A® - Agilent Technologies) bei 40°C. Als mobile Phase diente ein Gemisch aus Chloroform, Methanol und Ammoniumacetat (s. Tabelle

14). Die Flussraten sind zur Optimierung der Peakbreiten variabel und in Tabelle 15 dargestellt.

| min | µl/min | Peak Lipidname |
|------|--------|----------------|
| 0.00 | 250 | |
| 0.49 | 250 | |
| 0.50 | 500 | |
| 0,90 | 500 | Ceramide |
| 1,1 | 500 | PE |
| 1,3 | 500 | Lyso-PE |
| 2,4 | 500 | PC |
| 3,0 | 500 | SM |
| 4,5 | 500 | Lyso-PC |
| 5.99 | 500 | |
| 6.00 | 700 | |
| 7.99 | 700 | |
| 8.00 | 250 | |

Tabelle 15: Flussrate (µl/min) und zugehörige Retentionszeit der im ESI-MS/MS gemessenen Lipide.
Abkürzungen: PE = Phosphatidylethanolamin; PC = Phosphatidylcholin; SM = Sphingomyelin

ANALYSE

Die Lipide der apolaren Extrakt-Unterphase wurden in die Lipidklassen PC, PE, SM, Lyso-PC und Ceramid (CER) aufgetrennt. PC, SM, CER und Lyso-PCs wurden bei positiver Ionisation im SRM-Modus gemessen, PE-Komponenten hingegen über ihre „neutral loss fragments“ (Bernhard et al. 2014).

ISOTOPE UND ISOTOPENKORREKTUR

Isotope haben unterschiedlich viele Neutronen im Kern. Es überwiegt ein stabiles Hauptisotop. Andere Isotope haben eine höhere Neutronenzahl und sind daher schwerer. Das Isotop ^{12}C macht 98,9% des Kohlenstoffs aus. ^{13}C ist ein weiteres stabiles Isotop des Kohlenstoffs (Laeter et al. 1991). Alle Verbindungen haben eine von der Anzahl der Kohlenstoffatome unterschiedliche hohen Anteil an ^{13}C , und damit an höheren Massen (M+1, M+2, M+3 usw.). Im SRM-Modus wird ein m/z -Wert bestimmt, welcher die Häufigkeit der Moleküle mit ^{13}C angibt. Somit müssen die entstandenen TICs um ^{13}C in Abhängigkeit ihrer Kohlenstoffatome korrigiert werden (corrected TICs) (Fernandez et al. 1996). Die molaren Konzentrationen der Stoffe in Probenlösungen werden mit Hilfe interner Standards berechnet. Außerdem wird die Zusammensetzung der Stoffe in Mol% berechnet.

2.3.8 GASCHROMATOGRAPHISCHE ANALYSE

2.3.8.1 ALLGEMEIN

Mittels Gaschromatographie wurden die Fettsäuren, unter anderem Arachidonsäure und Docosahexaensäure, untersucht. Für diese Arbeit wurde mit dem Gaschromatographen Agilent 7820A (Agilent Technologies; Santa Clara, USA) gearbeitet. Ein Gaschromatograph (GC) ist aus drei Teilen zusammengesetzt. Einem Injektor, einer Trennsäule und einem Detektor.

In dem Injektor (Agilent 7693A Automatic Liquid Sampler, Santa Clara, USA) wird die Probe mittels Autosampler aufgezogen, verdampft und mit einem Trägergas (Helium) bei einer Laufrate von 3ml/min vermischt. Dieses Gemisch wird auf die Trennsäule (HP-88; 100m x 0,25mm y 0,2µm) übertragen. Da diese einen sehr kleinen Durchmesser und nur eine Probenmenge von 0,01µL benötigt, wird die Probe nur teilweise unter Benutzung eines Splitters aufgetragen. Das bedeutet, dass von der verdampften Substanz nicht alles auf die Säule gerät, sondern ein Teil durch das Splitventil wieder abgelassen werden kann. Ich habe mit einem Splitverhältnis von 1:2 gearbeitet.

In dieser Arbeit wurde eine Trennsäule verwendet, die innen mit einer stationären Phase (in diesem Fall (88 %-Cyanopropyl)-aryl-polysiloxan) beschichtet ist und sich in einem Säulenofen befindet. An die stationäre Phase bindet das Probengemisch bei zunächst 130 °C. Durch Temperaturerhöhung (s. Tabelle 17) verdampfen die Stoffe hintereinander an ihren charakteristischen Siedepunkten und werden dadurch sequenziell eluiert. Die Temperatur des Injektors lag bei 250°C, die des Detektors bei 280°C. Durch das Trägergas (Helium) werden die verdampften Stoffe mitgetragen und gelangen in den Detektor.

Der Flammenionisationsdetektor, der für diese Arbeit genutzt worden ist, misst die Ionen, die bei der Verbrennung der Substanzen mit C-C oder C-H Bindungen im Gas entstehen. Die Messung ist demzufolge Abhängig von der Masse der zu detektierenden Substanz (Gaschromatographie, GC 2017).

PROBENAUFBEREITUNG

| Schritt | Verfahren |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | Interner Standard (IST) = n-3-Docosatriensäure in Toluol:Methanol (3+1) (10mg/ml), auf Raumtemperatur aufgewärmt |
| 1. | 2ml IST + 200µl Acetylchlorid + 100µl Milchextrakt |
| 2. | Inkubieren: 60min, 100°C, Speed 8 |
| 3. | Abkühlen |
| 4. | + 5ml 6%ige Kaliumcarbonatlösung |
| 5. | 2 Minuten Schütteln |
| 6. | Zentrifugieren: 10 min 4000U/min 25°C |
| 7. | Oberphase abpipettieren und verdampfen lassen |
| 8. | Trockensubstanz + 100µl Toluol:Methanol |
| 9. | Mischen |
| 10. | Überführung in ein 2ml Vial |

Tabelle 16: Fettsäureveresterung für GC-Analytik

2.3.8.2 FETTSÄUREDERIVATISIERUNG

Damit die Fettsäuren flüchtig sind, werden sie zu Methylestern derivatisiert. Zur Quantifizierung wurde ein in Toluol und Methanol (3+1) gelöster interner Standard aus cis13,16,19-Docosatriensäure (Docosatrien-n-3) 10mg/ml verwendet. Von diesem wurden unter dem Abzug 2ml mit 100µl Milchextrakt und 200µl Acetylchlorid als Reaktanz für die Bildung der Methylester in ein 12ml-Pyextröhrchen® pipettiert und ein Rührfischchen zugegeben. Daraufhin wurde die Lösung eine Stunde bei 100°C auf einer Heizplatte mit Magnetrührer (Reacti-Therm III Heating/Stirring module) bei einer Rührgeschwindigkeitsstufe von 8 erhitzt. Nach Abkühlen wurden der Lösung 5ml 6%ige Kaliumcarbonatlösung (30g auf 500ml aufgelöst) zugefügt, geschüttelt und 10 Minuten bei 4000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Die Fettsäuremethylester-haltige Oberphase, die eine geringere Dichte aufweist als das Methanol/Toluol Gemisch, wurde anschließend vollständig in Glasröhrchen abpipettiert und eingedampft. Um die kurzkettigen Fettsäuren zu schützen wurde beim Vorgang des Eindampfens darauf geachtet, dass exakt der Zeitpunkt gewählt wird, an dem die Flüssigkeit nur nahezu verdampft ist. Dann wurde die Probe mit 100µl Toluol:Methanol (3+1) gelöst und in den Microglaseinsatz eines 2ml Probengefäße, gegeben. Dieses wurde anschließend mit einer Crimp-Zange verschlossen.

ANALYSE

| Zeit (min) | Temperatur (°C) |
|------------|-----------------|
| 1 | 130 |
| 26 | 176 |
| 37 | 186 |
| 58 | 190 |
| 92 | 220 |

Tabelle 17: Temperaturanstieg abhängig von der Zeit in der Gaschromatographie-Methode. Zur Messung der Fettsäuren mittels Gaschromatographie wurde das Probengemisch in der Trennsäule sequenziell erhitzt, sodass die Stoffe an ihren charakteristischen Siedepunkten verdampfen.

| Referenzfettsäuren (Bestimmung als Fettsäuremethylester) | Chemische Nomenklatur | Retentionszeit | Retentionsfaktor (Rf) |
|----------------------------------------------------------------|--------------------------|----------------|--------------------------|
| Laurinsäure | C12:0 | 11,136 | 0,204 |
| Myristinsäure | C14:0 | 15,406 | 0,281 |
| Palmitinsäure | C16:0 | 20,635 | 0,376 |
| Palmitoleinsäure | C16:1n-7 | 22,222 | 0,404 |
| Stearinsäure | C18:0 | 26,457 | 0,480 |
| Ölsäure | C18:1n-9 | 28,082 | 0,510 |
| Linolsäure | C18:2n-6 | 30,821 | 0,560 |
| γ-Linolensäure | C18:3n-6 | 32,855 | 0,596 |
| Arachinsäure | C20:0 | 33,397 | 0,604 |
| α-Linolensäure | C18:3n-3 | 34,281 | 0,622 |
| Eicosatriensäure | C20:3n-6 | 41,019 | 0,745 |
| Behensäure | C22:0 | 41,791 | 0,763 |
| Arachidonsäure | C20:4n-6 | 42,997 | 0,782 |
| Eicosapentaensäure | C20:5n-3 | 48,322 | 0,879 |
| Docosatriensäure | C22:3n-3 | 54,971 | 1,0 |
| Docosatetraensäure | C22:4n-6 | 55,647 | 1,014 |
| Docosapentaensäure | C22:5n-6 | 58,255 | 1,060 |
| Docosapentaensäure | C22:5n-3 | 62,703 | 1,140 |
| Docosahexaensäure | C22:6n-3 | 65,291 | 1,185 |

Tabelle 18: Referenzfettsäuren und ihre Charakteristika - GC Analyse. Dargestellt sind die gemessenen Fettsäuren, ihre chemische Nomenklatur sowie die für diese GC Analyse festgelegte Retentionszeit und der Retentionsfaktor. Abkürzungen: GC – Gaschromatograph, Rf – Retentionsfaktor

Die Starttemperatur betrug 130°C, die Maximaltemperatur 250°C (s. Tabelle 17). Für die Messungen wurde ein durchgehender Fluss von 3ml/min des Trägergases Helium eingestellt. Die Trennung der Proben dauerte unter diesen Bedingungen 92 Minuten. Für jede zu messende Substanz wurde eine Retentionszeit ermittelt (s. Tabelle 18). Die Peaks wurden, anhand der Retentionszeiten relativ zu der des Standards (RF-Wert) und der typischen Steigung der Eich-/Standardwerte per Hand integriert und die Werte in ein Excel-basiertes Makro implementiert, um aus der Fläche unter den Peaks die

Konzentration zu ermitteln. Die Retentionszeiten wichen bei verschiedenen Proben zum Teil voneinander ab, jedoch war die Identifikation mit Hilfe der r_f -Werte möglich (s. Tabelle 18).

3 ERGEBNISSE

3.1 DEMOGRAPHISCHE DATEN

| | |
|-------------------------------------------------|------------------|
| Mütter, die gestillt haben (N) | 20 |
| Mütter, die nicht gestillt haben (N) | 1 |
| Frühgeborene (N) | 24 |
| Einlingsschwangerschaften (N) | 17 |
| Zwillingschwangerschaften (N) | 3 |
| Muttermilchproben (N) | 432 |
| Proben per Mutter (N) | 19 (12-24) |
| Alter der Mutter (Jahre) | 34 (24-40) |
| Postmenstruales Alter der Kinder bei Geburt (W) | 28,3 (25,7-30,8) |
| Bei Geburt zugewiesenes Geschlecht | 9w/14m |
| Geburtsgewicht (g) | 1019 (480-1630) |

Tabelle 19: Demographische Daten der Studie. Die Daten sind absolute Zahlen bzw. Mediane mit Minima und Maxima. Abkürzungen: N = Anzahl; g = Gramm; W = Wochen; w = weiblich; m = männlich

| | Kontrolle | Cholin | DHA | Cholin+ DHA | Gesamt |
|-------------------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|---------------------|
| Zahl der Probanden und Probadinnen mit MM | 6 | 6 | 6 | 5 | 23 |
| Mehrlinge | 3/6 | 0/6 | 2/6 | 1/6 | 6/24 |
| Zahl der MM Proben | 116 | 113 | 110 | 95 | 432 |
| männlich/weiblich* | 4/2 | 2/4 | 0/6 | 3/2 | 9/14 |
| Postnatales Alter bei Studienbeginn (Tag) | 15 (12-22) | 20 (16-21) | 18 (13-25) | 17 (13-20) | 17 (12-22) |
| Gewicht bei Studienbeginn (Gramm) | 1275 (937-1511) | 1110 (878-1200) | 965 (870-1165) | 1055 (795-1218) | 1275 (1013-1434) |

Tabelle 20: Demographische Daten aufgeteilt in Studiengruppen (Katrin Böckmann et al 2017). Details zu den Gruppen siehe Tabelle 10. Daten sind absolute Zahlen oder Mediane mit Minima und Maxima. * - bei Geburt männlich bzw. weiblich zugewiesen.

Insgesamt wurden 432 Bustmilchaliquota von 20 Stillenden und 72 Plasmaproben von 24 Frühgeborenen (FG; je 6 Proben aus 4 Behandlungsgruppen zu den Zeitpunkten $\leq 0d$, 7,5d und 10d nach Studienbeginn) analysiert. Drei Mütter hatten Zwillingschwangerschaften und eine Mutter (Einlingsschwangerschaft) hat Ihr Kind nicht gestillt. sodass die Muttermilch von 23 (9 bei Geburt weiblich und 14 bei Geburt männlich zugewiesenen) Frühgeborenen untersucht wurde. Diese waren im Median bei Geburt 28,34 Wochen alt. Die Kinder hatten ein medianes Geburtsgewicht von 1019g.

3.2 ZUSAMMENSETZUNG DER MUTTERMILCH

3.2.1 CHOLIN

3.2.1.1 CHOLINKOMPONENTEN

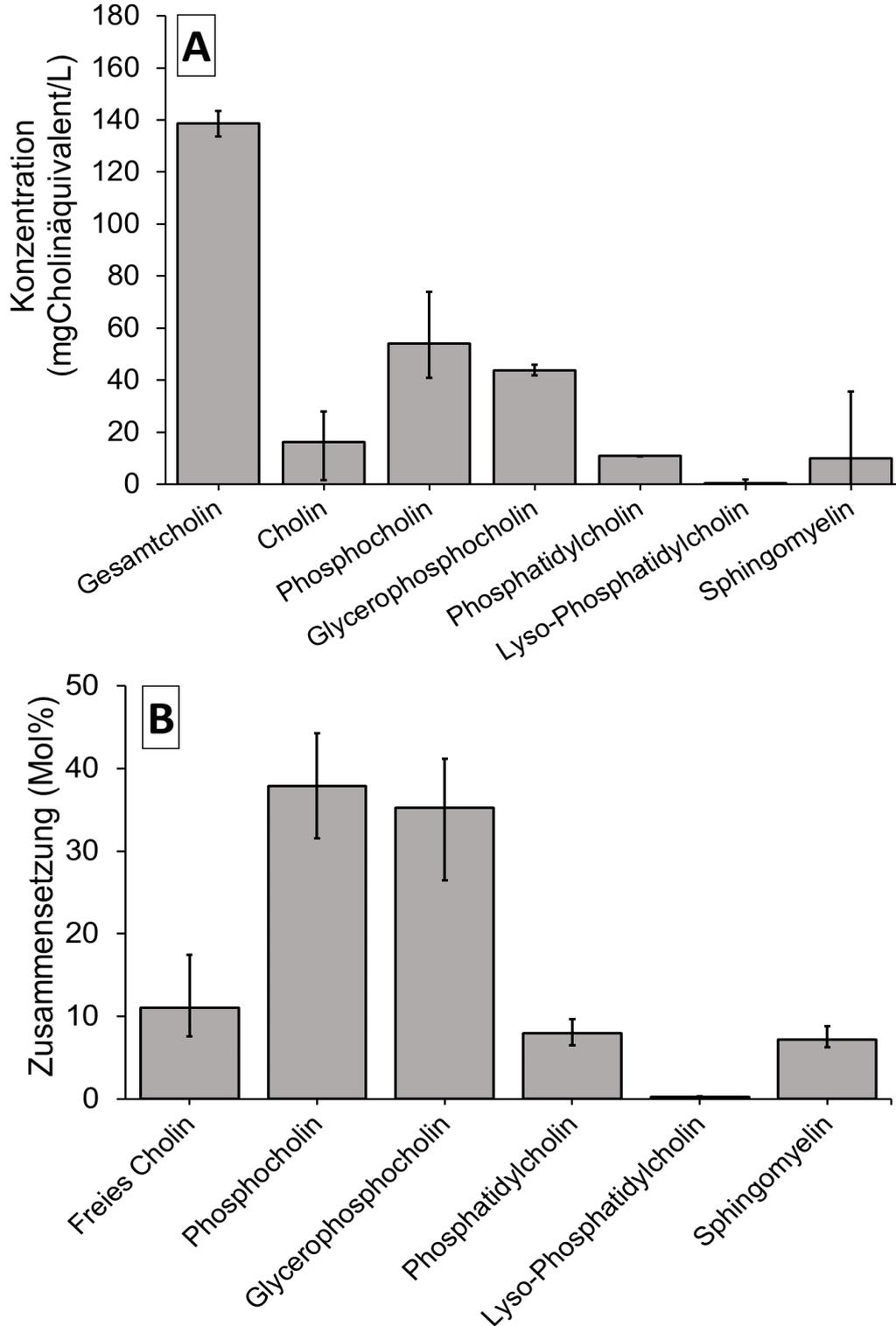


Abbildung 12 A+B: Cholinkomponenten der MM (A). Zusammensetzung der Cholinkomponenten in der MM (B). N = 432. Die MM wurde nach Bligh&Dyer (Ref. 1959) extrahiert und im ESI-MS/MS gemessen, wie im Methodenteil beschrieben (0 und 2.3.7). Daten sind Mediane sowie 25er und 75er Perzentile.

Die Zusammensetzung der Cholin-Komponenten zeigt, dass Phosphocholin und Glycerophosphocholin mit je 35-40 Mol% die am stärksten vertretenen Komponenten der Muttermilch sind (insgesamt 73,2 Mol% (58,1-85,5); Median und Interquartilenrange). Dem stehen freies Cholin, Phosphatidylcholin, (PC) Sphingomyelin (SM) und Lyso-PC als mengenmäßig untergeordnete Komponenten gegenüber.

3.2.1.2 CHOLINDERIVATE UND METHYLKOMponentEN

| | $\mu\text{mol/L}$ | mg/L | mg/150mL |
|----------------|------------------------|---------------------|-------------------|
| Gesamtcholin | 1332,5 (1082,2-1579,6) | 138,6 (112,6-164,3) | 20,8 (16,9-24,7) |
| Betain | 10 (6,6-15) | 1,2 (0,8-1,7) | 0,2 (0,1-0,3) |
| Dimethylglycin | 37 (0,2-57) | 3,8 (0,0-5,9) | 0,6 (0,0-0,9) |
| TMAO | 0,7 (0,0-2,1) | 0,1 (0,0-0,2) | 0,01 (0,0-0,02) |
| Methionin | 0,01 (0,00-0,06) | 0,001 (0,00-0,01) | 0,0 |
| Carnitin | 48 (35-67) | 7,6 (5,6-11) | 1,2 (0,9-1,6) |
| Homocystein | 3,4 (0,4-18) | 0,5 (0,1-2,4) | 0,1 (0,0-0,4) |

Tabelle 21: Konzentration von Gesamtcholin, der Cholinderivate und Methylkomponenten. Dargestellt in $\mu\text{mol/L}$, mg/L und mg/150ml . 150ml/kg/d entsprechen einer vollen enteralen Ernährung. N = 432. Die MM wurde nach Bligh&Dyer (Bligh und Dyer 1959) extrahiert und im ESI-MS/MS gemessen, wie im Methodenteil beschrieben (0 und 2.3.7). Daten sind Mediane sowie 25er und 75er Perzentile.

Einige der gemessenen Werte, vor Allem Carnitin und Dimethylglycin sind mit einem weiten Range vorhanden. Die Konzentration des Derivats des bakteriellen Cholinabbaus TMAO betrug lediglich 0,1 (0,0-0,2) mg/L .

3.2.2 FETTSÄUREN

3.2.2.1 ALLGEMEIN

| | | Mol% | | | Gew% | | | mg/L | | |
|------------------------|----------|------|------|------|------|------|------|--------|--------|--------|
| | | Med. | 1.Qu | 3.Qu | Med. | 1.Qu | 3.Qu | Median | 1.Qu | 3.Qu |
| Laurinsäure | C12:0 | 13,5 | 11,4 | 15,6 | 10,4 | 8,7 | 12,0 | 2418,8 | 1866,3 | 3020,6 |
| Myristinsäure | C14:0 | 5,6 | 4,7 | 6,4 | 4,9 | 4,2 | 5,6 | 1111,6 | 892,4 | 1365,6 |
| Palmitinsäure | C16:0 | 28,8 | 26,9 | 31,0 | 28,3 | 26,5 | 30,4 | 6770,1 | 5446,6 | 8124,1 |
| Palmitoleinsäure | C16:1n-7 | 0,9 | 0,7 | 1,1 | 0,9 | 0,7 | 1,0 | 208,4 | 150,4 | 260,0 |
| Stearinsäure | C18:0 | 5,4 | 4,9 | 6,1 | 5,9 | 5,4 | 6,7 | 1414,0 | 1176,5 | 1686,8 |
| Ölsäure | C18:1n-9 | 31,1 | 29,0 | 33,0 | 33,7 | 31,7 | 35,6 | 8119,9 | 6418,2 | 9674,3 |
| Linolsäure | C18:2n-6 | 10,4 | 9,1 | 12,1 | 11,2 | 9,8 | 12,9 | 2666,9 | 2024,2 | 3400,6 |
| γ -Linolensäure | C18:3n-6 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 30,7 | 22,3 | 39,3 |
| Arachinsäure | C20:0 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 56,8 | 45,6 | 67,4 |
| α -Linolensäure | C18:3n-3 | 0,9 | 0,7 | 1,1 | 1,0 | 0,8 | 1,2 | 226,0 | 175,1 | 292,8 |
| Eicosatriensäure | C20:3n-6 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 55,7 | 43,0 | 67,7 |
| Behensäure | C22:0 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 23,2 | 19,1 | 26,6 |
| Arachidonsäure | C20:4n-6 | 0,5 | 0,5 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,7 | 151,6 | 114,2 | 183,8 |

| | | | | | | | | | | |
|--------------------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|------|-------|
| Eicosapentaensäure | C20:5n-3 | 0,3 | 0,2 | 0,4 | 0,4 | 0,3 | 0,5 | 85,9 | 61,7 | 116,2 |
| Docosatetraensäure | C22:4n-6 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 36,7 | 26,4 | 45,0 |
| Docosapentaensäure | C22:5n-6 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 30,7 | 19,9 | 50,1 |
| Docosapentaensäure | C22:5n-3 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 26,3 | 20,7 | 33,1 |
| Docosahexaensäure | C22:6n-3 | 0,4 | 0,3 | 0,5 | 0,5 | 0,3 | 0,6 | 108,9 | 71,5 | 143,5 |

Tabelle 22: Komposition und Konzentration der Fettsäuren. N = 432. Die MM wurde nach Bligh&Dyer (Bligh und Dyer 1959) extrahiert und im ESI-MS/MS gemessen, wie im Methodenteil beschrieben (2.3.6. f). Dargestellt sind Mediane, sowie 25er und 75er Perzentile. Abkürzungen: Med.-Median; Qu - Quartil

Die Tabelle 22 stellt das Verhältnis der Fettsäuren und die Konzentration in der MM dar. Ölsäure ist die mengenmäßig vorherrschende Fettsäure der Muttermilch. Gefolgt von der Palmitinsäure und der Linolsäure. 150ml Muttermilch enthalten 22,7 (17,1-27,6) mg Arachidonsäure und 16,3 (10,7-21,5) mg Docosahexaensäure.

3.2.2.2 RELATIONEN POLYUNSATURIERTER FETTSÄUREN ZUEINANDER

| Muttermilch | Mol% |
|-------------|------------------|
| ALA:DHA | 2,7 (2,0-3,6) |
| LA:ARA | 19,3 (16,0-23,3) |
| ARA:DHA | 1,6 (1,2-1,9) |
| Plasma | Mol% |
| ALA:DHA | 1,1 (0,8-1,7) |
| LA:ARA | 5,9 (5,0-6,9) |
| ARA:DHA | 4,7 (2,5-6,6) |

Tabelle 23: Relationen polyunsaturierter Fettsäuren in den Neutrallipiden von MM und Plasma zueinander. Daten sind Mediane sowie 25er und 75er Perzentile der Muttermilchproben (N=432) und Plasmaproben der Frühgeborenen (N=72). Abkürzungen: ALA = α -Linolensäure; DHA = Docosahexaensäure; LA = Linolsäure; ARA = Arachidonsäure.

Das Verhältnis von LA:ARA ist größer als das von ALA:DHA, sowohl in der Muttermilch als auch im Plasma. Das Verhältnis von ARA:DHA ist im Plasma der Frühgeborenen höher als in der MM.

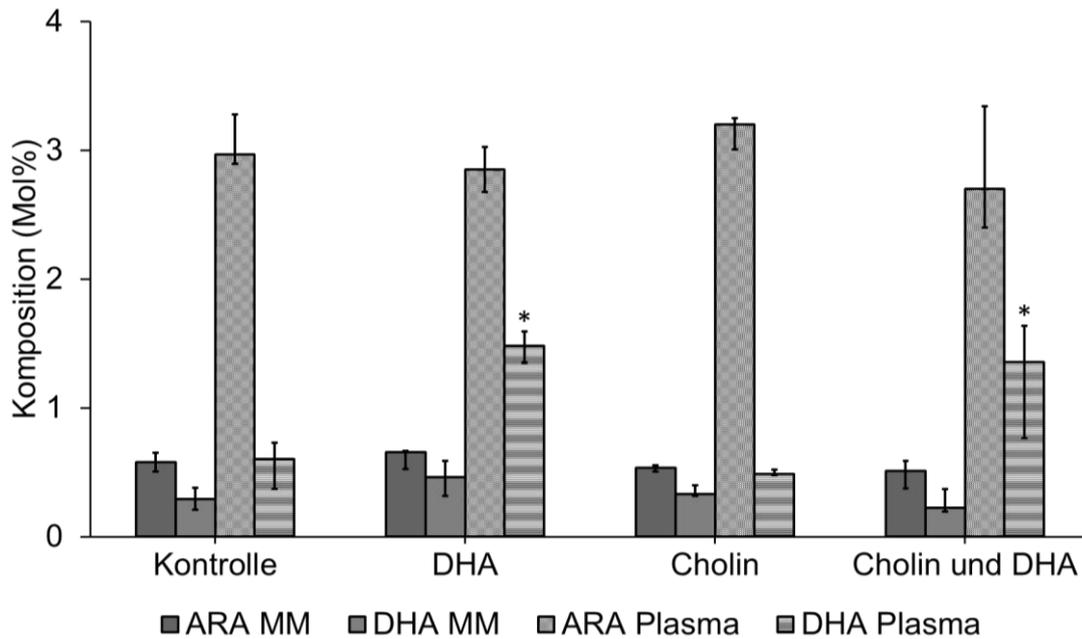


Abbildung 13: ARA und DHA in MM und Plasma am Ende der Supplementierung. Kontrolle MM N = 116; Kontrolle Plasma N = 6; DHA MM N = 110; DHA Plasma N = 6; Cholin MM N = 113; Cholin Plasma N = 6; Cholin und DHA MM N = 95; Cholin und DHA Plasma N = 5. Daten sind Mediane sowie 25er und 75er Perzentile. Symbole und Abkürzungen: ARA = Arachidonsäure; DHA = Docosahexaensäure; MM = Muttermilch; Signifikanzniveaus: *, $p < 0,05$

Abbildung 13 zeigt die Fraktionen von ARA und DHA in Mol % in den Neutrallipiden von Muttermilch und Plasma der Studiengruppen. Hier wird deutlich, dass sich die Zusammensetzung der Muttermilch zwischen den Gruppen nicht unterscheidet, dass jedoch die Supplementierung mit DHA ihren Anteil in den Neutrallipiden des Plasmas mehr als verdoppelt.

3.2.3 INTER- UND INTRAINDIVIDUELLE SCHWANKUNGEN

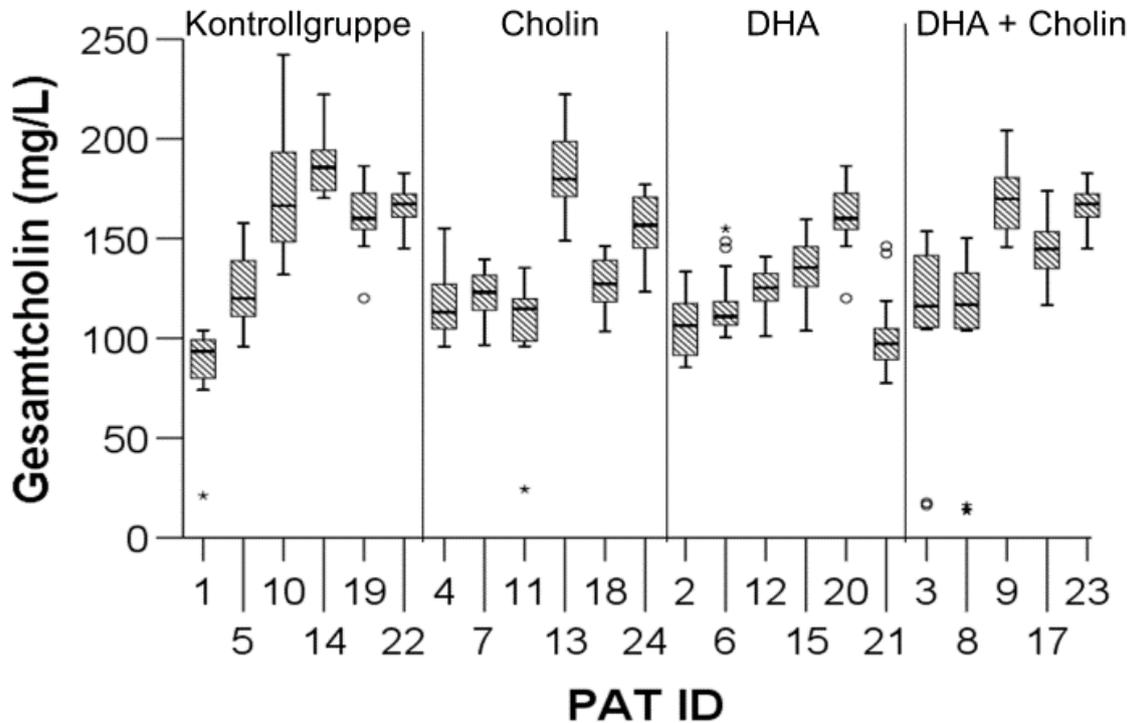
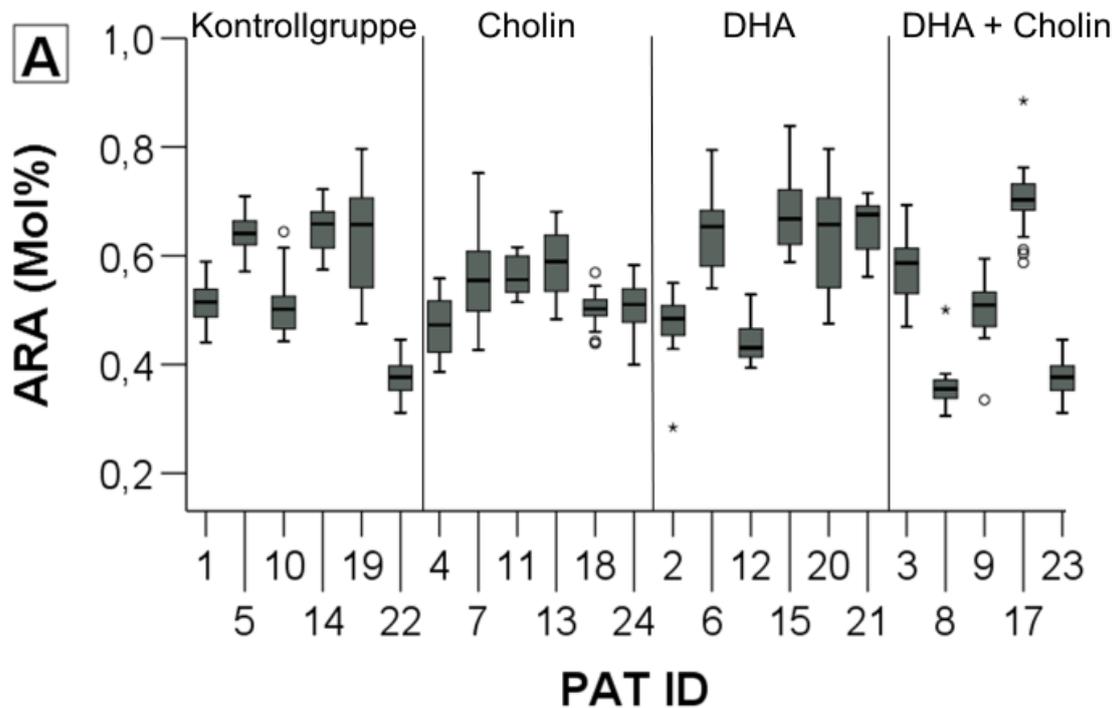


Abbildung 14: Inter- und intraindividuelle Ranges von Gesamtcholin in mg/L in der MM. Die Daten sind dargestellt als Boxplots und aufgeteilt in die Individuen der einzelnen Versuchsgruppen. Pat. 19+20 sowie 22+23 sind Zwillinge und haben daher die gleiche Muttermilch erhalten. Diese wurde hier, zur besseren Übersichtlichkeit der einzelnen Gruppen einzeln dargestellt. Abkürzungen und Symbole: ARA = Arachidonsäure; DHA = Docosahexaensäure; mg/L = Milligramm pro Liter; PAT ID = Patienten und Patientinnen Identifikation; O = Ausreißer; * = Extremwert.



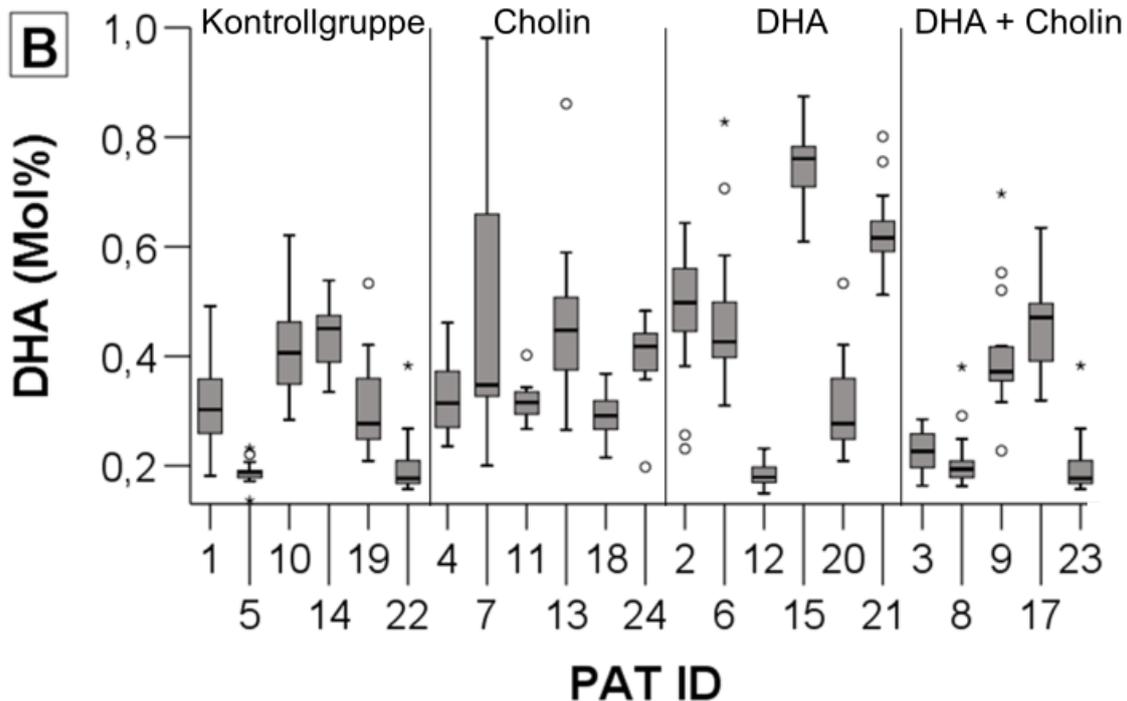


Abbildung 15 A+B: Inter- und intraindividuelle Ranges von ARA (A) und DHA (B) in Mol% in der MM. Dargestellt als Boxplots. Aufgeteilt in die einzelnen Versuchsgruppen. Pat. 19+20 sowie 22+23 sind Zwillinge und haben daher die gleiche Muttermilch erhalten. Diese wurde hier, zur besseren Übersichtlichkeit der einzelnen Gruppen, einzeln dargestellt. Abkürzungen und Symbole: ARA = Arachidonsäure; DHA = Docosahexaensäure; PAT ID = Patienten und Patientinnen Identifikation; O = Ausreißer; * = Extremwert.

Die untersuchten Muttermilchproben unterliegen in Ihrer Zusammensetzung hohen intra- und interindividuellen Schwankungen. Dargestellt sind diese für das Gesamtcholin (mg/L) sowie für ARA (Mol%) und DHA (Mol%). Auch andere Fettsäuren wie Beispielsweise die Linol- und Myristinsäure (s. Anhang 3 A+B) zeigen starke intra- wie auch interindividuelle Unterschiede. Ölsäure hingegen (s. Anhang 3C) stellt sich normalverteilt und mit weitaus geringeren Schwankungen dar. Die Werte weisen einen hohen interquartilen Range auf. Zudem sind die Werte zwischen den Müttern sehr unterschiedlich, was eine hohe interindividuelle Variabilität widerspiegelt.

3.2.4 TAGESPROFILE VON CHOLIN, ARACHIDONSÄURE UND

DOCOSAHEXAENSÄURE

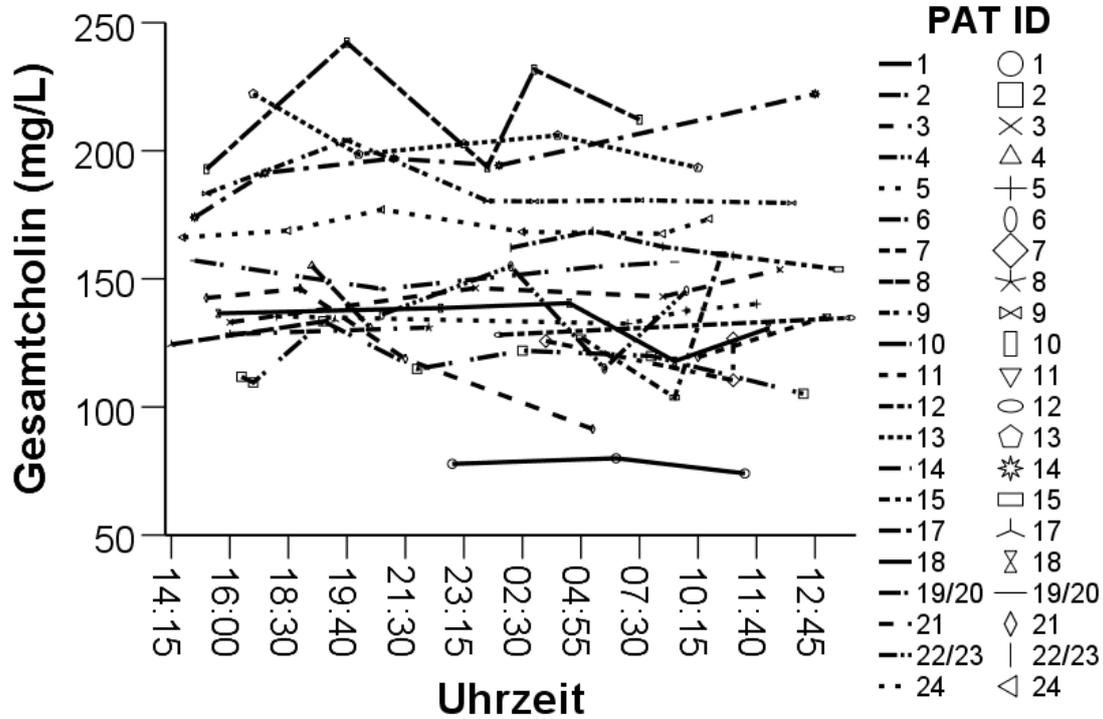
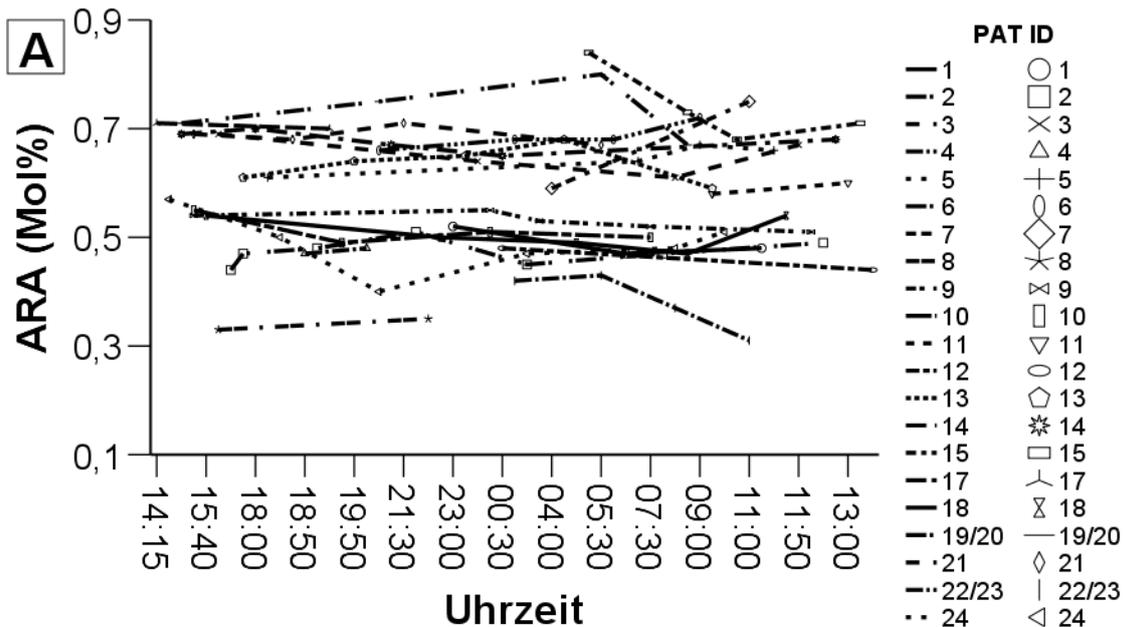


Abbildung 16: Tagesprofile des Gesamtcholins in mg/L in der Muttermilch. Dargestellt sind Einzelwerte von Tag 0 (14:00 bis 13:59 des Folgetages), aufgeteilt nach Individuen (s. Legende). Pat. 19+20 und 22+23 waren Zwillingspaare und haben demnach die gleiche Muttermilch erhalten. Abkürzungen: Pat ID = Patienten und Patientinnen Identifikation.



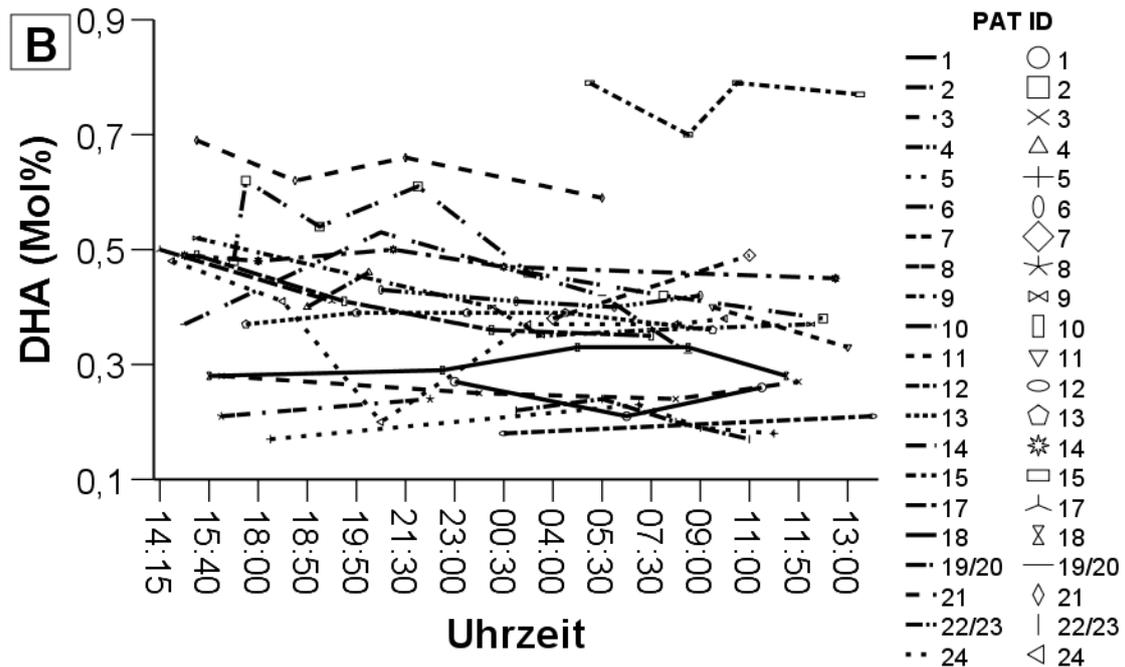


Abbildung 17 A+B: Tagesprofile von ARA (A) und DHA (B) in Mol% in der Muttermilch. Dargestellt sind Einzelwerte von Tag 0 (14:00 bis 13:50 des Folgetages), aufgeteilt nach Individuen (s. Legende). Pat. 19+20 und 22+23 waren Zwillingspaare und haben demnach die gleiche Muttermilch erhalten. Abkürzungen: ARA = Arachidonsäure; DHA = Docosahexaensäure; Pat ID = Patienten und Patientinnen Identifikation.

Laut Studienprotokoll wurde an d0 und d7 von jeder einzelnen Muttermilchgabe an das FG eine Probe asserviert, um ein Tagesprofil zu erstellen. Somit konnten Tagesprofile der Muttermilch der einzelnen Probandinnen ermittelt werden. Dargestellt sind die Tagesprofile der einzelnen Mütter an d0. Es wird deutlich, dass sich die Tagesprofile interindividuell unterschiedlich verhalten. Um einen eindeutigen Trend zu erkennen habe ich weitere Berechnungen durchgeführt (s. 3.2.5).

3.2.5 BERECHNUNG DER TAGESZEITENABHÄNGIGEN SCHWANKUNGEN VON

CHOLIN, ARACHIDONSÄURE UND DOCOSAHEXAENSÄURE

Um zu berechnen ob die Konzentrationen von Cholin, ARA und DHA in der Muttermilch tageszeitenabhängigen Schwankungen unterliegen habe ich die Uhrzeiten, an denen MM abgenommen wurde in vier Gruppen aufgeteilt:

| | | Anzahl (N) | Gesamtcholin (mg/L) | DHA (Mol%) | ARA (Mol%) |
|------------------|-------------------------------|---------------|---------------------------|---------------------|-----------------------|
| Tages- zeiten | 1- Morgens (05-11:00 Uhr) | 138 | 138,54 (111,62-162,51) | 0,56 (0,47-0,65) | 0,37 * (0,24-0,51) |
| | 2 - Mittags (11-17:00 Uhr) | 138 | 136,72 (111,79-167,63) | 0,54 (0,49-0,62) | 0,33 (0,26-0,45) |
| | 3 - Abends (17-23:00 Uhr) | 94 | 139,91 (115,58-156,34) | 0,54 (0,49-0,66) | 0,37 * (0,25-0,48) |
| | 4 - Nachts (23-05:00 Uhr) | 61 | 142,64 (119,33-165,99) | 0,50 (0,45-0,55) | 0,30 (0,19-0,41) |

Tabelle 24: Aufteilung der Gruppen nach Tageszeit. Zur Berechnung wurden die Gruppen abhängig von der Uhrzeit, an der die MM abgenommen wurde, in die o.g. vier Gruppen aufgeteilt. Daten sind Mediane sowie 25er und 75er Perzentile der Muttermilchproben. * = signifikant gegenüber dem ARA-Gehalt in der MM nachts. Abkürzungen: DHA = Docosahexaensäure; ARA = Arachidonsäure.

Im Anschluss darauf habe ich für Gesamtcholin, DHA und ARA in Abhängigkeit von den vier Tageszeitspannen eine einfaktorielle ANOVA durchgeführt. Dabei habe ich die Unabhängigkeit der Werte verletzt, da ich die Patientenzugehörigkeit nicht beachtet habe. Da ich jedoch lediglich Aussagen über die Uhrzeit treffen wollte und keine Aussage über die Unterschiedlichkeit zwischen den Patienten und Patientinnen treffe, ist diese Regel in diesem Fall vernachlässigbar. Ich habe die Werte auf Ausreißer geprüft (beurteilt mit dem Box-Plot), es gab keine extremen Ausreißer. Die Werte sind nicht normalverteilt, wie eine Überprüfung mit dem Shapiro-Wilk-Test ergab ($\alpha = 0,05$). Simulationsstudien zeigen jedoch, dass die einfaktorielle ANOVA relativ robust gegenüber Verletzungen der Normalverteilungsannahme ist (Salkind 2010), sodass ich mich entschied sie weiter zu berechnen.

GESAMTCHOLIN

Die einfaktorielle ANOVA ergab $F(3,419) = 0,46$. Um den F Wert zu bestimmen wird die Streuung zwischen den Stichprobenmittelwerten durch die Streuung innerhalb der Stichproben geteilt. Der F-Wert zeigt also an, dass zwischen den Gruppen die Mittelwerte unterschiedlich sind (Eckey et al. 2002). Der p -Wert liegt bei 0,71, die ANOVA ist nicht signifikant. Um die ANOVA hinreichend zu interpretieren müssen wir die Überprüfung der Varianzhomogenität (die Streuung der Punkte um eine Gerade) durchführen. Diese erfolgte mit dem Levene-Test, gemäß dem wir eine Gleichheit der Varianzen annehmen können ($p > 0,5$) (Levene 1960). Bei genauer Betrachtung mit dem post hoc Tukey Test (Timischl

2013) lässt sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,7$) zwischen den Gruppen darstellen. Somit lässt sich zusammenfassend schließen, dass die Konzentration von Gesamtcholin in der MM keine signifikanten tageszeitlichen Schwankungen aufzeigt.

ARA

Die einfaktorielle ANOVA ergab $F(3,415) = 2,85$ mit $p = 0,037$. Die ANOVA ist signifikant, mit einer Effektstärke von $\eta^2 = 0,02$. Sie zeigt also, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten der einzelnen Gruppen (Morgens, Mittags, Abends, Nachts) gibt. Die Effektstärke wird als Maß verwendet um zu zeigen wie groß der statistisch relevante Unterschied zwischen den Gruppen ist. Die Überprüfung der Varianzhomogenität erfolgte mit dem Levene-Test, gemäß dem wir eine Gleichheit der Varianzen annehmen können ($p > 0,25$). Der Tukey Test zeigt einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) in der Komposition von ARA zwischen einigen Gruppen. Die durchschnittliche Komposition nahm von morgens zu nachts ($-0,47$, 95%-CI $[-0,93, -0,01]$, $p < 0,04$) und abends zu nachts ($-0,5$, 95%-CI $[-0,97, -0,01]$, $p < 0,04$) ab. Daraus lässt sich schließen, dass die Komposition von ARA in der MM morgens und abends signifikant höher ist als nachts.

DHA

Die einfaktorielle ANOVA ergab $F(3,414) = 3,165$ bei $p = 0,024$. Die ANOVA ist signifikant, mit einer Effektstärke von $\eta^2 = 0,02$. Die Überprüfung der Varianzhomogenität erfolgte mit dem Levene-Test, gemäß dem wir keine Gleichheit der Varianzen annehmen können ($p < 0,05$). Somit wurden die Ergebnisse mit dem Games-Howel post-hoc Test interpretiert. Hiermit lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen darstellen.

3.2.6 CHOLIN, ARACHIDONSÄURE UND DOCOSAHEXAENSÄURE IM VERLAUF DES POSTNATALEN ALTERS

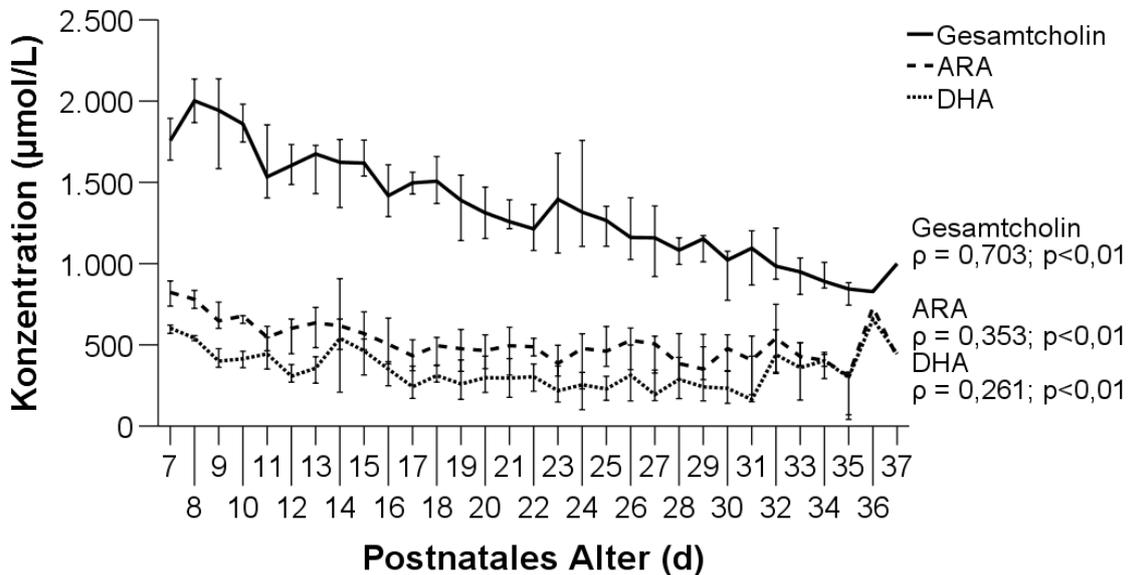


Abbildung 18: Gesamtcholin, ARA und DHA in µmol/L aller Muttermilchwerte, aufgeteilt nach postnatalem Alter (Tag 7-37). Dargestellt sind Mediane und Standardabweichungen; Abkürzungen: ARA = Arachidonsäure; DHA = Docosahexaensäure; d = Tag. Signifikanzniveau: $p < 0,01$. ρ : Korrelationskoeffizient rho nach Spearman

Gezeigt sind die Mediane aller Muttermilchproben mit Standardabweichungen bezogen auf das postnatale Alter der Kinder. Es zeigt sich ein sinkender Gesamtcholingehalt ($\rho = 0,703$, $p < 0,01$.) der Muttermilch über die Zeit nach der Geburt, wohingegen ARA ($\rho = 0,353$, $p < 0,01$) und DHA ($\rho = 0,261$, $p < 0,01$) nicht eindeutig abnehmen. Ihre tiefsten Werte erreichen ARA und DHA zwischen dem 17. und 31. postnatalen Tag. Das Streudiagramm (s. Abbildung 19) zeigt, dass der Gesamtcholingehalt in der MM Frühgeborener in den ersten 40 Tagen signifikant mit einem Korrelationskoeffizienten (nach Pearson) von $-0,730$ sinkt.

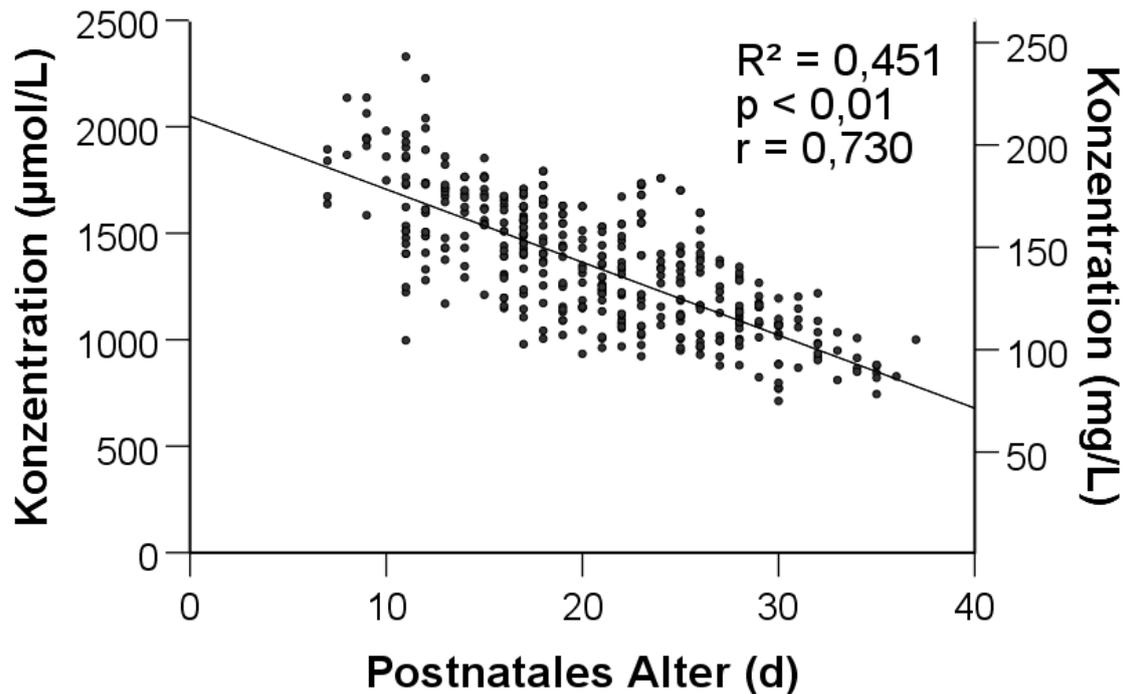
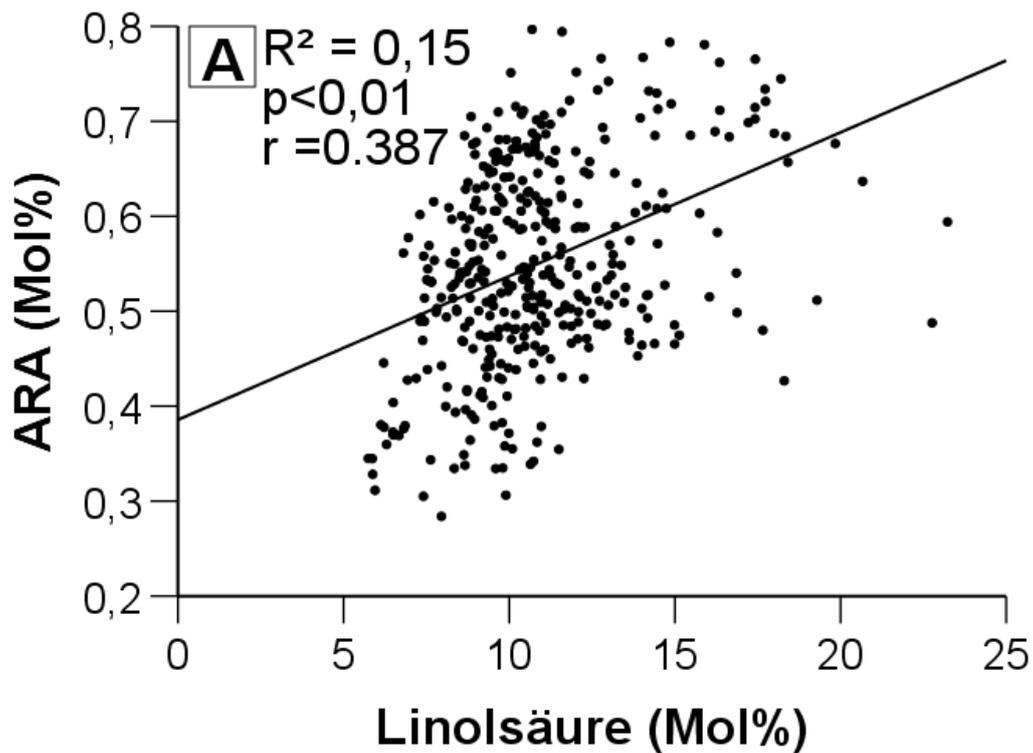


Abbildung 19: Gesamtcholingehalt aller Muttermilchen nach postpartalem Alter der Kinder (Tag 0-40). Dargestellt sind Einzelwerte und die Anpassungslinie. Die Werte sind normalverteilt. Korrelationskoeffizient nach Pearson. Signifikanzniveau: $p < 0,01$. Abkürzungen: d = Tag

3.3 KORRELATION ZWISCHEN ARACHIDONSÄURE & DOCOSAHEXAENSÄURE UND IHREN PREKUSOREN LINOLSÄURE & α -LINOLENSÄURE IN DER MUTTERMILCH UND IM KINDLICHEN PLASMA



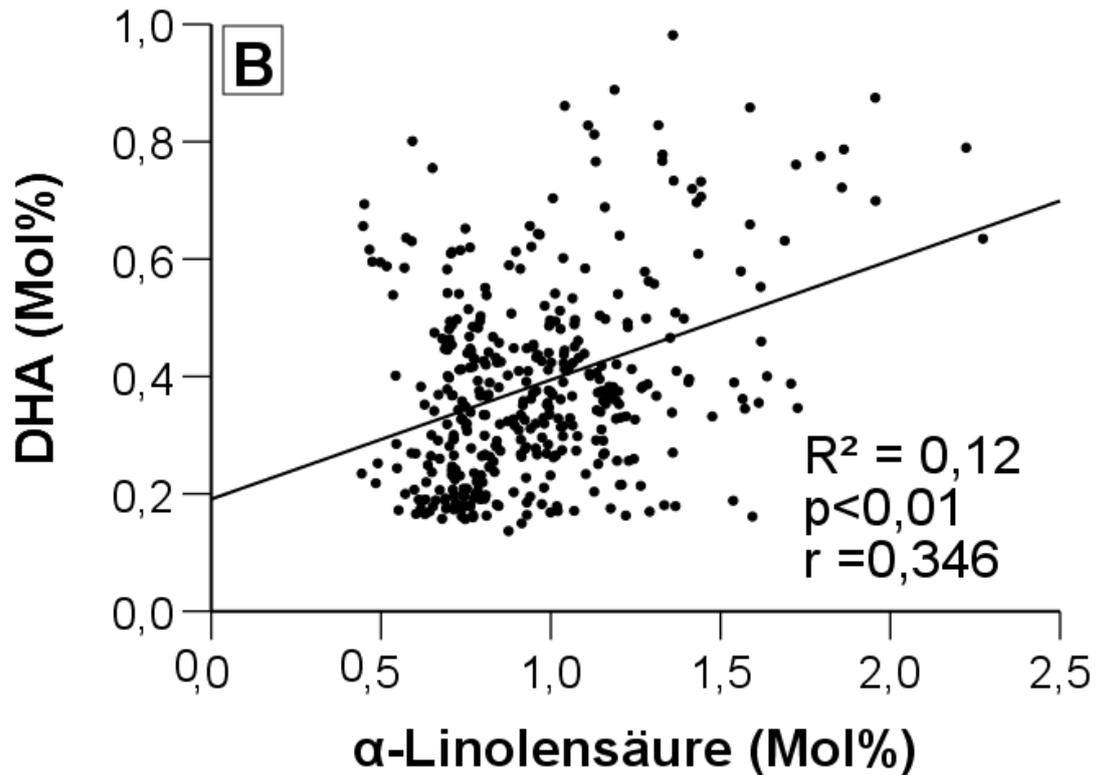
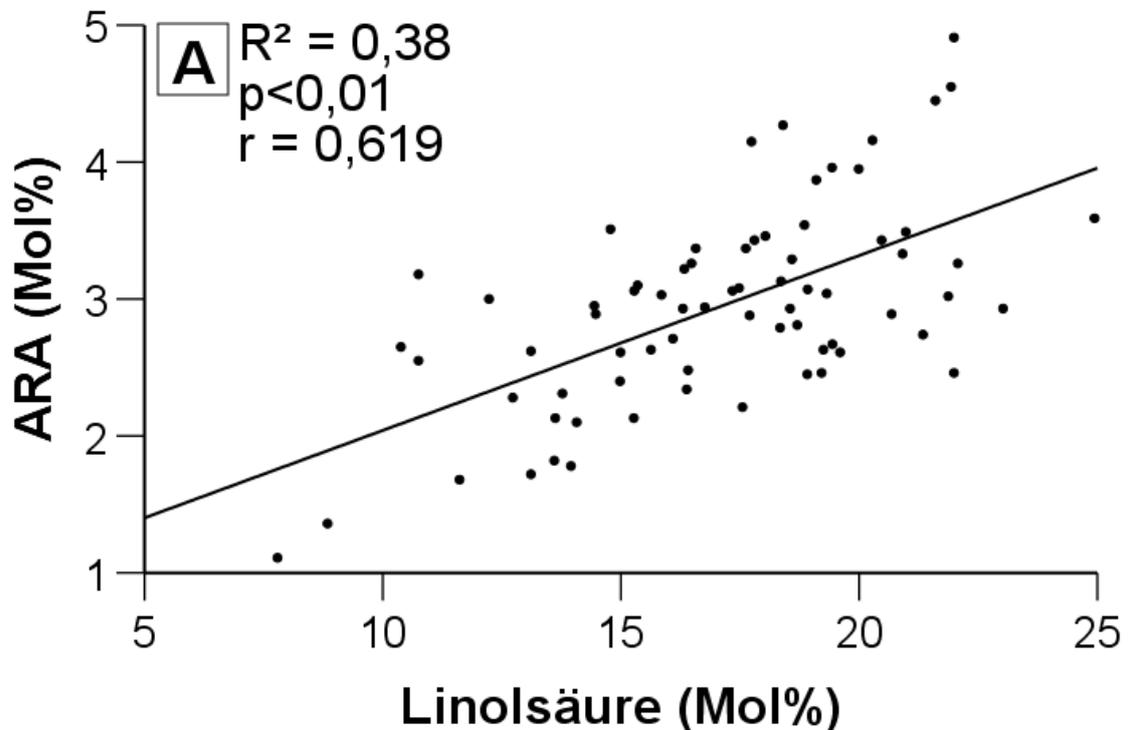


Abbildung 20 A+B: Streudiagramm der Korrelation ARA vs. LA (A) und DHA vs. ALA (B) in MM. Dargestellt sind Einzelwerte (N = 432). Die Werte waren Normalverteilt. Korrelationskoeffizient nach Pearson. Abkürzungen: DHA = Docosahexaensäure; ARA = Arachidonsäure.



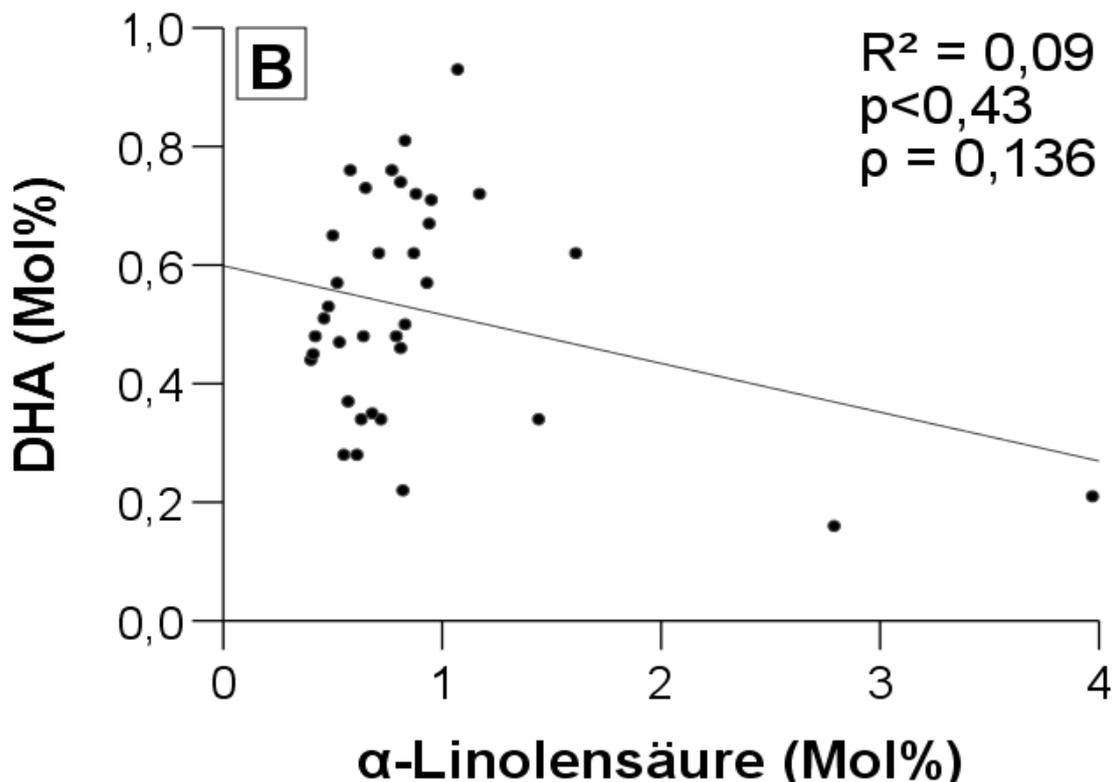


Abbildung 21 A+B: Streudiagramm LA/ARA (A) und ALA/DHA (B) im Plasma. Dargestellt sind Einzelwerte aller Frühgeborenen (N = 72) (A) und Einzelwerte aller Frühgeborenen, die kein DHA supplementiert bekamen (N = 36) (B). ARA, Linolsäure und DHA sind normalverteilt, α -Linolensäure ist nicht normalverteilt. Signifikanzniveau: $p < 0,01$. ρ : Korrelationskoeffizient nach Pearson (A). Signifikanzniveau: $p > 0,5$. Korrelationskoeffizient rho nach Spearman (B). Abkürzungen: ARA - Arachidonsäure. DHA – Docosahexaensäure.

Aus Linolsäure (LA) wird ARA durch Elongation und Desaturierung gebildet (s. Abbildung 8). α -Linolensäure (ALA) dient als Vorläufer für DHA (s. Abbildung 7). Korreliert wurden LA mit ARA und ALA mit DHA, jeweils in Mol% der Gesamtfettsäuren aller vorhandener Muttermilchproben. Zudem wurde LA mit ARA in Mol% der Gesamtfettsäuren aller Plasmaproben der Kinder korreliert (N=72). Um Verfälschungen zu vermeiden wurde für die Korrelation von ALA mit DHA in Mol% der Gesamtfettsäuren im kindlichen Plasma lediglich die Kontrollgruppe und die Gruppe der Kinder, die nur Cholin supplementiert bekamen herangezogen (N=36). Es zeigt sich eine Korrelation zwischen ARA und LA ($r=0.387$; $p<0,01$) bzw. DHA und ALA ($r=0,346$; $p<0,01$) in der Muttermilch (s. Abbildung 20 A+B). Es zeigt sich im kindlichen Plasma eine Korrelation zwischen LA und ARA ($r=0,619$; $p<0,01$) (s. Abbildung 21A) und, wie in Abbildung 21B zu sehen ist, keine Korrelation zwischen ALA und DHA ($\rho=0,136$; $p<0,43$).

3.4 ZUFUHR DER UNTERSUCHTEN STOFFE ÜBER DIE MUTTERMILCH

| ID | Versuchsgruppe | Muttermilch (ml/kg/d) | Beba FM85 (g/kg/d) | Aptamil Eiweiß + (g/kg/d) | Beba Stufe1 (ml/kg/d) |
|--------|----------------|-----------------------|--------------------|---------------------------|-----------------------|
| 1 | Kontrollgruppe | 158 (157-169) | 9,18 | 0 | 0 |
| 5 | Kontrollgruppe | 151 (147-152) | 8,09 | 0 | 0 |
| 10 | Kontrollgruppe | 159 (149-168) | 8,37 | 0 | 0 |
| 14 | Kontrollgruppe | 131 (110-134) | 6,69 | 0 | 19 |
| 19 | Kontrollgruppe | 66 (53-71) | 3,41 | 0 | 96 |
| 22 | Kontrollgruppe | 171 (158-175) | 8,55 | 0 | 0 |
| Median | Kontrollgruppe | 155 (148-160) | 8,23 | 0 | 0 |
| 2 | DHA | 161 (160-172) | 8,3 | 0 | 0 |
| 6 | DHA | 173 (170-177) | 8,86 | 0 | 0 |
| 12 | DHA | 107 (106-109) | 6,55 | 0,46 | 54 |
| 15 | DHA | 141 (105-145) | 6,67 | 0 | 10 |
| 20 | DHA | 50 (40-57) | 2,75 | 0 | 96 |
| 21 | DHA | 12 (10-30) | 1,21 | 0 | 132 |
| Median | DHA | 124 (105-127) | 6,61 | 0 | 32 |
| 4 | Cholin | 173 (166-177) | 7,21 | 0 | 0 |
| 7 | Cholin | 163 (162-165) | 8,53 | 1,1 | 0 |
| 11 | Cholin | 154 (136-163) | 7,78 | 0 | 7 |
| 13 | Cholin | 147 (138-154) | 7,68 | 0 | 0 |
| 18 | Cholin | 143 (118-145) | 6,6 | 1,43 | 0 |
| 24 | Cholin | 162 (154-166) | 8,1 | 0 | 0 |
| Median | Cholin | 158 (146-164) | 7,73 | 0 | 0 |
| 3 | Cholin+DHA | 149 (146-156) | 7,33 | 0 | 0 |
| 8 | Cholin+DHA | 172 (168-176) | 8,98 | 1 | 0 |
| 9 | Cholin+DHA | 153 (147-154) | 7,63 | 0 | 0 |
| 16 | Cholin+DHA | 0 | 0 | 0 | 157 |
| 17 | Cholin+DHA | 154 (152-162) | 10,08 | 0 | 0 |
| 23 | Cholin+DHA | 169 (166-170) | 8,43 | 0,57 | 0 |
| Median | Cholin+DHA | 153 (149-159) | 8,03 | 0 | 0 |

Tabelle 25: Menge an MM (in ml/kg/d), Muttermilchsupplement (Beba FM85 und Aptamil Eiweiß + in g/kg/d) bzw Frühgeborenennahrung (Beba Stufe 1 in ml/kg/d) pro Frühgeborenes. Dargestellt ist der Median sowie die 25er und 75er Perzentile für die Muttermilch. Die Mutter mit der Identifikationsnummer 16 hat ihr Kind nicht gestillt. Abkürzungen: ID = Identifikation; DHA = Docosahexaensäure; ml/kg/d = Milliliter pro Kilogramm pro Tag.

Tabelle 25 stellt die verabreichte Menge an MM, Muttermilchsupplement und Frühgeborenennahrung pro kg Frühgeborenengewicht an den Studientagen 1-10 dar. Im Median waren alle Gruppen, bis auf die Gruppe der Kinder die DHA erhielten, gleichverteilt. Wie in Abbildung 22 und Tabelle 21 dargestellt ist, erhielten die Kinder über die MM bei vollem Kostaufbau (150ml) 20,8 (16,9-24,7) mg Gesamtcholin bestehend aus den in Milch vorhandenen cholinhaltigen

Komponenten (Abbildung 22A) sowie 22,7 (17,1-27,6) mg Arachidonsäure und 16,3 (10,7-21,5) mg Docosahexaensäure. (Abbildung 22B).

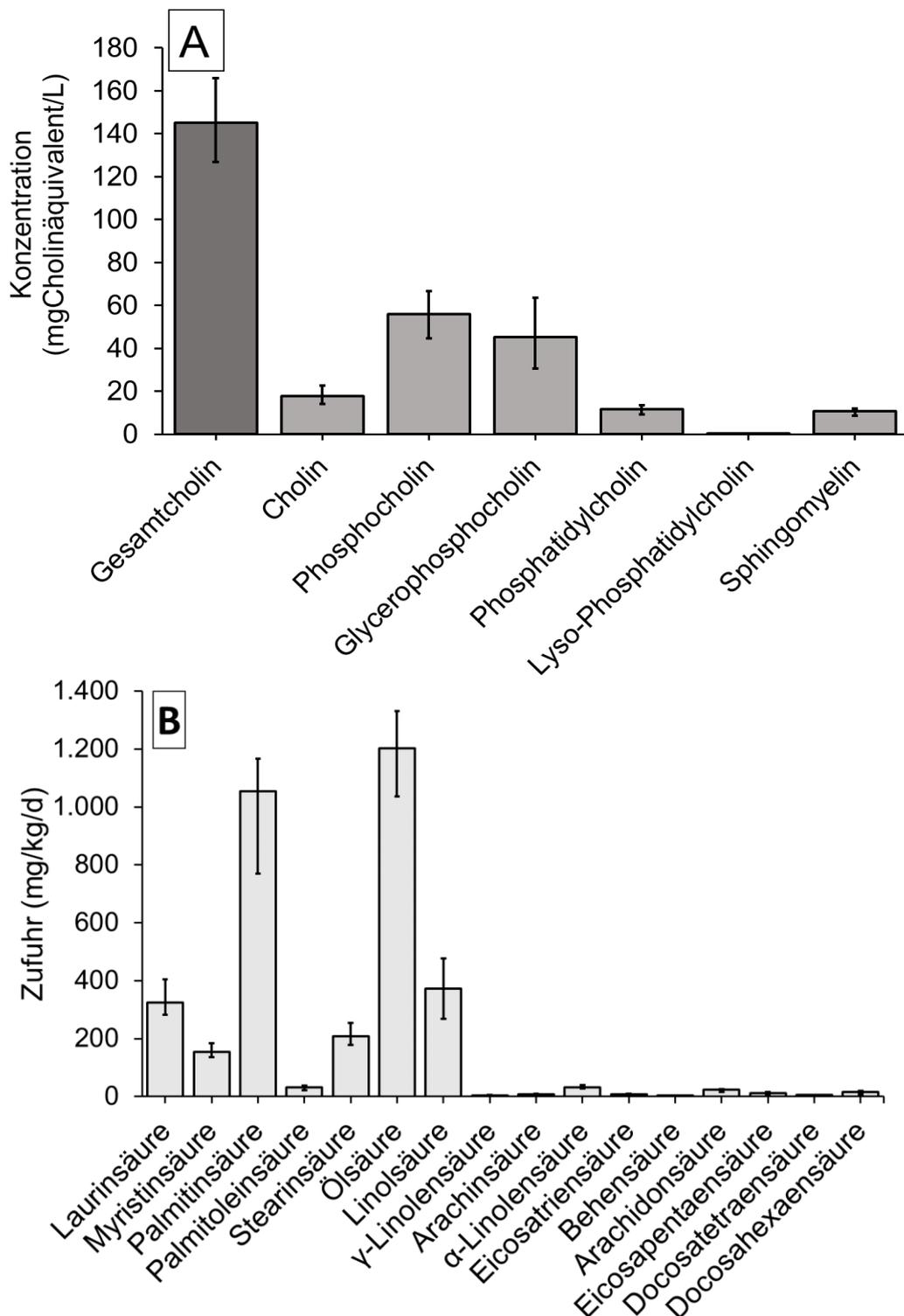


Abbildung 22 A+B: Zufuhr an Gesamtcholin und Cholincomponenten (A) sowie Fettsäuren der Gesamtlipide (B) über die Muttermilch. Berechnet wurde die Tageszufuhr für Tag 01-10 aus den Mengen an Muttermilch, welche die Kinder erhielten, sowie den Median aus den an dem Studientag gewonnenen MM-Proben. Somit erhielten wir für jedes Frühgeborene (N = 23) die Zufuhr an Tag 01-10. Aus diesen Werten N = 230 wurde anschließend der Median sowie die 25er und 75er Perzentile berechnet und in diesem Diagramm dargestellt. Abkürzungen: MM = Muttermilch

3.5 KORRELATION AUSGEWÄHLTER PARAMETER DES PLASMAS DER FRÜHGEBORENEN MIT DER MUTTERMILCH UND GESAMTEN NAHRUNGSZUFUHR

3.5.1 CHOLIN

| | | Alle Kinder | Kinder mit Cholin-Suppl. | Kinder ohne Cholin-Suppl. |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------|--------------------------|---------------------------|
| Plasmacholin ($\mu\text{mol/L}$) vs. Cholinzufuhr via MM (mg/kg/d) | Korrelationsniveau | 0,000 | 0,054 | 0,001 |
| | Korrelationskoeffizient | 0,453* (N=69) | 0,416 (N=22) | 0,483* (N=47) |
| | R ² | 0,137 | 0,077 | 0,233 |
| Plasmabetain ($\mu\text{mol/L}$) vs. Cholinzufuhr via MM (mg/kg/d) | Korrelationsniveau | 0,012 | 0,019 | 0,141 |
| | Korrelationskoeffizient | 0,302* (N=69) | 0,495* (N=22) | 0,218 (N=47) |
| | R ² | 0,104 | 0,201 | 0,065 |
| Plasmacholin ($\mu\text{mol/L}$) vs. Cholinzufuhr via Gesamtnahrung (mg/kg/d) | Korrelationsniveau | 0,000 | 0,104 | 0,002 |
| | Korrelationskoeffizient | 0,617* (N=69) | 0,356 (N=22) | 0,436* (N=47) |
| | R ² | 0,319 | 0,059 | 0,088 |
| Plasmabetain ($\mu\text{mol/L}$) vs. Cholinzufuhr via Gesamtnahrung (mg/kg/d) | Korrelationsniveau | 0,000 | 0,198 | 0,206 |
| | Korrelationskoeffizient | 0,544* (N=69) | 0,285 (N=22) | 0,188 (N=47) |
| | R ² | 0,351 | 0,081 | 0,053 |

Tabelle 26: Plasmakonzentrationen von Cholin und Betain in Relation zur Cholinzufuhr. Korreliert wurde das freie Cholin/Betain im Plasma mit den Medianen des Gesamtcholins in der zugehörigen Muttermilch/Gesamtnahrung. Datenermittlung s. Methodenteil. Angegeben wurde bei normalverteilten Werten der Pearson, bei nicht normalverteilten Werten der Spearman Korrelationskoeffizient. * = signifikant. Abkürzungen: Cholin-Suppl. = Cholin Supplementation; MM = Muttermilch; N = Anzahl.

3.5.1.1 PLASMA VS MUTTERMILCH

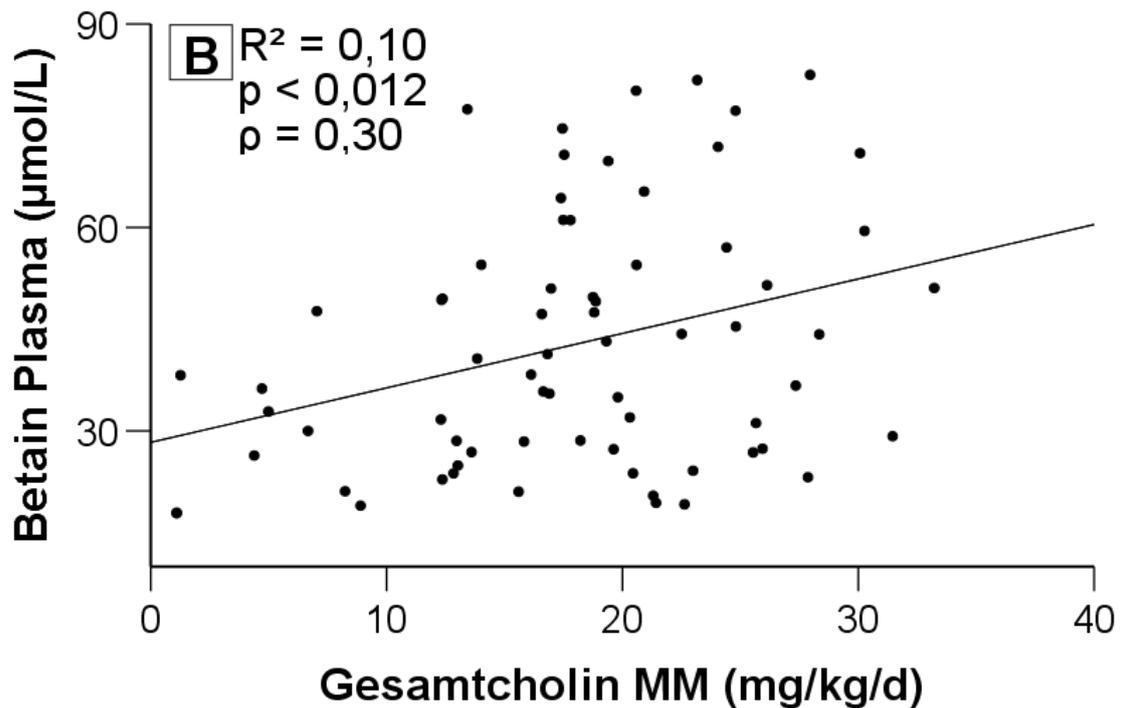
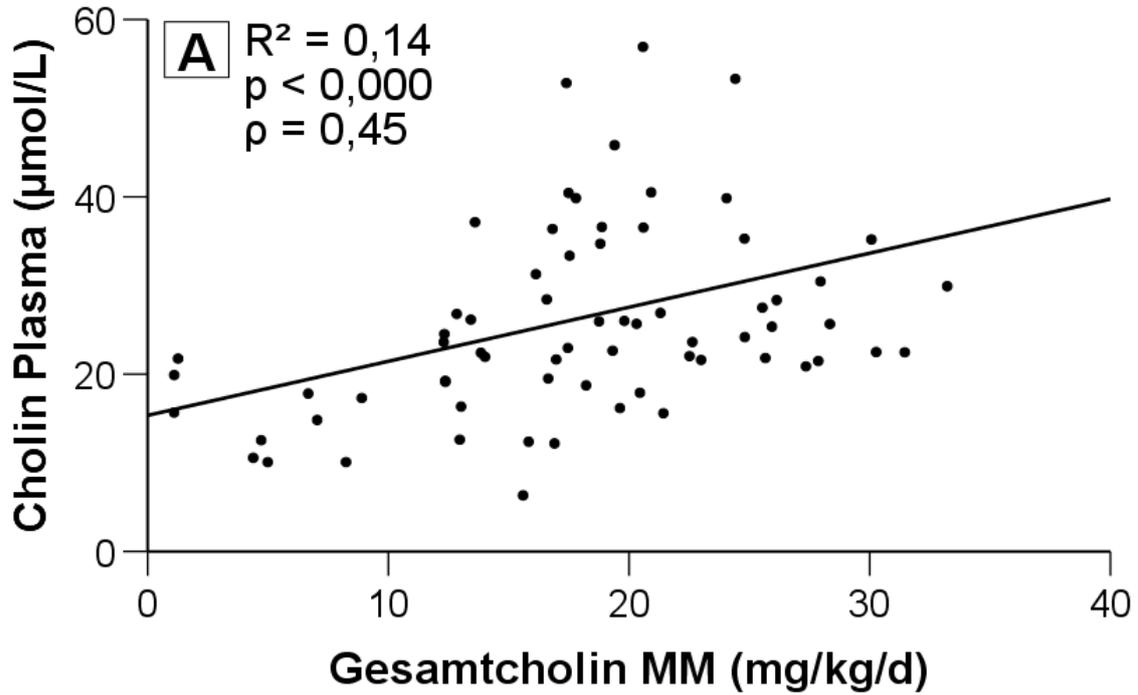


Abbildung 23 A+B: Korrelation von Cholin (A) und Betain (B) im Plasma der Kinder mit dem Gesamtcholin der MM. Korreliert wurde das Cholin/Betain im Plasma von Tag 0, 8 und 10 mit den Medianen der Tage 1, 7 und 9 des Gesamtcholins in der zugehörigen Muttermilch (N = 69). Die Merkmale sind nicht normalverteilt. Korrelationskoeffizient nach Spearman. Signifikanzniveau: $p < 0,000$ (A) und $p < 0,012$ (B). Abkürzungen: MM = Muttermilch

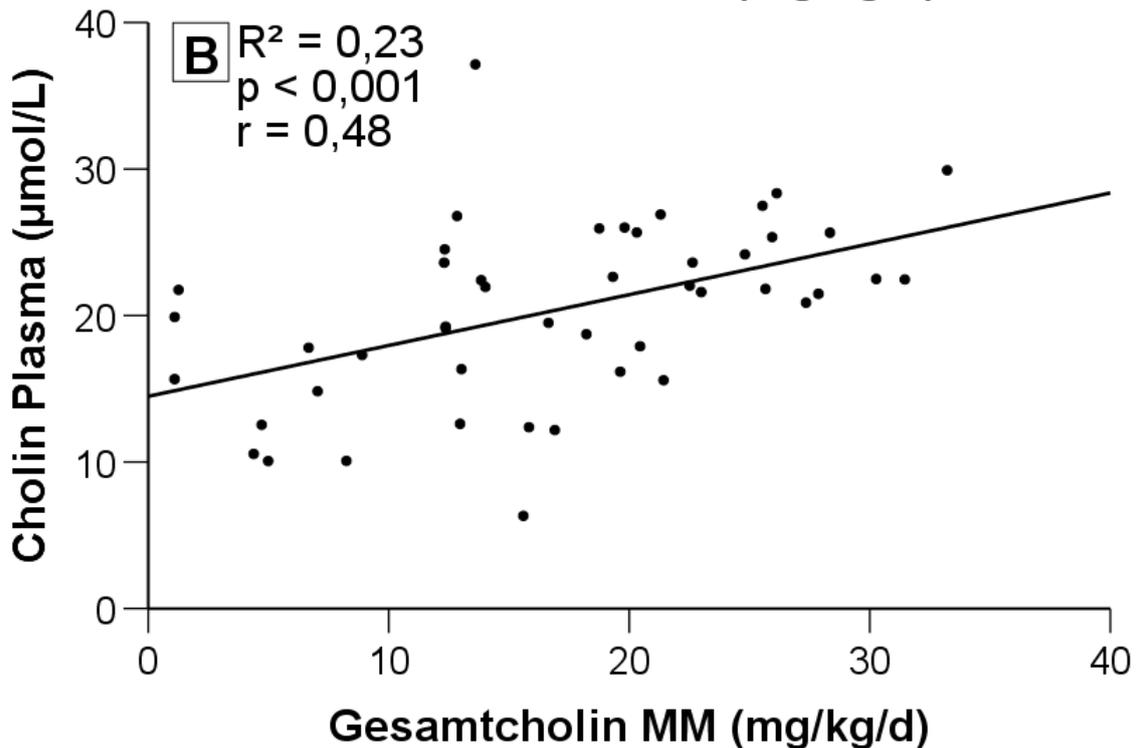
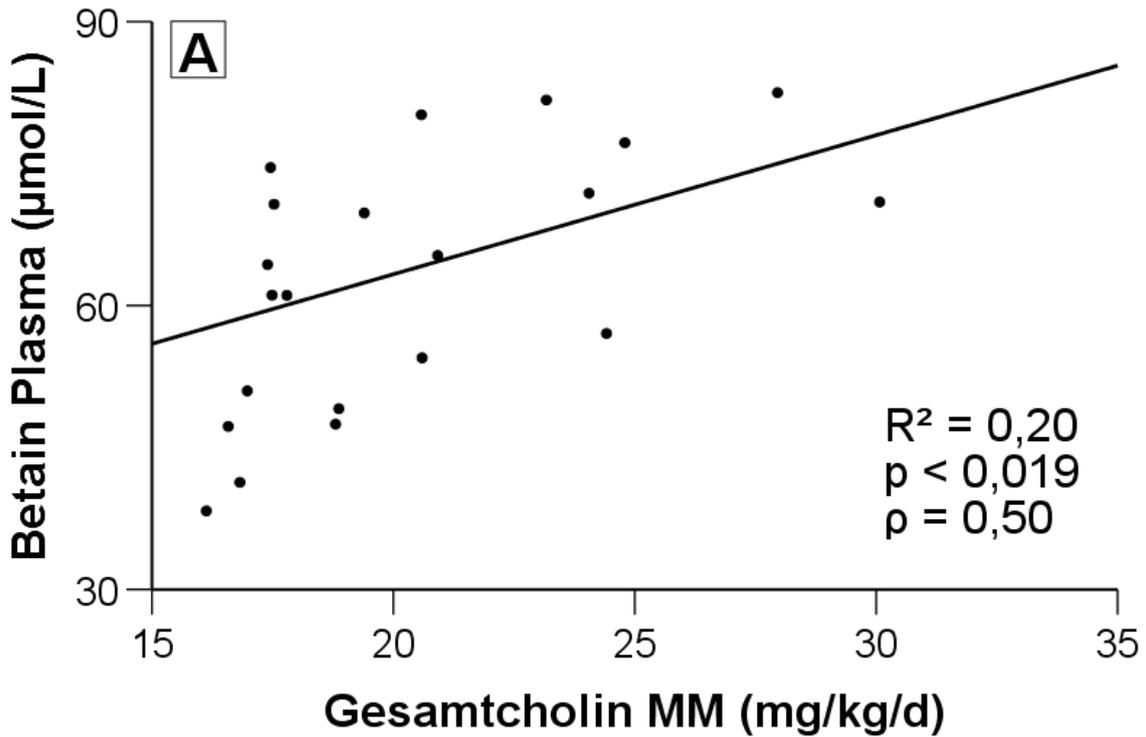
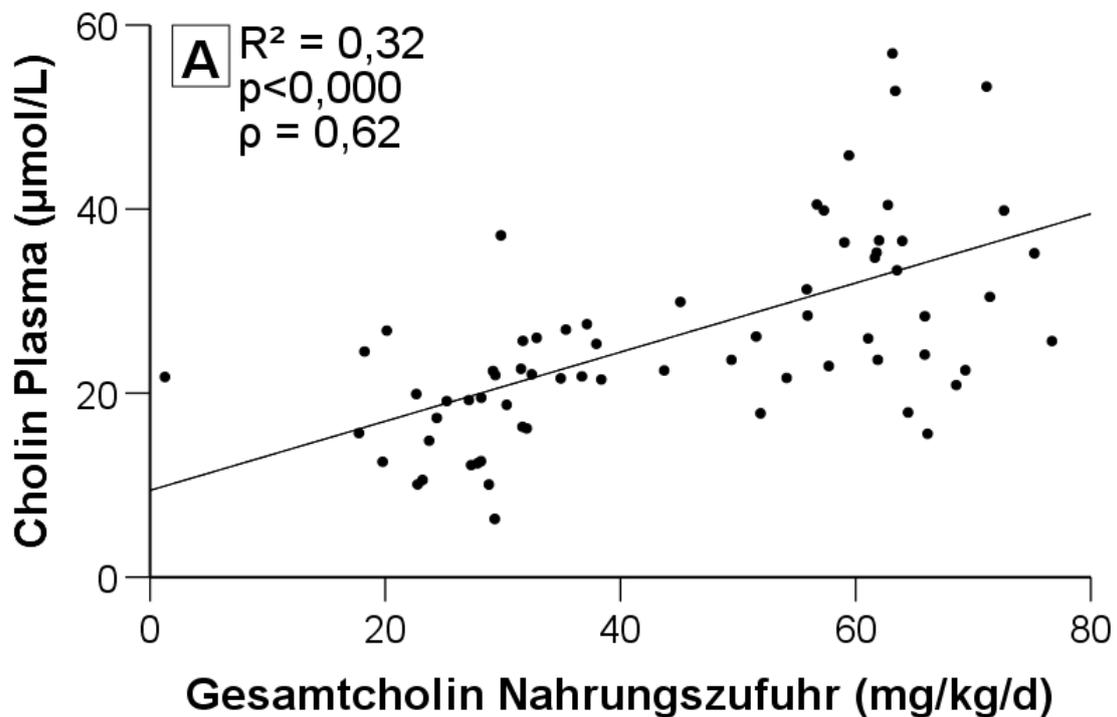


Abbildung 24 A+B: Korrelation von Betain im Plasma der Kinder mit Cholin-Supplementation (A) und Cholin im Plasma der Kinder ohne Cholin-Supplementation (B) mit dem Gesamtcholin der MM. Für die Korrelation der Kinder mit Cholin-Supplementation (A) wurden die Plasmawerte von Tag 8 und 10 der Kinder mit Cholin-Supplementation mit den Medianen der Tage 7 und 9 des Gesamtcholins der zugehörigen Muttermilch verglichen (N = 22). Für die Korrelation der Kinder ohne Cholin-Supplementation (B) wurden die Werte des Cholins/Betains im Plasma an Tag 0, 8 und 10 der Kinder ohne Cholin-Supplementation, sowie an Tag 0 der Kinder mit Cholin-Supplementation mit den Medianen der jeweiligen Tage (1, 7 und 9) des Gesamtcholins in der zugehörigen Muttermilch verglichen (N = 47). Die Merkmale der Abbildung A sind nicht normalverteilt. Korrelationskoeffizient nach Spearman. Signifikanzniveau: $p < 0,019$ (A). Die Merkmale der Abbildung B sind normalverteilt. Korrelationskoeffizient nach Pearson. Signifikanzniveau $p < 0,001$ (B). Abkürzungen: MM = Muttermilch

Cholin ($\rho = 0,45$; $p < 0,000$) sowie Betain ($\rho = 0,30$; $p < 0,012$) im Plasma der Kinder korreliert mit der Konzentration des Gesamtcholins in der MM (s. Abbildung 23 A+B). Wenn wir uns nur die Kinder mit Cholin-Supplementation anschauen, so korreliert Betain im Plasma der Kinder mit dem Gesamtcholin in der MM ($\rho = 0,50$; $p < 0,019$) (s. Abbildung 24A), Cholin im Plasma korreliert nicht. In der Gruppe ohne Cholin-Supplementation korreliert das Cholin im Plasma der Kinder mit dem Gesamtcholin in der MM ($r = 0,48$; $p < 0,001$) (s. Abbildung 24B), Betain korreliert nicht.

3.5.1.2 PLASMA VS GESAMTNAHRUNGSZUFUHR



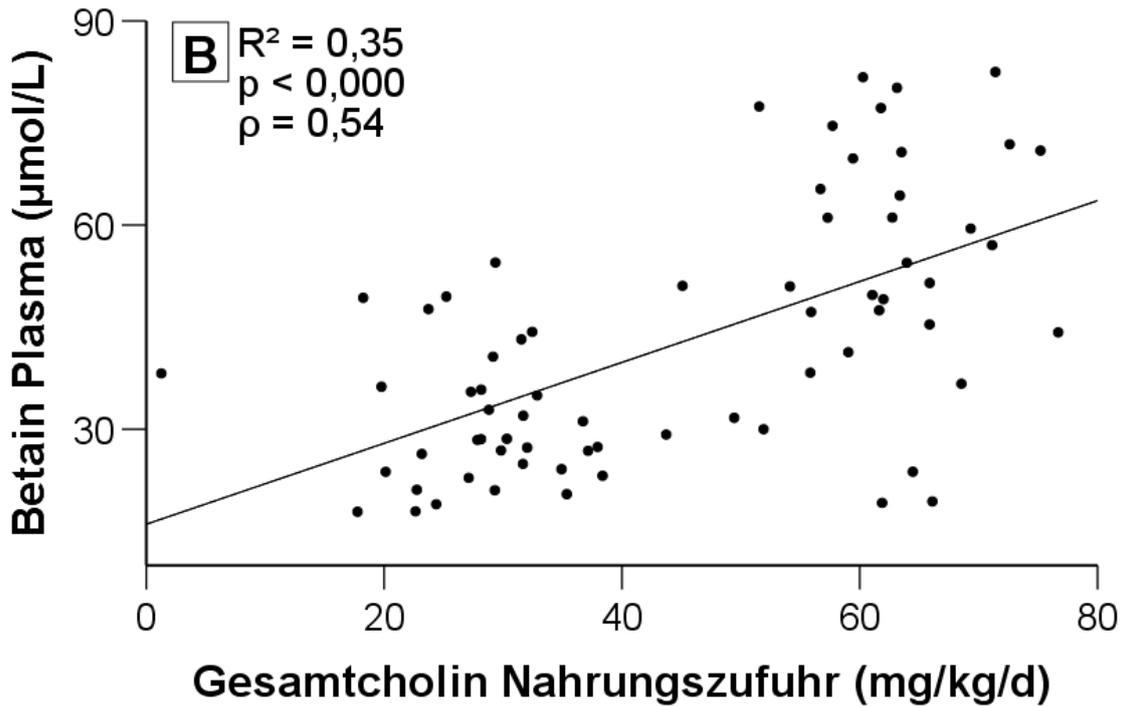


Abbildung 25 A+B: Korrelation von Cholin (A) bzw. Betain (B) im Plasma mit dem Gesamtcholin aus der Nahrung. Korreliert wurde das Cholin/Betain im Plasma von Tag 0, 8 und 10 mit den Medianen der Tage 1, 7 und 9 des Gesamtcholins in der zugehörigen Nahrung (Muttermilch gegebenenfalls plus Muttermilchsupplement und/oder Studiensupplement und/oder Frühgeborenenahrung) (N = 69). Die Merkmale sind nicht Normalverteilt. Korrelationskoeffizient nach Spearman. Signifikanzniveaus: $p < 0,000$.

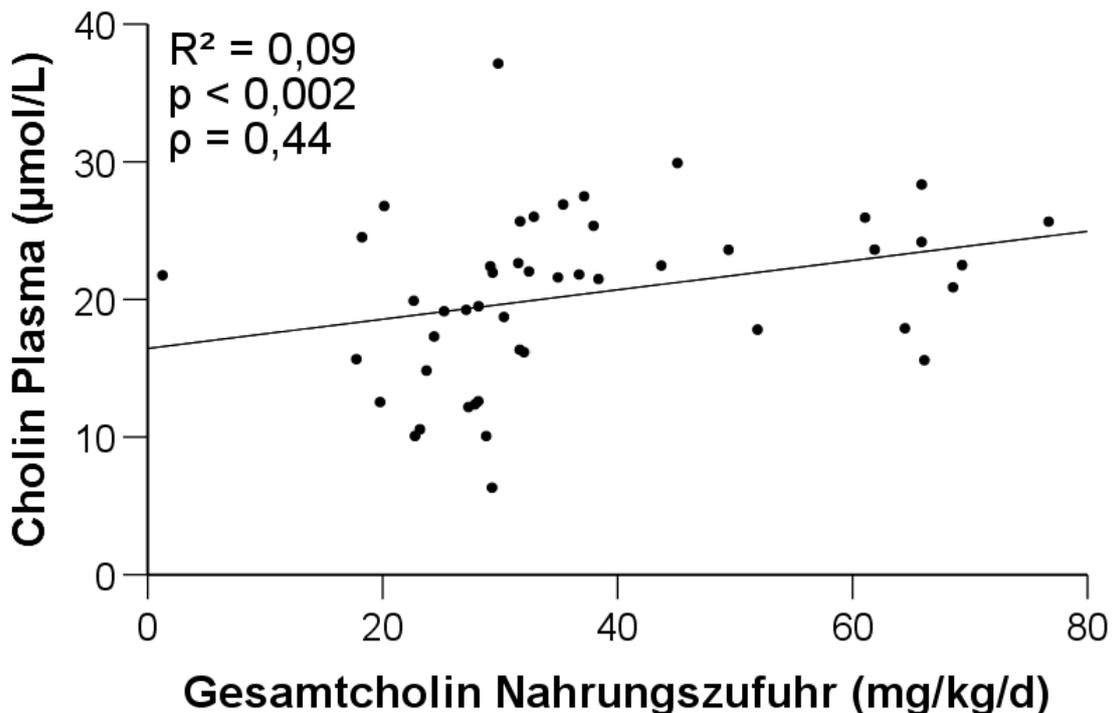


Abbildung 26: Korrelation von Cholin im Plasma der Kinder mit dem Gesamtcholin aus der Nahrung der Kinder ohne Cholin-Supplementation. Für die Korrelation der Kinder ohne Cholin-Supplementation wurden die Werte des Cholins im Plasma an Tag 0, 8 und 10 der Kinder ohne Cholin-Supplementation sowie an Tag 0 der Kinder mit Cholin-Supplementation mit den Medianen der jeweiligen Tage (1, 7 und 9) des Gesamtcholins in der zugehörigen Gesamtnahrung verglichen (N = 47). Die Merkmale sind nicht normalverteilt. Korrelationskoeffizient nach Spearman. Signifikanzniveau: $p < 0,002$.

Cholin ($\rho = 0,62$; $p < 0,000$) sowie die Betain ($\rho = 0,54$; $p < 0,000$) im Plasma der Kinder korreliert mit der über die Nahrung (MM + Muttermilchsupplement + Studiensupplement + Formulanahrung) aufgenommenen Menge an Gesamtcholin (mg/kg/d) (s. Abbildung 25 A+B). Cholin im Plasma der Kinder korreliert zudem mit der Menge des über die gesamte Nahrung aufgenommenen Cholins, in der Gruppe der Kinder ohne Cholin Supplementation ($\rho = 0,44$; $p < 0,002$) (s. Abbildung 26), hier korreliert Betain im Plasma jedoch nicht. Wenn die Gruppe der Kinder mit Cholin-Supplementation separat korreliert wird, so korreliert weder das Cholin noch das Betain im Plasma mit dem über die Nahrung aufgenommenen Gesamtcholin.

3.5.2 DOCOSAHEXAENSÄURE UND ARACHIDONSÄURE

3.5.2.1 PLASMA VS MUTTERMILCH

| | | Kinder ohne DHA-Suppl. |
|---------------------------------------------------------|-------------------------|------------------------|
| DHA-PC Plasma (Mol%) vs. DHA-Zufuhr via MM (Mol%) | Korrelationsniveau | 0,000 |
| | Korrelationskoeffizient | 0,491 (N 47) |
| | R ² | 0,196 |
| DHA-NL Plasma (Mol%) vs. DHA-Zufuhr via MM (Mol%) | Korrelationsniveau | 0,000 |
| | Korrelationskoeffizient | 0,555 (N 47) |
| | R ² | 0,190 |
| ARA-PC Plasma (Mol%) vs. ARA-Zufuhr via MM (Mol%) | Korrelationsniveau | 0,046 |
| | Korrelationskoeffizient | 0,292 (N 47) |
| | R ² | 0,163 |
| ARA-NL Plasma (Mol%) vs. ARA-Zufuhr via MM (Mol%) | Korrelationsniveau | 0,039 |
| | Korrelationskoeffizient | 0,302 (N 47) |
| | R ² | 0,091 |

Tabelle 27: Plasmakonzentrationen von ARA und DHA in Relation zur Zufuhr via MM. Korreliert wurde ARA/DHA -PC/-NL im Plasma der Kinder ohne DHA Supplementation mit den Medianen in der Muttermilch. Datenermittlung s. Methodenteil. DHA-/ARA-PC wurde angegeben als Mol% vom Gesamt-PC. DHA-/ARA-NL wurden angegeben als Mol% der Neutrallipide. Abkürzungen: DHA = Docosahexaensäure; MM = Muttermilch; NL = Neutrallipide; PC = Phosphatidylcholin; DHA-Suppl. = Docosahexaen Supplementation.

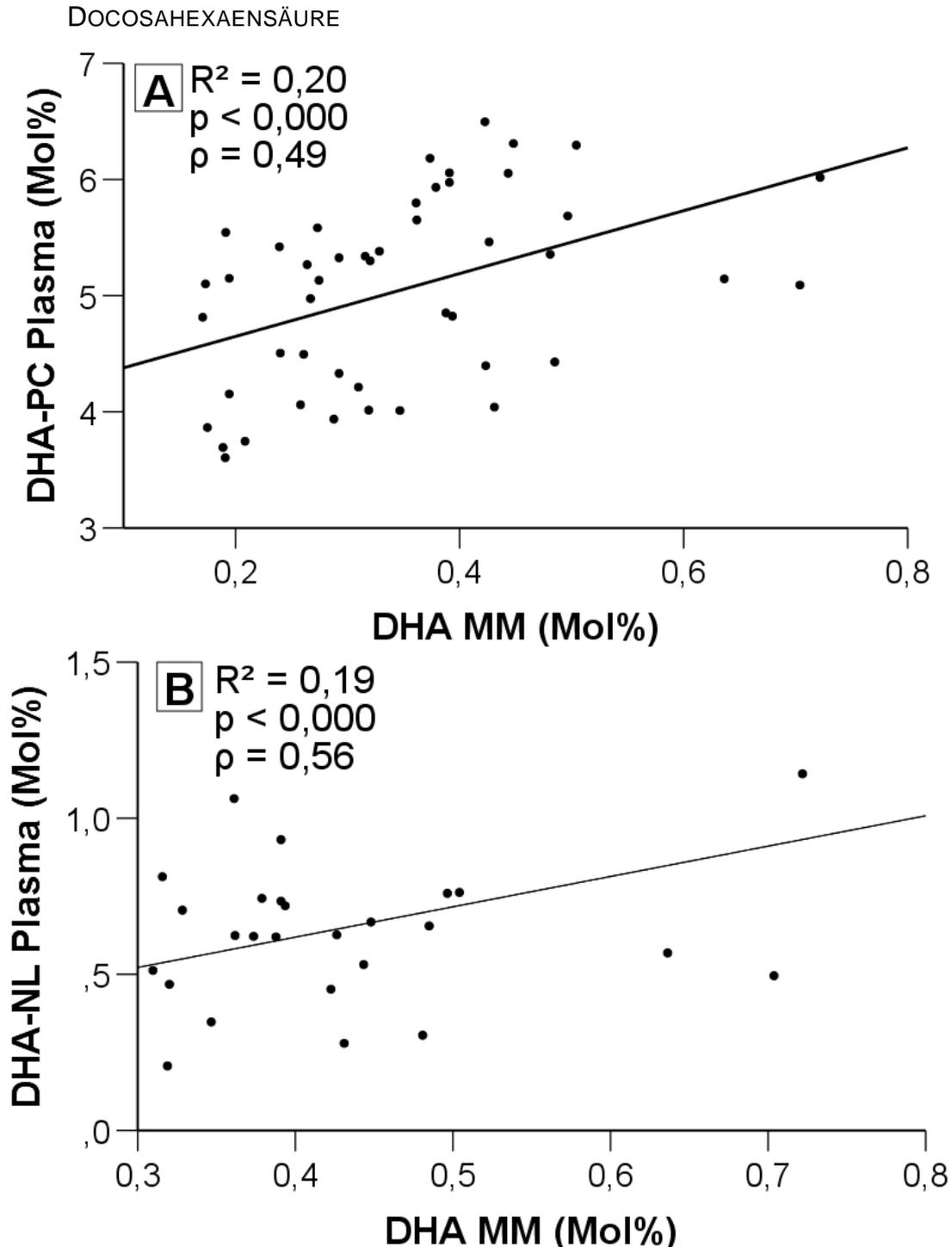


Abbildung 27 A+B: Korrelation DHA-PC (A) und DHA-NL (B) im Plasma mit DHA in der MM bei den Kindern ohne DHA Supplementation. Dargestellt sind Einzelwerte von Tag 0, 8 und 10 im Plasma der Kinder ohne DHA Supplementation sowie von Tag 0 der Kinder mit DHA Supplementation und die individuellen Mediane von DHA in der Muttermilch (N = 47). Die Daten waren nicht normalverteilt. Korrelationskoeffizient nach Spearman. Signifikanzniveau: $p < 0,000$. Abkürzungen: DHA = Docosahexaensäure; MM = Muttermilch; PC = Phosphatidylcholin; NL = Neutrallipide

Im Plasma der Kinder, die kein DHA bekamen, korrelierte der Anteil von DHA-PC (Mol% von Gesamt-PC) ($\rho = 0,49$; $p < 0,000$) sowie von DHA der Neutrallipide

(NL) ($p = 0,56$; $p < 0,000$) mit dem Anteil von DHA in den TAGs (Mol%) der MM (s. Abbildung 27).

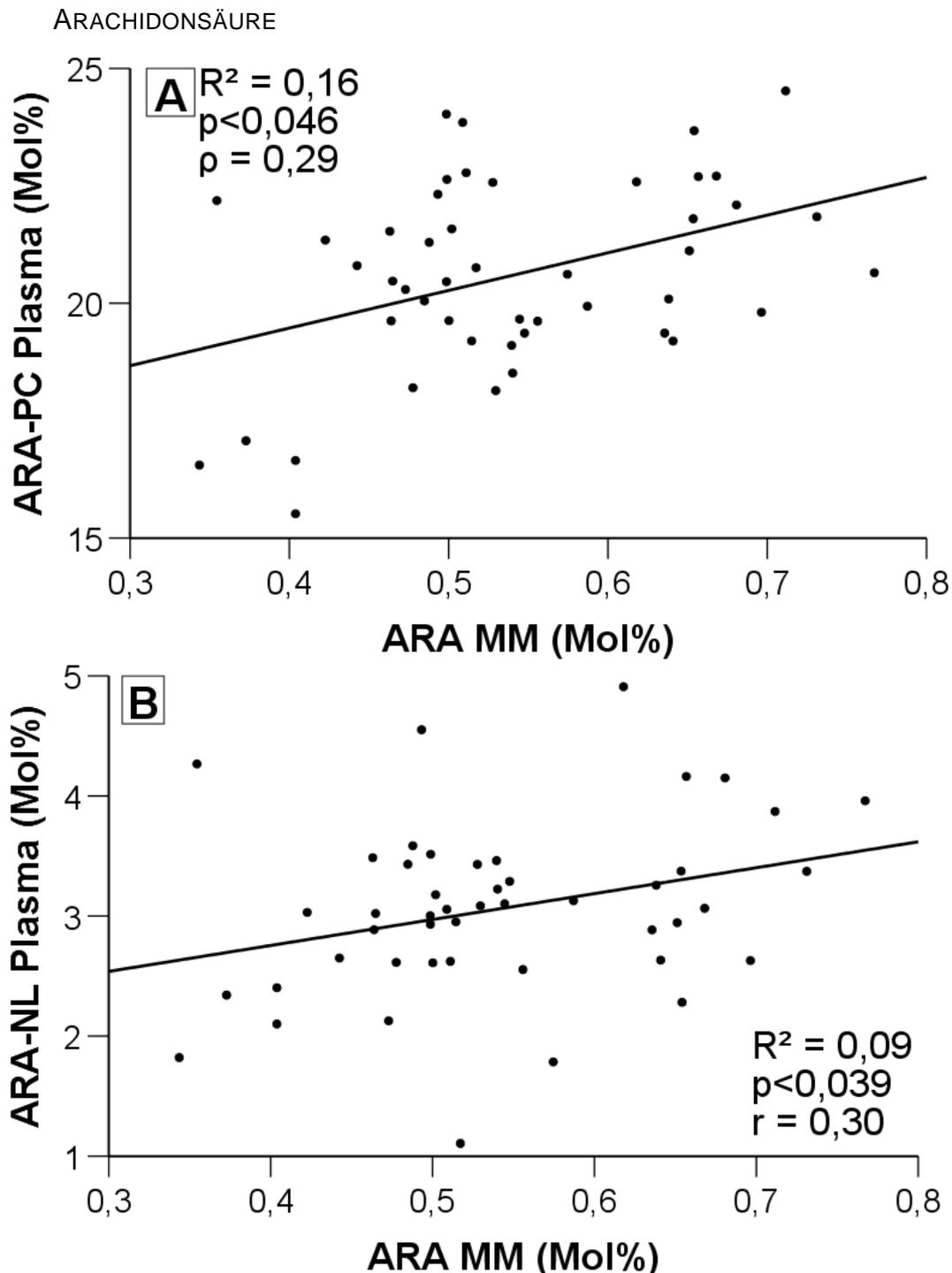


Abbildung 28 A+B: Korrelation ARA-PC (A) und ARA-NL (B) im Plasma mit ARA der MM bei den Kindern ohne DHA Supplementation. Dargestellt sind Einzelwerte von Tag 0, 8 und 10 im Plasma der Kinder ohne DHA Supplementation sowie von Tag 0 der Kinder mit DHA Supplementation und die individuellen Mediane von ARA in der Muttermilch (N = 47). Die Daten in Abbildung A waren nicht normalverteilt. Korrelationskoeffizient nach Spearman. Signifikanzniveau: $p < 0,046$ (A). Die Daten in Abbildung B waren normalverteilt. Korrelation nach Pearson. Signifikanzniveau: $p < 0,039$ (B). Abkürzungen: ARA = Arachidonsäure; DHA = Docosahexaensäure; MM = Muttermilch; PC = Phosphatidylcholin

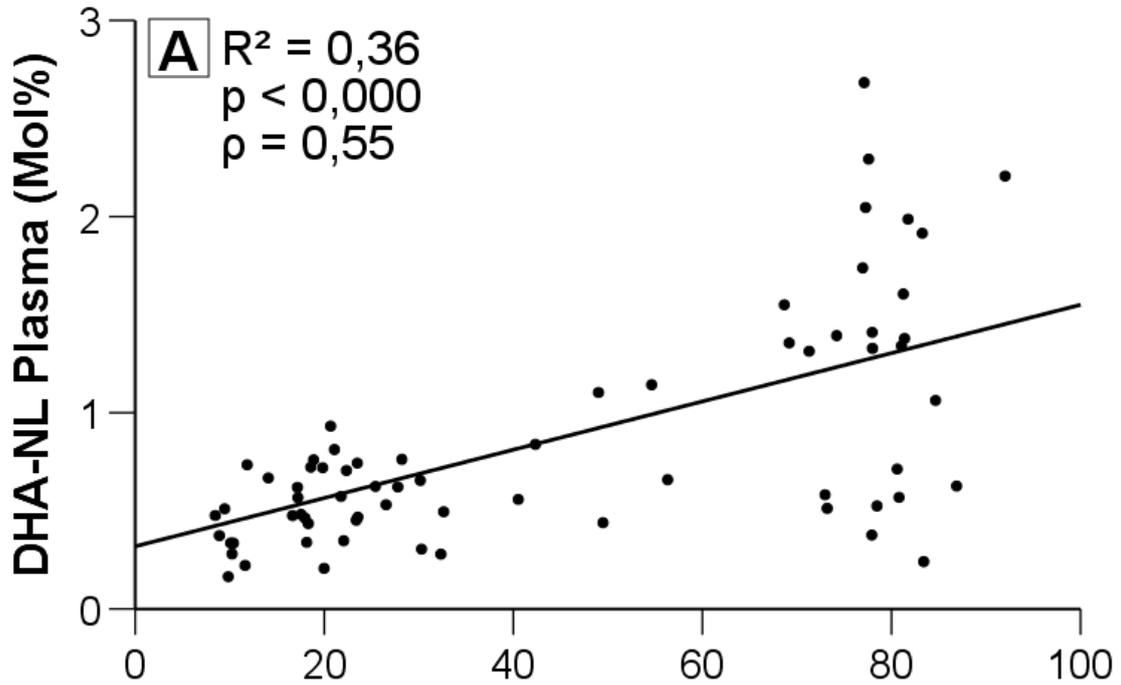
Bei den Probanden und Probandinnen, die kein DHA bekommen hatten, korrelierte der Anteil von ARA-PC (Mol% von Gesamt-PC) ($p = 0,29$; $p < 0,046$) sowie von ARA der Neutrallipide (NL) ($r = 0,30$; $p < 0,039$) mit dem Anteil von ARA in den TAGs (Mol%) der MM (s. Abbildung 28).

3.5.2.2 PLASMA VS GESAMTNAHRUNGSZUFUHR

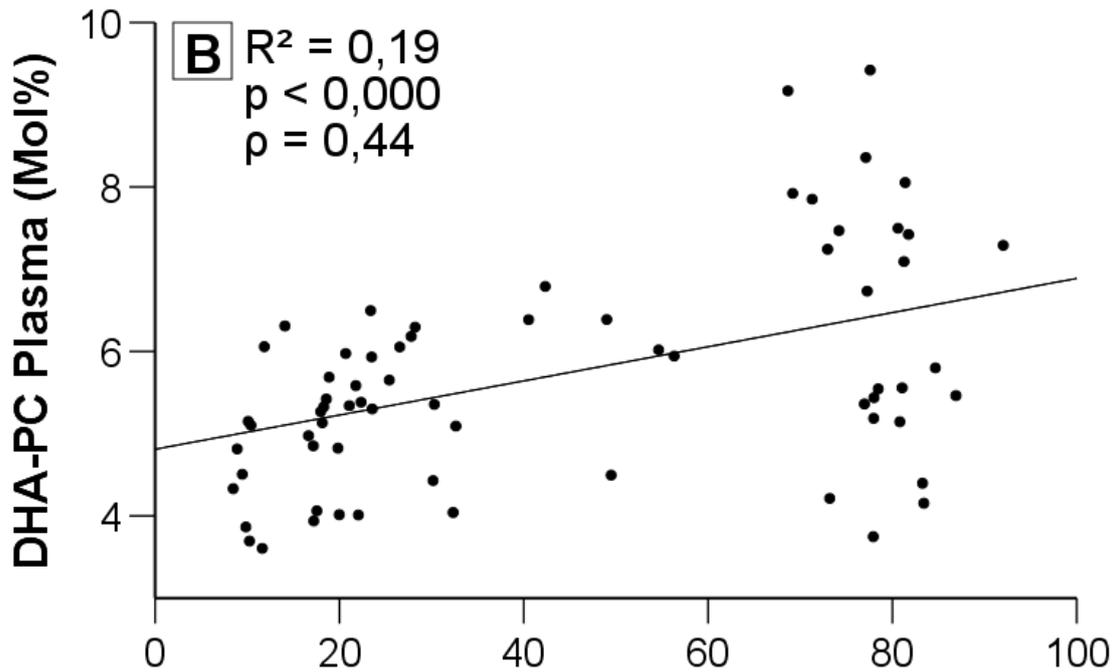
| DHA | | Alle Kinder | Kinder mit DHA-Suppl. | Kinder ohne DHA-Suppl. |
|--------------------------------------------------------------------|-------------------------|------------------|-----------------------|------------------------|
| Plasma-NL (Mol%) vs. DHA-Zufuhr via Gesamtnahrung (mg/kg/d) | Signifikanzniveau | 0,000 | 0,104 | 0,051 |
| | Korrelationskoeffizient | 0,550* (N 69) | 0,356 (N 22) | 0,286 (N 47) |
| | R ² | 0,357 | 0,066 | 0,118 |
| Plasma-PC (Mol%) vs. DHA-Zufuhr via Gesamtnahrung (mg/kg/d) | Signifikanzniveau | 0,000 | 0,816 | 0,183 |
| | Korrelationskoeffizient | 0,435* (N 69) | -0,053 (N 22) | 0,198 (N 47) |
| | R ² | 0,190 | -0,003 | -0,001 |
| ARA | | Alle Kinder | Kinder mit DHA-Suppl. | Kinder ohne DHA-Suppl. |
| Plasma-NL (Mol%) vs. ARA-Zufuhr via Gesamtnahrung (mg/kg/d) | Signifikanzniveau | 0,513 | 0,529 | 0,208 |
| | Korrelationskoeffizient | 0,080 (N 69) | 0,142 (N 22) | 0,187 (N 47) |
| | R ² | 0,010 | -0,032 | 0,068 |
| Plasma-PC (Mol%) vs. ARA-Zufuhr via Gesamtnahrung (mg/kg/d) | Signifikanzniveau | 0,174 | 0,662 | 0,016 |
| | Korrelationskoeffizient | 0,165 (N 69) | -0,099 (N 22) | 0,349* (N 47) |
| | R ² | 0,029 | -0,007 | 0,122 |

Tabelle 28: Plasmakonzentrationen von ARA und DHA in Relation zur Zufuhr von ARA und DHA über die Nahrung. Korreliert wurde das DHA/ARA -NL/-PC im Plasma mit den Medianen von DHA/ARA in der zugehörigen Gesamtnahrung. DHA-/ARA-PC wurde angegeben als Mol% vom Gesamt-PC. DHA-/ARA-NL wurden angegeben als Mol% der Neutrallipide. Datenermittlung s. Methodenteil. Angegeben wurde bei normalverteilten Werten der Pearson-, bei nicht normalverteilten Werten der Spearman-Korrelationskoeffizient. Zeichen: * = signifikant. Abkürzungen: DHA = Docosahexaensäure; NL = Neutrallipide; ARA = Arachidonsäure; PC = Phosphatidylcholin, Suppl. = Supplementierung; N = Anzahl.

DOCOSAHEXAENSÄURE



DHA Nahrungszufuhr (mg/kg/d)



DHA Nahrungszufuhr (mg/kg/d)

Abbildung 29 A+B: Korrelationen von DHA-NL (A) und DHA-PC (B) vs. DHA-Nahrungszufuhr bei allen Kindern. Dargestellt sind die DHA-Werte im Plasma von Tag 0, 8 und 10, sowie die Mediane von DHA der Tage 1, 7 und 9 in der zugehörigen Gesamtnahrung (N = 69). Die Werte waren nicht normalverteilt. Korrelationskoeffizient nach Spearman. Signifikanzniveaus: $p < 0,000$. Abkürzungen: DHA = Docosahexaensäure; PC = Phosphatidylcholin; NL = Neutrallipide

Tabelle 28 zeigt, dass DHA-NL ($\rho = 0,55$; $p < 0,000$) und DHA-PC ($\rho = 0,44$; $p < 0,000$) im Blut der Kinder mit der DHA-Zufuhr über die Nahrung korrelieren, wenn alle Gruppen zusammengefasst wurden (s. Abbildung 29 A+B). Wenn wir uns lediglich die Gruppe der Kinder mit/ohne DHA-Supplementation anschauen finden sich keine Korrelationen.

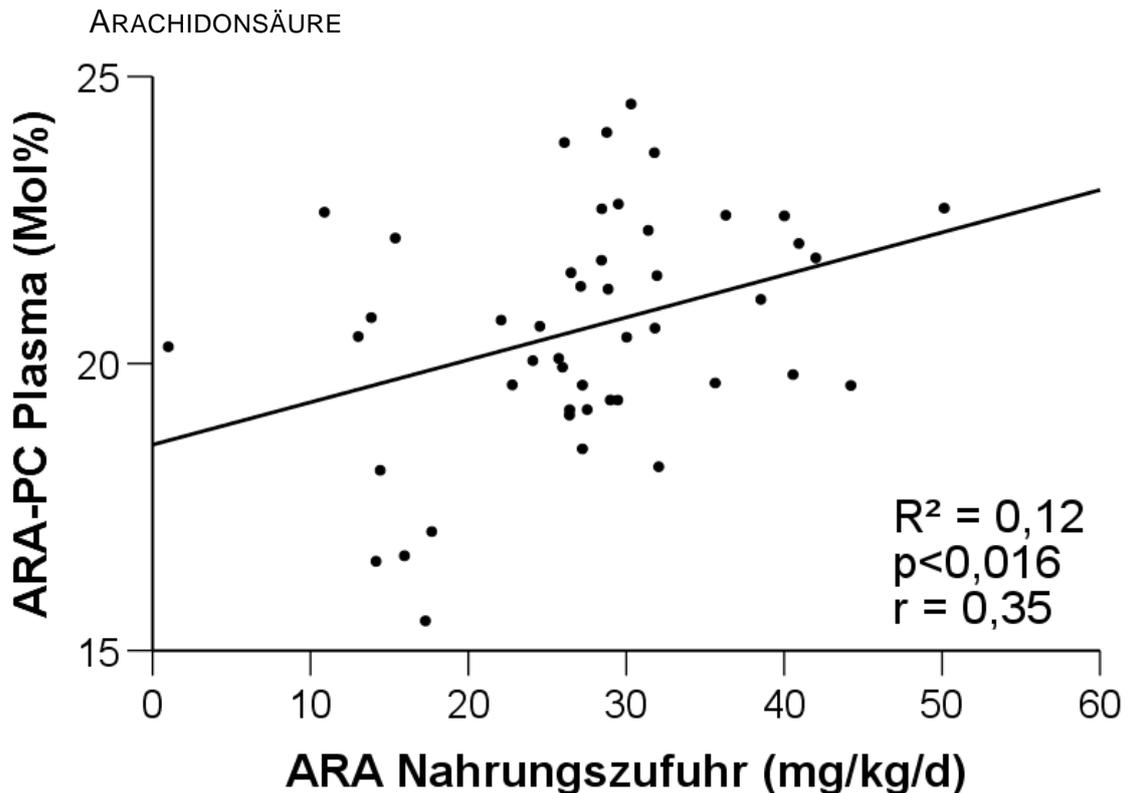


Abbildung 30: Korrelation von ARA-PC Plasma vs. ARA-Nahrungszufuhr bei den Kindern ohne DHA-Supplementation. Dargestellt sind Einzelwerte von Tag 0, 8 und 10 im Plasma verglichen mit den Einzelwerten der Nahrungszufuhr an Tag 1, 7 und 9 bei den Kindern ohne DHA Supplementation, sowie Tag 0 verglichen mit der Nahrungszufuhr an Tag 1 bei den Kindern mit DHA-Supplementation (N = 47). Die Daten waren normalverteilt. Korrelationskoeffizient nach Pearson. Signifikanzniveau: $p < 0,016$. Abkürzungen: ARA = Arachidonsäure; PC = Phosphatidylcholin.

Der Anteil an ARA-PC (Mol% von Gesamt-PC) im Plasma der Kinder ohne DHA-Supplementierung korreliert ($r = 0,35$; $p < 0,016$) mit der Nahrungszufuhr von ARA (s. Abbildung 30). Dies ist beim ARA-Anteil der NL nicht der Fall. Bei DHA-supplementierten Kindern korrelieren weder ARA-PC noch ARA in den NL mit der Nahrungszufuhr. Auch korrelieren die Werte nicht, wenn alle Gruppen zusammen berechnet werden (s. Tabelle 27).

4 DISKUSSION

Diese Studie wurde konzipiert, um den Effekt der Supplementierung der für Frühgeborene essenziellen Nährstoffe Cholin und DHA auf ihre Poolgröße und Plasmaparameter zu untersuchen. Letztendliches Ziel ist dabei die für ihre Entwicklung notwendige Verbesserung der Ernährung Frühgeborener. Die Supplementierung mit Cholin und DHA steht dabei im Kontext mit der basalen Zufuhr mit diesen Nährstoffen. Zielparameter des hier adressierten Studienteils waren daher die Konzentrationen von Cholin und DHA sowie der anderen damit assoziierten Nährstoffe und ihrer Metabolite. Das sind Cholinester in MM sowie DHA und ARA in Milchfett und das Vorkommen dieser Komponenten in der wässrigen und lipophilen Phase des Blutplasmas. Die Daten sind zudem Grundlage der Berechnung der Gesamtzufuhr bei den Frühgeborenen mit und ohne Supplementierung mit Cholin und DHA und der Beziehung zwischen ihrer Zufuhr und den Plasmakonzentrationen. Den Voruntersuchungen folgend habe ich nicht allein untersucht, ob die Supplementation die Plasmakonzentrationen der Zielparameter (Cholin, DHA) erhöht, sondern ob auch unter Kontrollbedingungen eine Beziehung zwischen Plasmaspiegeln und Konzentrationen in der Milch besteht. Ausgehend für diese Untersuchungen ist die Hypothese, dass sich die Entwicklung von FG durch eine höhere Zufuhr der kritischen essenziellen Nährstoffe Cholin und mehrfach ungesättigter Fettsäuren (PUFA=poly-unsaturated fatty acids) wie DHA verbessert. Grundkonzept ist dabei, dass der Stoffwechsel von Cholin und PUFA, zu denen auch ARA gehört, über Phospholipide wie PC eng verknüpft ist (Bernhard et al. 2018).

Aufgrund der Ergebnisse der N3RO-Studie mit negativem Ausgang bei alleiniger DHA-Supplementierung in gleicher Dosis (60mg/kg/d), wurde unsere Studie nach 24 statt 40 Patienten und Patientinnen aus ethischen Gründen abgebrochen, obwohl die Supplementierung bei stabilen FG ohne erhöhtes BPD-Risiko und nur für 10 statt mindestens 56 Tage stattfand. Basierend auf einem Signifikanzniveau von 0,05 und einer Power von 80% war eine Fallzahl von mindestens sieben Patienten und Patientinnen pro Studiengruppe geplant. Obwohl nur N=6/pro Gruppe untersucht werden konnten, wurden die Studienziele als „proof of principle“, das Erreichen einer quasi-fetalen Plasmakonzentration von Cholin und

die stärkere Erhöhung von DHA-PC durch kombinierte Gabe von Cholin und DHA, erreicht (Bernhard et al. 2019a).

4.1 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

4.1.1 MATERIAL UND METHODEN

Dieser Studienteil hat die Ziele, (1) die Konzentrationen, Schwankungen und den postnatalen Verlauf der essenziellen Nährstoffe Cholin, Docosahexaensäure (DHA) und Arachidonsäure (ARA) in der Milch von Müttern (MM) frühgeborener Kinder zu bestimmen, (2) den Effekt dieser Komponenten in MM auf ihre Plasmaparameter zu untersuchen und (3) die präzise Gesamtzufuhr unter Supplementierungsbedingungen zu bestimmen. Letzteres ist insofern wichtig, als bei schwankenden Konzentrationen in der MM die Gesamtzufuhr oberhalb der ESPGHAN-Empfehlungen liegen könnte (Agostoni et al. 2010). Wenngleich bekannt ist, dass Milch generell und auch beim Menschen im Verlauf eines Laktationsvorgangs ihre Zusammensetzung ändert (B. Koletzko 2019, S. 27), liefern die vorgestellten Untersuchungen detaillierte Daten zu den hier adressierten essentiellen Nährstoffen, sowie weiteren Cholinderivaten und Fettsäuren. Die Proben wurden als Teil der Cholin-DHA-Studie systematisch gesammelt und nur kurzfristig unter Lichtausschluss bei 4°C gelagert.

Die verwendeten Methoden der Extraktion der Zielanalyte sind etabliert und publizierte Standards (Bernhard et al. 2014; Bernhard et al. 2015; Bernhard et al. 2019c; Bligh und Dyer 1959), ebenso die Tandem-massenspektrometrische Analyse von Cholin, seinen Derivaten und der Phospholipide (Bernhard et al. 2014; Pynn et al. 2011) sowie der Neutrallipid-Fettsäuren mittels Gaschromatographie (Maas et al. 2017). Die gaschromatographische Analyse auch der kürzeren Fettsäuren mittels eines Massendetektors (MS) statt des hier verwandten Flammenionisationsdetektors (FID) würde das Bild weiter vervollständigen (Griffiths 2003).

Um die Werte darzustellen und sie miteinander zu korrelieren habe ich in der Regel für Cholin und seine Metabolite die Konzentration (mg/L oder $\mu\text{mol/L}$) und für Fettsäuren die Zusammensetzung (Mol%) herangezogen. Dies ist deshalb

von Bedeutung, da bei Fettsäuren nicht nur die Poolgrößenzunahme beachtet werden sollte, sondern vielmehr die Komposition der Fettsäuren untereinander. Somit kann eine veränderte Komposition von Fettsäuren durch eine, den Bedürfnissen nicht entsprechende Nahrungsaufnahme in den Zellen der Frühgeborenen, zu einer veränderten Zellfunktion führen (Innis 2007a). Eine hohe Zufuhr von Linolsäure kann die Komposition von ARA und DHA verringern. Dies kann Auswirkungen auf die neurologische Entwicklung haben (s. 1.5.4.2).

4.1.2 DEMOGRAPHISCHE DATEN

Das postmenstruelle Alter, sowie das Gewicht der Kinder ist in den unterschiedlichen Gruppen annähernd gleichverteilt. Trotz der randomisierungsbedingten Ungleichverteilung der Geschlechter der FG (insgesamt 9 bei Geburt weiblich und 14 bei Geburt männlich zugewiesen) und im Gruppenvergleich (s. Tabelle 20) ergaben sich bei den Zielparamtern im Plasma signifikante Daten (Bernhard et al. 2019a), die aufgrund von Voruntersuchungen nicht dem Geschlecht zuzuordnen sind (Bernhard et al. 2015).

4.1.3 ERGEBNISSE ZUR ZUSAMMENSETZUNG DER MUTTERMILCH

4.1.3.1 CHOLIN

Die Werte zum Gesamtcholin sowie der einzelnen Cholinkomponenten bestätigten weitgehend frühere Studiendaten dieser Arbeitsgruppe (Maas et al. 2017), mit dem Unterschied dass durch höhere analytische Auflösung der Milch-Phospholipide die PC-Werte niedriger und die SM-Werte höher sind, ohne in ihrer Summe zu differieren (vergleiche hierzu (Maas et al. 2017)). Im Median betrug das Gesamtcholin der Muttermilch 138,6 (112,6-164,3) mg/L, entsprechend 20,8 (16,9-24,7) bei vollem Nahrungsaufbau (150mL/kg/d). Phosphocholin und Glycerophosphocholin stellten die Hauptvertreter der cholinhaltigen Komponenten der untersuchten MM dar, was zeigt, dass sich hinsichtlich Cholin die MM von Müttern Frühgeborener kompositionell nicht von der Reifgeborener unterscheidet (Holmes-McNary et al. 1996; Maas et al. 2017). Die Cholinzufuhr über seine wasserlöslichen Phosphatester ist charakteristisch für die Stillphase und gilt auch für andere Säuger. Nur in utero findet diaplazentar eine direkte

Versorgung mit freiem Cholin statt (Zeisel 1981). Nach der Stillphase wird der Bedarf vorwiegend über fettlösliche Cholinester (PC, SM, Lyso-PC) und freies Cholin gedeckt (Patterson et al. 2015). Ein Grund für diese spezielle Zusammensetzung mag die schnelle Anreicherung von Phosphocholin und Glycerophosphocholin im Blut und Leber sein, sowie die höhere Verfügbarkeit dieser Stoffe im neonatalen Gehirn (Cheng et al. 1996).

Betain und Dimethylglycin der MM wurden in dieser Studie in einer höheren Konzentration gemessen als in vergleichbaren Studien bspw. der Studie von Maas et al. 2007. Betain lag in meinen Messungen bei 1,21(0,79-1,71)mg/L im Gegensatz zu 0,52(0,27-0,78)mg/L (Maas et al. 2017) und Dimethylglycin (DMG) bei 3,89(0,03-5,91)mg/L im Vergleich zu 0,09(0,00-0,33)mg/L (Maas et al. 2017). DMG schwankt in der MM stark (0,03-5,91mg/L). Methionin wurde mit lediglich 0,001(0,000-0,01)mg/L gemessen. In vorherigen Messungen lag der Wert bei 0,12(0,04-0,32)mg/L (Maas et al. 2017). Diese Schwankungen könnten sich dadurch erklären, dass sich das postnatale Alter der Kinder in den beiden Studien unterscheidet (17,5 (12 bis 25) Tage versus Maas et al 27 (6 bis 85) Tage). Ebenso war das postmenstruale Alter bei Geburt unterschiedlich: 28,3 (25,7 bis 30,8) versus 30,1 (25,4 bis 32,0) Wochen. Dass die Konzentration der Stoffe im Verlauf der Laktation sinkt ist bereits in der Literatur beschrieben (Jeong et al. 2010). Außerdem könnten diese Schwankungen durch unterschiedliche Ernährungsgewohnheiten erklärt werden, die in dieser, wie auch in der Studie von Maas et al nicht hinreichend evaluiert wurden. Alles in Allem liegen diese Komponenten allerdings nur in gegenüber Cholin geringen Konzentrationen in der MM vor. Wiedemann et al stellt eine Übersicht unterschiedlicher Studien dar, welche Cholin und seine Metabolite in der Muttermilch untersuchten (Wiedemann et al. 2018a). Hierbei fällt auf, dass in einer koreanischen Studie der Cholin Gehalt in der Muttermilch deutlich höher war 25,68 (+/- 16,40 mg/L) (Jeong et al. 2010), als in anderen Studien (beispielsweise 8,63 (+/- 0,83 mg/L) mg/L (Fischer et al. 2010b), USA). Dies könnte beispielsweise an unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten in Korea vs. den USA liegen (Patterson et al. 2015).

4.1.3.2 FETTSÄUREN

| | | Ergebnisse d. Studie (g%) (Deutsch- land) | Maas et al (g%) (Deutsch- land) | Berseth et al (g%) (USA) | Luukkai en et al (g%) (Finn- land) | Jang et al (g%) (Korea) | Nilsson et al (g%) (Schwe- den) |
|-------------------------|--------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------------|
| Laurinsäure | C12:0 | 10,39 (8,72-12,03) | 7,50 (4,53-10,16) | 9,33 (7,51-11,34) | - | 9,19 (+/- 2,29) | 4,50 (3,19-5,98) |
| Myristin- säure | C14:0 | 4,91 (4,15-5,60) | 8,18 (6,27-10,06) | 8,94 (7,41-10,60) | 7,47 (5,38- 9,56) | 8,89 (+/- 3,17) | 9,40 (7,54-11,25) |
| Palmitin- säure | C16:0 | 28,33 (26,51- 30,37) | 20,18 (18,80- 21,70) | 20,62 (18,90-22,05) | 28,27 (26,4- 30,19) | 21,60 (+/- 2,42) | 24,55 (22,6- 26,34) |
| Palmitolein- säure | C16:1 n-7 | 0,87 (0,72-1,04) | 3,33 (2,72-3,89) | 2,09 (1,57-2,55) | 3,54 (3,26- 3,82) | 2,84 (+/-0,79) | 1,73 (1,47-2,28) |
| Stearinsäure | C18:0 | 5,92 (5,37-6,70) | 7,07 (6,28-7,89) | 5,47 (5,01-6,22) | 9,80 (9,20- 10,40) | 6,12 (+/- 1,01) | 6,04 (5,11-6,72) |
| Ölsäure | C18:1 | 33,66 (31,69- 35,65) | 35,60 (33,15- 39,16) | 28,05 (25,44-30,10) | 39,17 (36,4- 41,97) | 26,8 (+/- 4,36) | 36,15 (33,4- 38,97) |
| Linolsäure | C18:2 n-6 | 11,21 (9,78- 12,93) | 12,83 (10,95- 14,53) | 16,75 (15,13-18,95) | 8,80 (7,54- 10,06) | 15,4 (+/- 4,84) | 8,33 (7,43-9,49) |
| γ- Linolensäure | C18:3 n-6 | 0,13 (0,10-0,16) | 0,16 (0,13-0,20) | 0,09 (0,06-0,13) | - | 0,61 (+/- 1,87) | 0,04 (0,03-0,07) |
| Arachin- säure | C20:0 | 0,24 (0,21-0,27) | 0,22 (0,19-0,26) | 0,15 (0,13-0,17) | - | 0,30 (+/- 0,10) | 0,18 (0,15-0,20) |
| α- Linolensäure | C18:3 n-3 | 0,99 (0,80-1,21) | 1,02 (0,81-1,33) | 1,26 (1,01-1,45) | 0,85 (0,71- 0,99) | 1,60 (+/- 0,77) | 1,12 (0,85-1,33) |
| Eicosatrien- säure | C20:3 n-6 | 0,23 (0,20-0,27) | 0,83 (0,70-0,96) | 0,52 (0,43-0,63) | 0,48 (0,40- 0,56) | 0,60 (+/- 0,15) | 0,36 (0,27-0,47) |
| Behensäure | C22:0 | 0,10 (0,08-0,12) | 0,10 (0,08-0,13) | 0,07 (0,05-0,08) | - | 0,19 (+/- 0,11) | 0,05 (0,04-0,06) |
| Arachidon- säure | C20:4 n-6 | 0,63 (0,56-0,73) | 0,81 (0,71-0,93) | 0,61 (0,53-0,69) | 0,59 (0,50- 0,68) | 0,82 (+/- 0,17) | 0,34 (0,27-0,39) |
| Eicosapen- taensäure | C20:5 n-3 | 0,35 (0,28-0,47) | 0,12 (0,10-0,15) | 0,04 (0,03-0,06) | 0,10 (0,08- 0,12) | 0,31 (+/- 0,18) | 0,05 (0,03- 0,06) |
| Docosate- traensäure | C22:4 n-6 | 0,14 (0,11-0,20) | 0,19 (0,14-0,24) | 0,15 (0,11-0,18) | - | 0,18 (+/- 0,07) | 0,14 (0,09-0,18) |
| Docosapen- taensäure | C22:5 n-6 | 0,13 (0,08-0,23) | - | 0,06 (0,04-0,08) | - | - | 0,03 (0,03-0,03) |
| Docosapen- taensäure | C22:5 n-3 | 0,11 (0,09-0,13) | 0,12 (0,10-0,14) | 0,12 (0,10-0,15) | 0,32 (0,21- 0,43) | 0,48 (+/- 0,19) | 0,17 (0,13-0,22) |
| Docosahex- aensäure | C22:6 n-3 | 0,46 (0,32-0,60) | 0,43 (0,35-0,59) | 0,23 (0,18-0,31) | 0,54 (0,43- 0,65) | 0,88 (+/- 0,38) | 0,29 (0,24-0,38) |

Tabelle 29: Fettsäurezusammensetzung der Milchlipide dieser Arbeit im Vergleich zu anderen Studien. Daten sind angegeben in g% als Mediane sowie die 25er und 75er Perzentile. (Berseth et al. 2014; Jang et al. 2011; Luukkainen et al; Maas et al. 2017; Nilsson et al. 2018)

Die Fettsäureprofile dieser Arbeit zeigen geringe Unterschiede im Vergleich zu anderen Ergebnissen (s. Tabelle 29). In der Komposition der Fettsäuren sind Myristinsäure, Palmitoleinsäure und Eicosatriensäure niedriger als in den meisten anderen Studien, Eicosapentaensäure hingegen höher. Diese Unterschiede in der Zusammensetzung der Muttermilch können beispielsweise durch Unterschiede in der Ernährung der Stillenden oder auch durch das Laktationsstadium begründet sein. Die unterschiedliche Fettsäurezusammensetzung der finnischen gegenüber der US-amerikanischen MM (s. Tabelle 29) könnte beispielsweise mit der geringeren Einnahme von Transfettsäuren, sowie einer vergleichsweise reichen Diät mit Meeresprodukten zusammenhängen (Pietinen et al. 2010; Wanders et al. 2017). Ebenso hat der Ausschluss bestimmter Fettsäuren aus der Analyse, zum Beispiel C12:0 und bestimmten C22-Fettsäuren einen Einfluss auf das errechnete Fettsäureprofil. Jang et al haben in einer Studie mit 105 Koreanischen Mütter ähnliche EPA Konzentrationen gemessen, wie in dieser Studie (s. Tabelle 29) (Jang et al. 2011). In einer schwedischen Studie wurden ähnliche Werte an Eicosatriensäure und Palmitoleinsäure gemessen (s. Tabelle 29) (Nilsson et al. 2018). Niedrige Konzentrationen von Myristinsäure wurden in der Muttermilch von chinesischen und US-amerikanischen Müttern gefunden (Yuhas et al. 2006).

Die Studien verdeutlichen übereinstimmend, dass ARA und DHA in der Muttermilch nur zu einem geringen Prozentsatz vorhanden sind. Auch ALA als Präkursor für DHA ist minimal vertreten. Docosatetraensäure (C22:4n-6), ein Elongationsprodukt von ARA, das zusammen mit ARA bei der Gehirnentwicklung und Schwangerschaft eine wichtige Rolle spielt (Ghebremeskel et al. 2000; Zhu et al. 2019), ist mit 0,14 (0,11-0,20) ebenfalls nur in geringer Konzentration vorhanden.

Das Verhältnis der Mediane von LA:ARA und ALA:DHA ist, wie im Ergebnisteil gezeigt (s. Tabelle 23), in der MM höher als im Plasma der Kinder, d. h. 19,3 (16,0-23,3) vs. 5,9 (5,0-6,9), bzw. 2,7 (2,0-3,6) vs. 1,1 (0,8-1,7). Das ARA:DHA Verhältnis im Plasma der Kinder ist höher als in der MM und sinkt durch isolierte Supplementierung mit DHA von ca. 6:1 auf 2:1. Da das Verhältnis von ARA:DHA

im PC des Nabelschnurplasmas in der 27. SSW 5:1 beträgt (Bernhard et al. 2014), ist es fraglich, ob das durch die Supplementierung erreichte in vivo-Verhältnis von 2:1 für das Entwicklungsstadium von Frühgeborenen wünschenswert ist. Vielmehr implizieren die Ergebnisse, dass eine Supplementierung der Nahrung mit ARA, zusätzlich zu der mit DHA, ein entwicklungsadäquates ARA:DHA-Verhältnis bei gleichzeitiger Erhöhung der Gesamtkonzentrationen auf physiologische Werte erbrächte.

4.1.3.3 CHOLIN, ARACHIDONSÄURE UND DOCOSAHEXAENSÄURE IN DER MUTTERMILCH: INTER- SOWIE INTRAINDIVIDUELLE UNTERSCHIEDE UND ZEITLICHER VERLAUF

Dass die inter- sowie intraindividuellen Konzentrationen der Nährstoffe in der Muttermilch variieren, ist bereits aus älteren Publikationen bekannt (Gao et al. 2018; Maas et al. 2017). Genaue Ursachen sind noch nicht hinreichend erforscht und setzen sich vermutlich aus einer Vielzahl an Faktoren, wie Genetik, Ernährung, Alter der Mütter, vorangegangene Schwangerschaften und Laktationsstadium zusammen. So weisen Muttermilchproben aus Ländern mit hohem Fischkonsum eine höhere Konzentration an DHA und EPA auf (Luukkainen et al; Yuhas et al. 2006).

Die Tagesprofile der Studienteilnehmerinnen zeigen eine hohe Variabilität. Das Tageszeitprofil zeigt, dass die durchschnittliche Komposition von ARA morgens zu nachts (-0,47, 95%-CI[-0,93, -0,01], $p < 0,04$) und abends zu nachts (-0,5, 95%-CI[-0,97, -0,01], $p = 0,04$) abnahm. Wohingegen für Gesamtcholin und DHA keine signifikanten Unterschiede bestehen (s. 3.2.5). Publikationen, die sich mit dieser Fragestellung bereits auseinandergesetzt hat, wurden nicht gefunden. Schwankungen im Verlauf der Tageszeit sind jedoch im klinischen Alltag von Bedeutung, zum Beispiel wenn die Mutter nicht ganztägig stillt und die MM zu anderen Tageszeitpunkten abgepumpt, als sie verfüttert wird. Die im Durchschnitt tieferen ARA-Werte (Mol%) zur Nacht könnten dadurch erklärt werden, dass die Stillenden nachts in der Regel keine Hauptmalzeiten mehr zu sich nehmen und Sie somit zur Energiemobilisation Fett verbrennen.

Darüber hinaus spielt der längerfristige Verlauf von Konzentrationen eine Rolle. Postnatal sinkt die CholinKonzentration der MM linear ab (s. Abbildung 19). Ausgehend davon, dass Nährstoffgehalte an den Bedarf des reifen NG angepasst sind, der postnatal sinkt, entspricht die MM nach drei Monaten nicht dem Bedarf des NG. Darüber hinaus sinkt die Wachstumsgeschwindigkeit des FG nicht, weil nach der 24. SSW der physiologische Wachstumsschub stattfindet. Zusätzlich zum für FG unzureichenden Cholingehalt in der MM, spiegelt der sinkende Cholingehalt den zunehmenden Bedarf von FG nicht wider. Via MM wird weniger Cholin zugeführt, als via Placenta in utero, sodass der Plasmaspiegel des FG innerhalb von 48h um 50% sinkt (Bernhard et al. 2015; Zeisel 2006).

Die Konzentrationen von ARA und DHA hingegen sind in der MM ohnehin gering und sinken im Verlauf der ersten 14 postnatalen Wochen nur leicht ab (Maas et al. 2017). Dies ist vereinbar damit, dass der bleibend hohe Bedarf an diesen Fettsäuren für die lange Entwicklung des Gehirns (Innis 2007a) insbesondere über das an ARA und DHA reiche Depotfett reifgeborener Kinder gewährleistet wird (Foreman-van Drongelen et al. 1995). Für Cholin, das eine sehr kurze Plasmahalbwertszeit hat, gibt es einen solchen Speicher nicht. Es ist lediglich ein schnell verfügbarer Pool wasserlöslicher Metabolite in den Zellen vorhanden, während der Rest des Cholins in parenchymalen Strukturen (PC und SM von Membranen) eingebaut ist (Bernhard et al. 2019c). Er kann nur auf Kosten der Parenchymstrukturen mobilisiert werden, z. B. aus der Lunge zur Versorgung der Leber ((Li et al. 2007b).

4.1.3.4 ZUFUHR DER STOFFE ÜBER MUTTERMILCH

Bei 14 Probanden und Probandinnen wurde über die MM eine volle enterale Ernährung („full feed“) von mindestens 150ml/kg/d erreicht, während neun Probanden und Probandinnen weniger als 150ml/kg/d erhielten. Ein Kind hat keine MM erhalten (s. Tabelle 25). Dies unterstreicht, ähnlich wie vorherige Untersuchungen (Bernhard et al. 2013), wie schwierig es ist, bei FG eine ausreichende Muttermilchernährung zu erreichen.

4.1.4 BEZIEHUNG ZWISCHEN ZUFUHR VIA MUTTERMILCH/FORMULA UND KONZENTRATIONEN IM PLASMA

Die Cholin- sowie die Betainkonzentration im Plasma der Kinder korreliert mit dem Gehalt an Gesamtcholin in der MM (s. Abbildung 23). Ein großer Teil des Cholins wird zu Betain metabolisiert (Bernhard et al. 2004; Bernhard et al. 2019a; Bernhard et al. 2019b; Grothe et al. 2015). Cholin hat einen schnellen Turnover ($t_{1/2} < 1.5\text{h}$) (Bernhard et al. 2019c; Bernhard et al. 2019b) und beim FG fällt die Plasmakonzentration von Cholin innerhalb von 48 Stunden um die Hälfte ab (Bernhard et al. 2015). Die Wirksamkeit des Cholins in MM auf den Plasmaspiegel ist am Ehesten über die frequente Nahrungszufuhr (6-12/d) erklärbar.

Bei mangelnder Zufuhr wird Cholin bzw. PC aus peripheren Organen freigesetzt, sodass die Konzentration nicht auf 0 absinken kann (Li et al. 2007b). Jedoch korreliert auch die Gesamtcholinaufnahme durch die Nahrung (Zusatznahrung, Supplementation und MM) signifikant mit dem Cholin- und Betainkonzentration im Blut der FG. Die Konzentrationen von Cholin und Betain im Blut lassen sich durch Cholinsupplementation zusätzlich steigern. So stieg Cholin von 23,1 (17,7-25,7) auf 35,4 (32,8–41,7) $\mu\text{mol/L}$ (Bernhard et al. 2019a), den Werten reifgeborener Kinder zum Zeitpunkt der Geburt (Bernhard et al. 2015). Bei nicht cholinsupplementierten FG hingegen sank sie während 10d Studiendauer auf 17,8 (16,1–22,4) $\mu\text{mol/L}$ (Bernhard et al. 2019a). In anderen Studien, in denen Erwachsene D9-Cholin erhielten, war 3h nach der Supplementierung kein D9-Cholin mehr im Blut zu detektieren. D9-markiertes Betain wurde mit ähnlicher Kinetik gemessen. Dies zeigt, dass eine schnelle Betainsynthese aus Cholin erfolgt (Bernhard et al. 2004; Grothe et al. 2015). Auch im Plasma der FG war D9-markiertes Betain nachweisbar (Bernhard et al. 2019a).

Es wurde im Plasma der FG eine 10-fach höhere direkte D9-Cholin Anreicherung im PC gemessen, als die über die deuterierten Methylgruppen von D9-Betain ablaufende Synthese von D3-PC via PEMT-Pathway (Bernhard et al. 2019a). Das zeigt, dass PC bei Frühgeborenen vorwiegend de novo über den Kennedy-Pathway mit direkter Verwendung von Cholin gebildet wird, als über die Nutzung

von Cholin als Methylgruppenlieferant via Betain. DHA-PC und ARA-PC werden bei Erwachsenen ausschließlich bzw. vorwiegend über den PEMT-Pathway synthetisiert (Bernhard et al. 2015; Pynn et al. 2011). Da die Kombination von DHA mit Cholin das DHA-PC im Plasma stärker erhöhte als alleinige DHA-Gabe (Bernhard et al. 2019a), könnte die zusätzliche Cholingabe die Verfügbarkeit von übertragbaren Methylgruppen via Betain erhöhen.

Bei Kindern ohne DHA-Supplementierung ist MM die einzige externe Quelle für DHA. Die Fettspeicher sind aufgrund der Frühgeburt nicht hinreichend vorhanden, da die Fettanreicherung erst zunehmend im dritten Trimenon stattfindet (Wiechers et al. 2021) und Frühgeborene eine Erniedrigung von DHA (und ARA) zugunsten von Linolsäure entwickeln (Böckmann et al. 2020). Die Korrelation zwischen DHA in den Plasmalipiden und DHA in der MM bei den Kindern ohne Supplementierung (s. Abbildung 27) zeigt, dass Nahrungs-DHA der wesentliche Faktor für die DHA-Versorgung der Organe ist. Zudem zeigt sich im Vergleich mit vs. ohne Supplementierung und bei der Korrelation von DHA in den Plasmalipiden mit der Gesamt-DHA-Aufnahme durch die Nahrung (MM, Supplementierung und Zusatznahrung) (s. Abbildung 29), dass sich die DHA-Konzentration in den Plasma-Lipiden als Substrat für die Organversorgung durch die Nahrungszufuhr bei FG steigern lässt.

In der Studie wurde zudem gezeigt, dass sich DHA durch gleichzeitige Supplementierung von Cholin stärker steigern lässt (Bernhard et al. 2019a). So stieg der Anteil an DHA-PC im Gesamt-PC bei Kombinationsgabe stärker als bei alleiniger DHA-Gabe. Hinweise darauf, dass sich die DHA Konzentration durch Cholin Supplementierung steigern lässt, wurde bereits an einer anderen Studie am Menschen (West et al. 2013) und einer tierexperimentellen Studie gezeigt (Thomas Rajarethnem et al. 2017). Dies untermauert die Bedeutung von Cholin für den Metabolismus von DHA, die vorwiegend via PC der Plasma-Lipoproteine transportiert wird.

Durch Supplementierung mit 60mg/kg/d haben die FG ca. 4-mal so viel DHA bekommen wie über die normale Ernährung 20,3 (17,5-23,2) vs. 77,4 (72,0-80,4). DHA-PC ist im Plasma jedoch nur von 5,1% (4,2-6,2) auf 7,8% (7,1-8,8)

gestiegen (Bernhard et al. 2019a). Dies kann daran liegen, dass andere Fettsäuren mit dem Stoffwechsel von DHA (und ARA) konkurrieren. Insbesondere ist der Anteil an Linolsäure in der postnatalen Ernährung sehr hoch, sodass sie den Anstieg an DHA verdrängen können, während Linolsäure in der Fetalperiode in der Mutter retiniert und DHA (sowie ARA) im Fetus angereichert wird (Bernhard et al. 2016; Haggarty 2010; Novak et al. 2012).

Die Komposition von ARA in den Plasmalipiden (PC, Neutrallipide) der Kinder, die keine DHA-Supplementation erhalten haben, korreliert direkt mit der Konzentration von ARA in MM (s. Abbildung 28), wie auch mit der Zufuhr durch die komplette Nahrung (s. Abbildung 30). Sobald die Kinder, die DHA als Supplementation erhalten haben zur Korrelation hinzugefügt werden, zeigt sich die Korrelation als nicht mehr signifikant (s. Tabelle 28). Eine hohe Supplementation von DHA führt im Gehirn neonataler Primaten zu einem Absinken der Konzentration an ARA (Hsieh et al. 2007). Zudem zeigte die DIAMOND Studie, in der reifgeborenen Kindern 12 Monate lang direkt nach der Geburt verschiedene Mengen von DHA bei gleichbleibender ARA-Dosis supplementiert wurden, dass bei der höchsten DHA Konzentration in der Nahrung (0.96% DHA, 0.64% ARA) die Konzentration von ARA in den Erythrozyten signifikant abnimmt und die zu erwartende Zunahme der kognitiven Funktion ausbleibt (Colombo et al. 2017). Dies zeigt eindeutig die Wichtigkeit einer Supplementation mit adäquatem ARA:DHA-Verhältnis. Der geringe absolute Effekt der DHA-Supplementation gegenüber einer unveränderten, für Feten und FG unphysiologischen, Dominanz von Linolsäure (LA) zeigt, dass nicht die Zufuhr von DHA und ARA allein, sondern die generelle Fettsäureimbilanz der Frühgeborenenernährung das wirkliche Problem ist. Die Bedeutung einer zu hohen LA-Zufuhr wurde bislang nicht untersucht.

4.2 DISKUSSION DER FRAGESTELLUNG / KLINISCHE RELEVANZ

4.2.1 WIRD DER BEDARF AN CHOLIN, ARACHIDONSÄURE UND

DOCOSAHEXAENSÄURE ÜBER DIE MUTTERMILCH GEDECKT? WELCHE

SUPPLEMENTIERUNG SOLLTE ANGESTREBT WERDEN?

| | Zufuhr | | Plasmakonzentrationen | |
|---------------|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| | Reale Zufuhr via MM (mg/150ml) | Empfehlung (mg/kg/d) | Unreif (<37 SSW) (Nabelschnurblut) | Reif (37-42 SSW) (Nabelschnurblut) |
| Cholin | 21 | 8-55 (ESPGHAN) >>25 (Bernhard et al. 2013) >54 (Bernhard et al. 2019a) | 47 (32-60) µmol/L (24-27 SSW) (Bernhard et al. 2015) | 35 (30-41) µmol/L (♀29µmol/L, ♂38µmol/L) (Bernhard et al. 2015) |
| ARA | 23 | 140 (Clandinin et al. 1981) | 38% (ARA-PC) (24-27 SSW) (Bernhard et al. 2014) | 37% (ARA-PC) (Bernhard et al. 2014) 23% (ARA-PC) (Innis 2005) |
| DHA | 16 | 43 (Lapillonne und Jensen 2009) | 8% (DHA-PC) (24-27 SSW) (Bernhard et al. 2014) | 15% (DHA-PC) (37-42 SSW) (Bernhard et al. 2014) 14% (DHA-PC) (Innis 2005) |

Tabelle 30: Mediane Aufnahme, Empfehlungen und Fetale Plasmawerte von Cholin, ARA und DHA. Abkürzungen: MM = Muttermilch; ARA = Arachidonsäure; DHA = Docosahexaensäure; SSW = Schwangerschaftswoche.

Mit dieser Studie habe ich bestätigt, dass die Muttermilch selbst bei vollem Kostaufbau (150ml/kg/d) keine ausreichende Quelle für Cholin, ARA und DHA für die Ernährung von Frühgeborenen darstellt (s. Tabelle 30).

Durch Supplementation mit 30mg/kg/d Cholin erhielten die FG im Median 61,6 (60,5-66,5) mg/kg/d Gesamtcholin über die komplette Nahrung (MM, Frühgeborenennahrung und Studiensupplementierung) mit einem Range von 55,9-73,9 mg/kg/d. Mit 62mg/kg/d liegen wir über dem oberen Bereich der ESPGHAN Empfehlung. Hiermit wurden Durchschnittswerte von 36,9 (29,7 – 40,5) µmol/L im Plasma erreicht, was nahe an den fetalen Werten (Nabelschnurblut) liegt (Tabelle 30). Dies zeigt, dass der tatsächliche Bedarf an Cholin für FG im oberen Bereich der ESPGHAN Empfehlung von 55mg/kg/d oder sogar darüber liegt. Es zeigt sich außerdem, dass die Untergrenze von 8mg/kg/d nicht ausreichend ist, um FG hinreichend mit Cholin zu versorgen. Dies deckt

sich auch mit Bilanzberechnungen zur Zunahme des PC/SM-Pools von ca. 20mg/kg/d im 3. Trimenon (Bernhard et al. 2019a) sowie dem Befund, dass Cholin zu einem erheblichen Teil zu Betain metabolisiert wird und der Bereitstellung übertragbarer Methylgruppen statt der PC/SM-Synthese dient (Bernhard et al. 2004; Bernhard et al. 2019b; Bernhard et al. 2019a; Grothe et al. 2015). Die Fettsäuren ARA und DHA werden hauptsächlich über PC transportiert (Bernhard et al. 2018). Durch die gleichzeitige Supplementation von DHA und Cholin wurde eine erhöhte DHA-PC Aufnahme erreicht (Bernhard et al. 2019a). Daraus ergibt sich, dass MM ohne Supplementierung für den Cholinbedarf von FG nicht hinreichend ist und dass das durchschnittliche Defizit mit einer Supplementierung von ~30mg/kg/d Cholin ausgeglichen werden kann. Dies entspricht 40mg/kg/d Cholinchlorid (die hier angewandte Form) und erfordert die Umrechnung bei anderen Cholinsupplementen (Cholinbitartrat, α -Glycerophosphocholin (α -GPC) oder PC) aufgrund unterschiedlicher Molekulargewichte (s. Tabelle 31).

| | Molare Masse (g/mol) | Entsprechen 30mg Cholin (mg) |
|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------|
| Cholinchlorid | 139,63 | 40 |
| Cholinbitartrat | 253,25 | 73 |
| α -Glycerophosphocholin | 257,22 | 74 |
| Phosphatidylcholin | 750 | 216 |

Tabelle 31: Masse der Cholinsupplemente entsprechend 30mg Cholin. Cholin hat eine molare Masse von 104g/mol. Somit lässt sich bestimmen, wie hoch die Menge eines Supplementes sein muss um eine Supplementierung mit 30mg/kg/d an Cholin zu erreichen.

Vergleichen wir die empfohlene Höhe der ARA- und DHA-Zufuhr für Frühgeborene mit der Zufuhr via MM (Tabelle 30), ergibt sich ein durchschnittliches Defizit von 117mg/kg/d für ARA und 27mg/kg/d für DHA. Die Anreicherung von DHA im Plasma-PC wurde durch die gleichzeitige Supplementation von Cholin gesteigert. Durch die Supplementation mit 60mg/kg/d DHA wurde eine mediane Zufuhr von 77,4 (72,0-84,4) mg/kg/d erreicht. Dies entspricht dem 1,8-fachen der Empfehlungen von 43 mg/kg/d (Tabelle 30). Trotzdem wurde damit kein ausreichender Anstieg des Anteils von DHA-PC im Plasma der FG erreicht, die den fetalen Werten entsprechen. Hingegen blieb LA-PC mit 45,03 (42,82-47,54) Mol% vorherrschendes Plasma-

Phospholipid (Bernhard et al. 2019a). Die naheliegende Erklärung für die unzureichende Steigerung von DHA-PC (%) ist, dass FG durch MM bzw. Formulanahrung einen hohen Gehalt an Linolsäure erhalten und das Dünndarmepithel, entgegen der Plazenta, keine selektive Barriere für LA darstellt. sodass LA in metabolischer Konkurrenz zu DHA (und ARA) steht (Bernhard et al. 2014).

Die alleinige Supplementation von DHA ohne ARA und Cholin sowie ohne Adressierung des LA-Problems reflektiert den aktuellen Wissensstand nicht. Eine ausschließliche DHA Supplementation führt dazu, dass ARA für die neuronale Zellentwicklung verdrängt wird und dies eher zu negativen Effekten führen kann (Koletzko et al. 2015). Dies könnte besonders bei FG weitreichende Folgen haben, da diese nicht auf einen ARA-Pool im Fettgewebe zurückgreifen können. Es wird postuliert, dass die Supplementation von DHA mit ausreichender ARA-Gabe zu einem verbesserten Gehirnwachstum (van de Lagemaat et al. 2011) und kognitiven Funktionen (Henriksen et al. 2008) führt. In einer weiteren Studie in der LA, ARA und DHA supplementiert wurden, wurde eine gesteigerte Gewichts- und Längenzunahme wie auch eine Zunahme der kognitiven Entwicklung, jedoch nur bei den männlichen Probanden gemessen (Fewtrell et al. 2004; Henriksen et al. 2008).

Welche Menge von ARA und DHA zu einer ausreichenden Anreicherung führt, wird derzeit diskutiert. Sie sind in der MM in einem Verhältnis von ca. 2:1 vorhanden. Im PC des Nabelschnurplasmas liegen sie in der 24-27. SSW bei 5:1 und in der 37-42. SSW bei 2,5:1 (s. Tabelle 30). So könnte vermutet werden, dass der Bedarf an ARA bei sehr unreifen FG besonders hoch ist (Bernhard et al. 2014; Henriksen et al. 2008). Zudem ist die Konzentration von ARA-PC im Nabelschnurplasma in der 24.-42. SSW durchgehend hoch, wohingegen DHA erst in der 37. SSW ansteigt (Bernhard et al. 2014). Henriksen et al supplementierten FG für neun Wochen mit jeweils 30mg/kg/d ARA und DHA, wodurch Sie eine Anreicherung der Gesamtlipide im Plasma von 63,1 (+/- 20,5) mg/ml auf 70,8 (+/- 21,3) mg/ml DHA erreichten, wohingegen DHA in der Kontrollgruppe um 6mg/ml sank. Durch die Supplementation von 30mg/kg/d ARA

sank die Konzentration von ARA im Plasma von 202,5 (+/-44,9) mg/ml auf 190,2 (+/-54,0) mg/ml, wohingegen die Konzentration in der Kontrollgruppe um 49mg/ml sank (Henriksen et al. 2008). Dies legt nahe, dass der Bedarf an ARA höher ist als 30mg/kg/d und ein Verhältnis von über 1:1 angestrebt werden sollte. Eine Supplementation von ARA:DHA im Verhältnis von 2:1 führte in einer Studie mit 45 FG zu einer verbesserten psychomotorischen Entwicklung (Alshweki et al. 2015). Wir haben in dieser Studie durch die Supplementation von 60mg/kg/d DHA und 30mg/kg/d Cholin eine Steigerung von 5.1(4.7-6.3)% auf 7.8(7.5-8.5)% DHA-PC erreicht (Bernhard et al. 2019a). Somit wird deutlich, dass DHA gemeinsam mit Cholin supplementiert werden sollte. Da auch ARA zu einem erheblichen Teil über den PEMT-Pathway im Plasma-PC gelangt (Bernhard et al. 2015; Pynn et al. 2011), setzt die optimale Verstoffwechslung von sowohl DHA als auch ARA eine ausreichende Cholinversorgung voraus.

Hilfreich könnte es neben der Supplementation sein, eine Reduktion anderer Fettsäuren, insbesondere von Linolsäure anzustreben. Die DHA-Zufuhr wurde mit 60mg/kg/d Supplementation verfünffacht und die ARA:DHA-Ratio über die Nahrung jedoch von 1,5-2 auf ca. 0,3 gesenkt. Damit wurde zwar bewirkt, dass die ARA:DHA-Ratio im Blut der Kinder ein Verhältnis von 2:1 erreicht, nicht aber eine Normalisierung der DHA/LA- und ARA/LA-Ratios im Plasma-PC. Ob FG eine Änderung dieser Ratios auf fetale Werte benötigen, ist noch unklar. Die parenterale Gabe von SMOFlipid® (Fresenius Kabi), welches unter anderem Fischöl enthält, zeigte eine Abnahme von ARA sowie eine Zunahme an EPA, aber keinen Effekt auf DHA im Plasma der Kinder (Repa et al. 2018; Najm et al. 2017; Nilsson et al. 2019). Zudem konnte weder eine Verringerung der ernährungsbedingten Cholestase (Repa et al. 2018), noch eine verbesserte Wachstumsrate (Najm et al. 2017) gemessen werden. Auch dies spricht dafür, dass eine ARA-Supplementation anzustreben ist und dass weitere Forschungen benötigt werden, um herauszufinden, mit welcher Art der Supplementation optimale ARA- und DHA Werte erreicht werden.

4.2.2 AUSGLEICH INTERINDIVIDUELLER SCHWANKUNGEN IN DER MUTTERMILCH

Die Variabilität in der Cholin-, ARA sowie DHA-Konzentration der Muttermilch könnte besser gedeutet werden, wenn weitere Forschungen zu genetischen und individuellen Faktoren durchgeführt würden. Es gibt Bemühungen die Makronährstoffe der MM im klinischen Setting zu messen und individuell mit den benötigten Makronährstoffen zu ergänzen. Damit kann eine verbesserte Wachstumsrate erzielt werden (Fusch 2019; Rochow et al. 2013). Die genutzten Fortifier zur Anreicherung der MM decken jedoch den Mikronährstoffbedarf von FG nicht, insbesondere nicht hinsichtlich Cholin, ARA und DHA (siehe oben).

4.2.3 WIRKUNG DER SUPPLEMENTIERUNG VON CHOLIN, ARACHIDONSÄURE UND

DOCOSAHEXAENSÄURE

Die aktuelle Datenlage zur Frage, ob die Intelligenz der FG durch die Supplementierung von Cholin oder DHA beeinflusst wird, ist inkonsistent. Die erhöhte Plasmakonzentration von Betain, dem primären Oxidationsprodukt von Cholin und Quelle fast aller Methylierungsprozesse (Epigenetik, Kreatinbildung etc.) (Lambou et al. 2013; Ueland 2011) zeigte eine verbesserte visuelle Entwicklung, jedoch ohne Verbesserung der kognitiven und sprachlichen Entwicklung (Caudill et al. 2018; Wiedeman et al. 2018b). Andere Studien zeigen eine positive Korrelation der Betainkonzentration im Plasma fünf Jahre alter Kinder und ihrer sprachlichen Entwicklung (Strain et al. 2013). Cheatham et al (2012) haben keine signifikanten Unterschiede in der Gedächtnisleistung und sprachlichen Entwicklung von 12 Monate alten Kindern gefunden, deren Mütter 750mg Cholin über Phosphatidylcholin von der 18 SSW an bis 90 Tage nach der Geburt erhielten (Cheatham et al. 2012). Hier wurde jedoch nicht gemessen, ob die in North Carolina lebenden Mütter vor der Substitution einen Mangel an Cholin aufwiesen (Cheatham et al. 2012).

Eine Studie von Gould et al. (2017), in welchen Schwangeren täglich, während der zweiten Hälfte der Schwangerschaft, mit 800mg DHA supplementiert wurden, stellte keine signifikante Erhöhung des Intelligenzquotienten oder des Sprachverständnisses ihrer Kinder im Alter von 4 und 7 Jahren fest. Jedoch

wurde in der DHA-Gruppe von mehr Verhaltensauffälligkeiten berichtet (Gould et al. 2017). In einer weiteren Untersuchung, in der Schwangeren 800mg DHA von der 21. SSW bis zur Geburt erhielten, wurden die kognitiven und sprachlichen Fähigkeiten der 18 Monate alten Kinder und die postnatale Depression der Mütter 6 Monate nach der Geburt untersucht. Es wurden keine Unterschiede gemessen (Makrides et al. 2010). Die DIAMONT Studie (DHA intake and measurement of neuronal outcome) kommt bei kombinierter DHA-/ARA-Supplementierung jedoch zu positiven Ergebnissen: hier lässt sich nach einem Jahr Supplementierung eine Steigerung der Sehschärfe (Birch et al. 2010) und nach 18 Monaten eine Steigerung der kognitiven Entwicklung messen (Drover et al. 2011). Ähnliches haben bereits Birch et al und Willatts et al mit kombinierter DHA-/ARA-Supplementierung bestätigt. Auch hier ließ sich die geistige Entwicklung durch eine kombinierte Gabe in den ersten Lebensmonaten signifikant steigern (Birch et al. 2000; Willatts et al. 1998).

Zusammenfassend ist zu schließen, dass die Supplementierung Frühgeborener mit ARA UND DHA nach der Geburt zu einem besseren Outcome hinsichtlich der neuronalen Entwicklung führt als die alleinige Supplementierung mit DHA oder die Supplementierung der Schwangeren (Uauy et al. 2001).

Die Studienlage zur Beziehung mehrfach ungesättigter Fettsäuren zu Entzündungsprozessen ist ebenfalls inkonsistent. Hawkes et al (2002) haben keine signifikante Beeinflussung der Cytokinkonzentrationen in der Muttermilch durch die Supplementierung Stillender mit 600mg DHA und 140mg EPA gemessen (Hawkes et al. 2002). Eine andere Studie zeigte, dass erhöhte EPA-Konzentrationen in der Milch und im Plasma der Kinder positiv mit cytotoxischen T-Zellen korrelieren (Korrelationskoeffizient: 0,2; $p < 0,02$) (Muc et al. 2015). Somit ist es schwierig genaue Aussagen darüber zu machen, ob und wenn ja welche ungesättigten Fettsäuren protektiv gegen die Entwicklung allergischer Erkrankungen wirken. Eine randomisierte Multizenterstudie ergab, dass die Supplementierung Stillender mit 3g DHA pro Tag das Risiko frühgeborener Jungen und VLBW Kinder zur Entwicklung einer bronchopulmonalen Dysplasie verringert (Manley et al. 2011). Gegenteilige Ergebnisse fanden sich, wenn die

FG direkt mit 60mg/kg/d supplementiert wurden (Collins et al. 2017). Ursache dafür ist möglicherweise, dass die DHA-Gabe an die Mütter bei gleichzeitiger fetaler Versorgung mit ARA und Cholin abläuft, während die direkte Gabe von DHA an das FG nicht mit ARA und Cholin-Zufuhr assoziiert ist. Bemerkenswerterweise ging die Begründung der – erfolglosen – N3RO-Studie zur Prävention der BPD mit 60mg/kg/d DHA von Untersuchungen an Versuchstieren aus, in denen eine kombinierte ARA/DHA-Supplementierung der neugeborenen Tiere oder eine DHA-Gabe an das trächtige Muttertier erfolgte. Trotzdem erfolgte in der Studie keine zusätzliche ARA Supplementation (Collins et al. 2017).

Es wird vermutet, dass ein ungünstiges Verhältnis von ARA:DHA inflammatorische Prozesse fördern könnte (Maurer und Stebut 2004; Rooy et al. 2017). Ob durch die Supplementation von ARA und DHA die Konzentration von EPA ungünstig beeinflusst wird, ist noch weiter zu erforschen. Obwohl EPA im Plasma der Kinder im recht geringen Maße vorhanden ist (Bernhard et al. 2014; Makrides et al. 1994), scheint es als Substrat der Bildung antiinflammatorischer Eicosanoide (z.B. Prostaglandin E3 statt E2, das aus ARA gebildet wird) eine wichtige Rolle in der Regulation von Entzündungsprozessen zu spielen (Larsson et al. 2004).

4.2.4 ART DER SUPPLEMENTIERUNG VON CHOLIN UND DER FETTSÄUREN

Nicht geklärt ist die Frage, in welcher Zusammensetzung die Cholinkomponenten sowie die Fettsäuren gegeben werden sollten. In der MM liegt Cholin überwiegend in Form wasserlöslicher organischer Ester vor. Über die Nabelschnur erhalten die Kinder dennoch vorwiegend freies Cholin. Ob die Zufuhr von wasserlöslichen Metaboliten für neugeborene Kinder besser geeignet ist als die von beispielsweise PC, ist noch ungeklärt und wird gerade in unserer Gruppe bearbeitet. PC lässt die Konzentration von Cholin im Plasma länger und stärker ansteigen als Cholinchlorid (Hirsch et al. 1978). Da Galle viel PC enthält, sollte PC im Darm des NG, vielleicht auch des FG, nach Spaltung durch Pankreas- und Dünndarm-Phospholipasen verdaubar sein. Andererseits könnte der Cholinmangel von FG, ähnlich wie bei Mukoviszidose-Patienten und -

Patientinnen teilweise durch erhöhte fäkale Verluste bedingt sein (Chen et al. 2005). Zudem ist ungeklärt, ob die Gabe von ARA und DHA als Neutrallipid oder als ARA-PC und DHA-PC vorteilhafter ist. Im fetalen Plasma lassen sich ARA und DHA als Bausteine von PC, Triglyceriden und Cholesterinestern sowie als freie Fettsäuren nachweisen (Innis 2005). Welches die beste realistische Darreichungsform ist, ist bislang unklar. Auch um die adäquate Tagesdosis von Cholin, ARA und DHA bei Frühgeborenen zu ermitteln, sind weitere Studien erforderlich. Nötig ist zudem die Untersuchung der Frage, ob eine ausreichende Versorgung dieser Membranbausteine zu einem verbesserten Parenchymwachstum gegenüber einer reinen Gewichtszunahme, und auf lange Sicht zu einem verbesserten kognitiven und allgemeinen Outcome führt.

Bedeutsam ist die Klärung möglicher Nebenwirkungen. Besondere Aufmerksamkeit sollte hier einem möglichen Konzentrationsanstieg von Trimethylaminoxid (TMAO) im Plasma von FG gelten. Ein Anstieg der Konzentration wurde bei uns allerdings nicht gemessen. Es entsteht in der Leber aus Trimethylamin, das von Darmbakterien aus Cholin gebildet wird (Al-Waiz et al. 1992). TMAO steht im Verdacht, das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen zu erhöhen, indem es zur Entstehung von Arteriosklerose beiträgt (Wang et al. 2011). Zudem wird vermutet, dass es kolorektale Karzinome bei Männern begünstigt (Lee et al. 2010; Wang et al. 2011). Die TMAO Plasmakonzentration Erwachsener wird durch orale Zufuhr wasserlöslicher Cholinkomponenten, nicht aber von PC, durch intestinale Mikrobiota erhöht, welche Cholin im Darm zu TMA spalten (Tang et al. 2013; Wang et al. 2011). Spätere Untersuchungen der eigenen Abteilung haben gezeigt, dass Frühgeborene durch diese Komponenten keinen TMAO-Anstieg bekommen (Bernhard+Franz, unveröffentlicht).

Zu beachten ist, dass Frühgeborene in einem anderen Entwicklungsstadium als Erwachsene sind und wegen der, sogar gegenüber Reifgeborenen, mehrfach höheren Wachstumsrate einen höheren Bedarf an Cholin als Bestandteil von Strukturmolekülen (PC, SM) und als Methylgruppendonator haben. Deshalb muss ein späteres Risiko zur Förderung spezifischer Karzinome zwar mitbedacht, jedoch nicht überbewertet werden. Mit der Miteinbeziehung möglicher

Nebenwirkungen und den aus dieser Pilotstudie gewonnenen Erkenntnissen wurde das Fundament für größere multizentrische Studien geschaffen.

4.3 SCHLUSSFOLGERUNG AUS DER ARBEIT

Über die Muttermilch erhielten Frühgeborene bei vollem Kostaufbau (150mL/kg/d) im Median täglich 20,8 (16,9-24,7 Interquartilenrange) mg Gesamtcholin, sowie 22,7 (17,1-27,6) mg Arachidonsäure und 16,3 (10,7-21,5) mg Docosahexaensäure. Phosphocholin und Glycerophosphocholin stellten die Hauptvertreter der cholinhaltigen Komponenten der untersuchten MM dar, was zeigt, dass sich hinsichtlich Cholin die MM Frühgeborener kompositionell nicht von der Reifgeborener unterscheidet. Der Gehalt an Gesamtcholin, ARA und DHA in der MM korrelierte mit den Konzentrationen im Plasma der Kinder. Die Werte schwankten interindividuell. Der Gehalt an Gesamtcholin in der MM sank im Verlauf zwischen der 1. Woche und der 5. Woche nach Geburt um den Faktor 0,6.

Nicht-supplementierte Muttermilch ist zur adäquaten Versorgung von Frühgeborenen mit Cholin, ARA und DHA nicht hinreichend und deckt im Vergleich zu offiziellen Leitlinien nur 38%, 16% und 37% des Bedarfs Frühgeborener.

Die Cholin Supplementierung von 30mg/kg/d zusätzlich zur Basiszufuhr erhöhte die Cholin-Plasmakonzentration auf annähernd fetale Werte und steigerte zudem die Plasmakonzentration von DHA-PC. Über die Gesamtnahrungszufuhr (MM, Zusatznahrung und Studiensupplementierung) erhielten die Kinder im Median 62mg/kg/d. Dies zeigt, dass der tatsächliche Bedarf an Cholin für FG im oberen Bereich der ESPGHAN Empfehlung von 55mg/kg/d, oder sogar darüber, liegt. Es zeigt außerdem, dass die Untergrenze von 8mg/kg/d nicht ausreichend ist, um FG hinreichend mit Cholin zu versorgen. Der Betaingehalt in der MM ist mit 0,2 (0,1-0,3) mg/150ml niedrig. Der Anstieg von Betain im Plasma des FG erfolgt daher möglicherweise durch endogene Synthese aus Cholin.

Durch die DHA-Zufuhr mit 60mg/kg/d wurden keine fetalen DHA-PC Plasmawerte erreicht, obwohl wir hiermit deutlich über der empfohlenen Zufuhr von 43mg/kg/d liegen. Wahrscheinlich liegt dies daran, dass die LA-Zufuhr über MM und Formulanahrung zu hoch ist und sie in metabolischer Konkurrenz zu ARA und DHA steht.

Da die ARA:DHA-Ratio durch die alleinige Gabe von DHA unphysiologische Werte erreicht und das FG durch die MM nicht ausreichend mit ARA versorgt wird, ist eine simultane ARA Supplementation im Verhältnis >1:1 anzustreben.

Die adäquate Fortifikation der MM mit Cholin, ARA und DHA ist Gegenstand aktueller Forschung. Dies beinhaltet zum einen die zuzuführenden Mengen und zum anderen die Zusammensetzung der Cholin-Komponenten als Salz oder organische Ester sowie die Zufuhr von ARA bzw. DHA als Neutrallipide oder gebunden an PC. Eine Erniedrigung des Linolsäuregehaltes in der Ernährung FG ist aufgrund seiner Konkurrenz mit dem ARA- und DHA-Metabolismus erstrebenswert.

5 ZUAMMENFASSUNG

Mit dieser Doktorarbeit habe ich die Zufuhr von Cholin, ARA und DHA über die MM und die Korrelation dieser Werte mit deren Konzentration im Plasma Frühgeborener untersucht. Ziel war, herauszufinden welchen Stellenwert Muttermilch als Lieferant dieser, für Frühgeborene essenziellen, Nährstoffe hat und das Verständnis über die Variationen im Gehalt dieser Nährstoffe, ihrer Metabolite sowie die Interaktion mit anderen Fettsäuren zu erweitern. Ausgehend für diese Untersuchungen ist die Hypothese, dass sich die Entwicklung von FG durch eine höhere Zufuhr der kritischen essenziellen Nährstoffe Cholin und der mehrfach ungesättigten Fettsäuren ARA und DHA verbessert.

In diese Studie wurden 24 FG mit einem Gestationsalter unter 32W eingeschlossen. Die Behandlungen bestanden aus 4 Behandlungsarmen. Eine Gruppe erhielt 30mg/kg/d Cholin, eine 60mg/kg/d DHA eine weitere Cholin + DHA für jeweils 10 Tage vs. standardernährte Kontrollgruppe. Außerdem wurden täglich MM-Proben entnommen und an drei Tagen Plasmaproben der FG. Die Ernährung der FG mit MM, Formula, weiteren Nahrungsergänzungen und dem Studiensupplement sowie das Tagesgewicht und postnatale Alter wurden ermittelt. Somit konnte, neben der Zufuhr über die MM, auch die Zufuhr über die gesamte Nahrung berechnet werden. Cholin, seine Derivate und die Phospholipide in der MM wurden mittels Flüssigkeitschromatographie und tandem-massenspektrometrischer Analyse untersucht, die Neutrallipid-Fettsäuren mittels Gaschromatographie der Fettsäuremethylester.

Insgesamt wurden 432 MM-Proben und 72 Plasmaproben analysiert. Die Zusammensetzung der Cholinkomponenten in der MM zeigte, dass Phosphocholin und Glycerophosphocholin die am stärksten vertretenen Komponenten sind. Ölsäure, Palmitinsäure und Linolsäure sind die mengenmäßig vorherrschenden Fettsäuren der Muttermilchlipide. 150ml Muttermilch enthalten 20,8 (16,9-24,7) mg Gesamtcholin, 22,7 (17,1-27,6) mg ARA und 16,3 (10,7-21,5) mg DHA. Die Muttermilchproben unterlagen in Ihrer Zusammensetzung hohen intra- und interindividuellen Schwankungen. Die Korrelation des Gesamtcholins mit dem postnatalen Alter belegt eine sinkende

Gesamtcholinkonzentration der MM ($p < 0,01$). Cholin- und Betainkonzentrationen im Plasma der FG korrelieren (1) mit der Konzentration des Gesamtcholins in der gefütterten MM ($p < 0,000$ und $p < 0,012$) sowie (2) mit der über die Gesamtnahrung aufgenommenen Menge an Gesamtcholin ($p < 0,000$). Im Plasma der Kinder, die kein DHA bekamen, korrelierte der DHA Anteil (-PC oder -NL) mit dem Anteil von DHA in der MM ($p < 0,000$). Gleiches gilt für die Korrelation von ARA im Plasma mit ARA in der MM ($p < 0,046$ für ARA-PC und $p < 0,039$ für ARA-NL). DHA (-PC oder -NL) im Plasma der Kinder aller Gruppen korreliert mit der DHA-Zufuhr über die Gesamtnahrung ($p < 0,000$). Der Anteil an ARA-PC im Plasma der Kinder ohne DHA-Supplementierung korreliert mit der ARA-Zufuhr über die Gesamtnahrung ($p < 0,016$).

Die Werte der einzelnen Cholinkomponenten und Fettsäureprofile sind im Einklang mit anderen Studien. Unterschiede zu den Medianen analoger Studien sowie inter- und intraindividuelle Konzentrationsschwankungen erklären sich durch Unterschiede im untersuchten postnatalen Alter der Kinder, Laktationsstadium, durch genetische und alimentäre Unterschiede von Populationen sowie vorangegangenen Schwangerschaften. Postnatal sinkt generell die Cholinkonzentration der MM linear ab.

Vor der 24.-32. SSW findet der physiologische Wachstumsschub des Feten statt, sodass der steigende Cholinbedarf Frühgeborener durch den sinkenden Cholingehalt in der MM noch weniger gedeckt wird, als es generell gilt, wenn MM gefüttert wird, die für Reifgeborene mit 3-4fach niedrigerer Wachstumsrate konzipiert ist. Durch Supplementation erhielten die FG 61,6 (60,5-66,5) mg/kg/d Gesamtcholin über die komplette Nahrung. Hiermit wurden Durchschnittswerte erreicht, die nahe an den fetalen Werten liegen. Durch die Supplementation von DHA lässt sich deren Konzentration in den Plasma-Lipiden bei FG steigern. Gleichzeitige Supplementation von Cholin steigert diesen Effekt. Dies untermauert die Bedeutung von Cholin für den Metabolismus von DHA, die vorwiegend via PC transportiert wird. Durch Supplementation mit 60mg/kg/d ist DHA-PC im Plasma dennoch nur gering gestiegen. Ursache scheint zu sein, dass insbesondere Linolsäure mit dem Stoffwechsel von DHA (und ARA) konkurriert.

Der Anteil an Linolsäure ist in der postnatalen Ernährung Frühgeborener unphysiologisch hoch. Eine ausschließliche DHA Supplementation führt langfristig zur Verdrängung von ARA. Studien und aktuelle Leitlinien weisen darauf hin, dass ein ARA:DHA Verhältnis in der Supplementierung von >1:1 angestrebt werden sollte.

Bislang nicht geklärt sind die Fragen nach der optimalen Zusammensetzung sowie der adäquaten Tagesdosis der zuzuführenden Cholincomponenten und Fettsäuren bei Frühgeborenen. Zudem ist es notwendig herauszufinden, ob eine ausreichende, d.h. höhere Zufuhr allein zu einem verbesserten Parenchymwachstum sowie kognitiven und allgemeinen Outcome führt.

Schlussfolgernd gilt, dass un-supplementierte Muttermilch nicht zur adäquaten Versorgung von Frühgeborenen mit Cholin, ARA und DHA hinreichend ist. Eine Cholinsupplementierung von 30mg/kg/d zusätzlich erhöht die Cholin-Plasmakonzentration auf annähernd fetale Werte. Durch die DHA-Zufuhr mit 60mg/kg/d werden keine fetalen DHA-PC Plasmawerte erreicht. Eine physiologischere Fettsäurebilanz bei der Ernährung von FG sollte angestrebt werden.

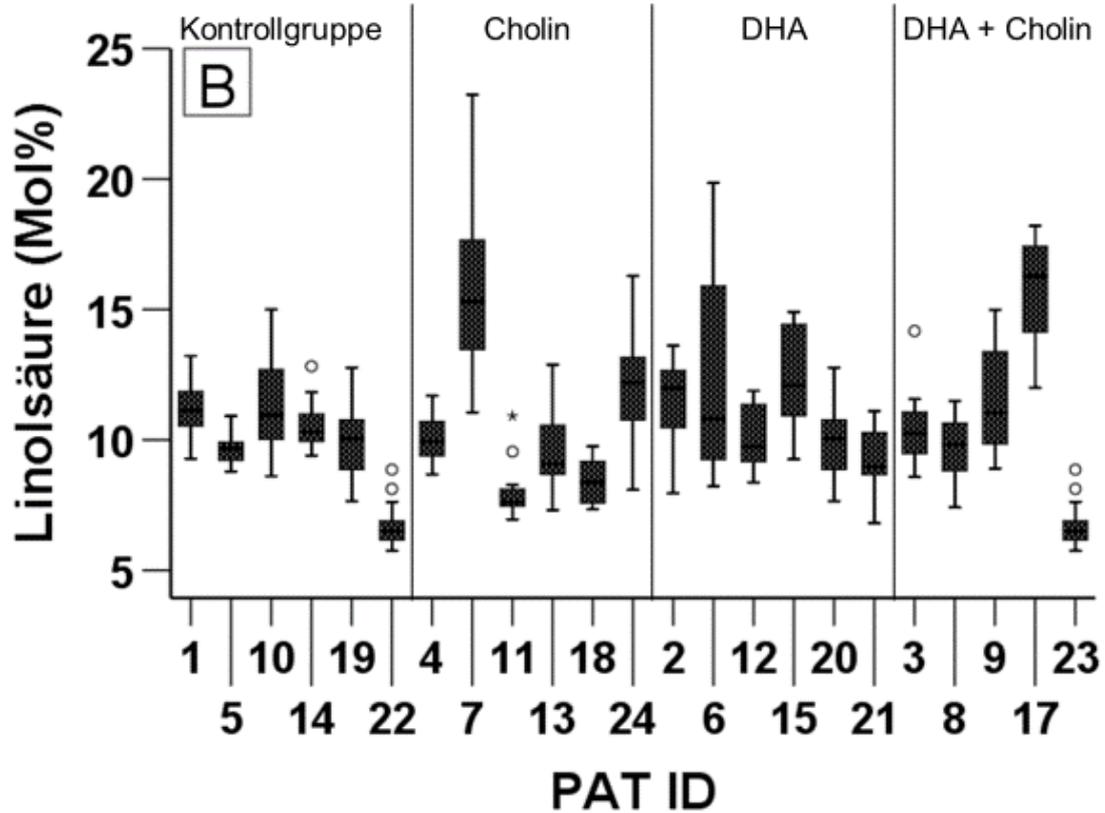
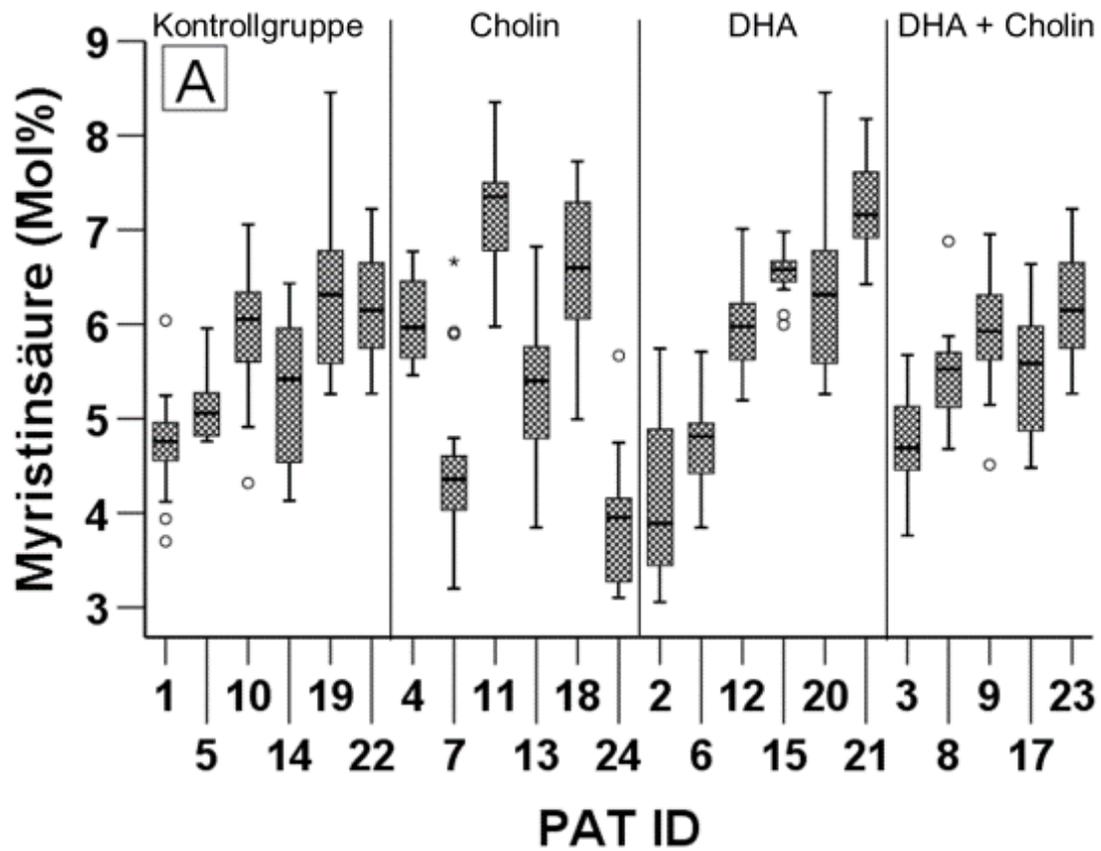
6 ANHANG

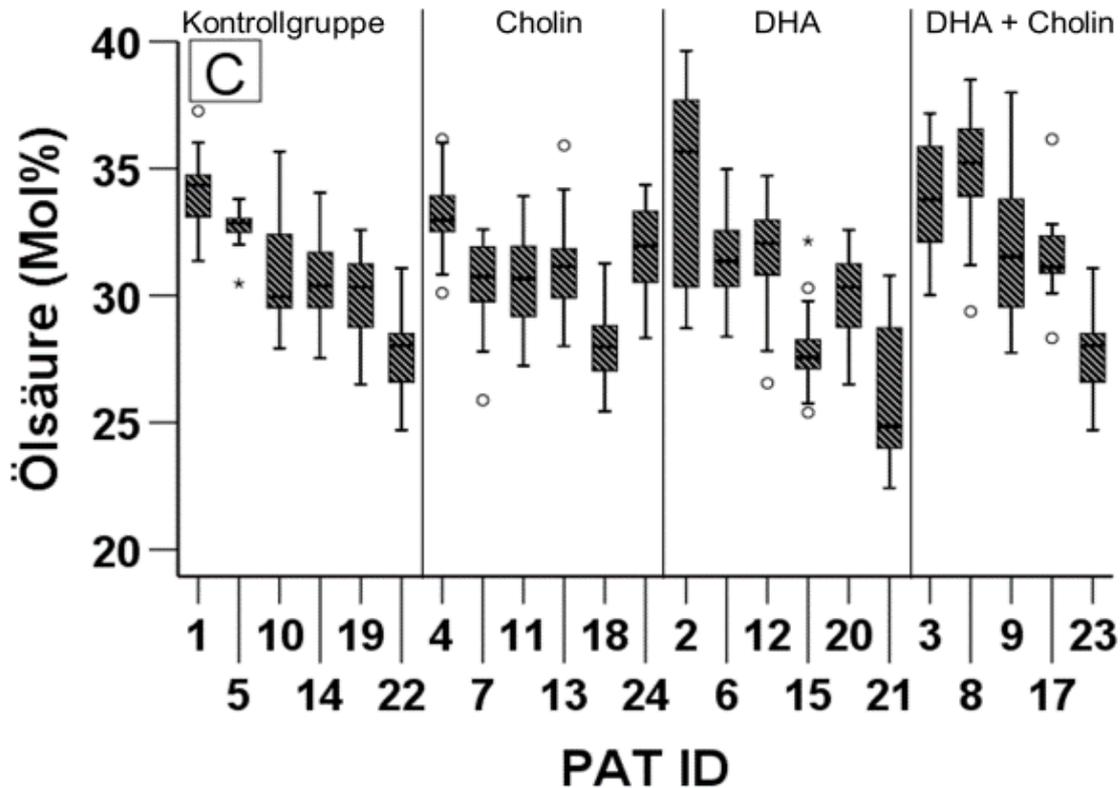
| Spezialnahrung für Frühgeborene unter 1800g Geburtsgewicht | | |
|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------|
| 1 | BEBA Frühgeborenenennahrung Stufe 1-2011-2012 | Fertig zur Nutzung |
| 2 | BEBA Frühgeborenenennahrung Stufe 1-2020 | Fertig zur Nutzung |
| 3 | BEBA Frühgeborenenennahrung Stufe 1 Pro HA-2015 | Fertig zur Nutzung |
| 4 | Aptamil Prematil-2020 | Fertig zur Nutzung |
| 5 | Aptamil Prematil HA-2020 | Fertig zur Nutzung |
| 6 | Aptamil Prematil HA-2015 | Fertig zur Nutzung |
| 7 | Humana 0-VLB-2015 | Fertig zur Nutzung |
| 8 | Humana 0 medical-2015 | Fertig zur Nutzung |
| 9 | Humana 0-VLB-2020 | Fertig zur Nutzung |
| Spezialnahrung für Frühgeborene über 1800g Geburtsgewicht | | |
| 10 | BEBA Frühgeborenenennahrung Stufe 2-2011-2012 | Fertig zur Nutzung |
| 11 | BEBA Frühgeborenenennahrung Stufe 2 Pro HA-2015 | Fertig zur Nutzung |
| 12 | Aptamil PDF-2016 | Fertig zur Nutzung |
| 13 | Aptamil PDF-2020 | Fertig zur Nutzung |
| 14 | Humana 0-2020 | Fertig zur Nutzung |
| 15 | Humana 0-HA-2020 | Fertig zur Nutzung |
| Spezialnahrung für Reifgeborene über 2500g Geburtsgewicht | | |
| 16 | BEBA HA Start PRE-2011 | Fertig zur Nutzung |
| 17 | BEBA HA PRE PRO HA-2015 | Fertig zur Nutzung |
| 18 | BEBA SUPREME PRE-2020 | Fertig zur Nutzung |
| 19 | Aptamil PRE-2011 | Fertig zur Nutzung |
| 20 | Aptamil PRE-2015 | Fertig zur Nutzung |
| 21 | Aptamil PRE-2020 | Fertig zur Nutzung |
| 22 | Aptamil GOS/FOS HA PRE-2015 | Fertig zur Nutzung |
| 23 | Humana Anfangsmilch PRE-2019 | Fertig zur Nutzung |
| Muttermilch-Fortifier für Frühgeborene | | |
| 24 | BEBA FM 85-2016 | 5,0% verdünnt mit Wasser |
| 25 | Nestlé Study B.M.S. | 5,0% verdünnt mit Wasser |
| 26 | BEBA FM-2019 | 4,0% verdünnt mit Wasser |
| 27 | Aptamil FMS-2016 | 4,4% verdünnt mit Wasser |

Anhang 1: Spezialnahrung und Muttermilch-Fortifier für Früh- und Reifgeborene. Am Ende des Produktnamen ist das Jahr des Mindesthaltbarkeitsdatums verfasst, in der dritten Zeile die Darreichungsform. (Shunova et al. 2020)

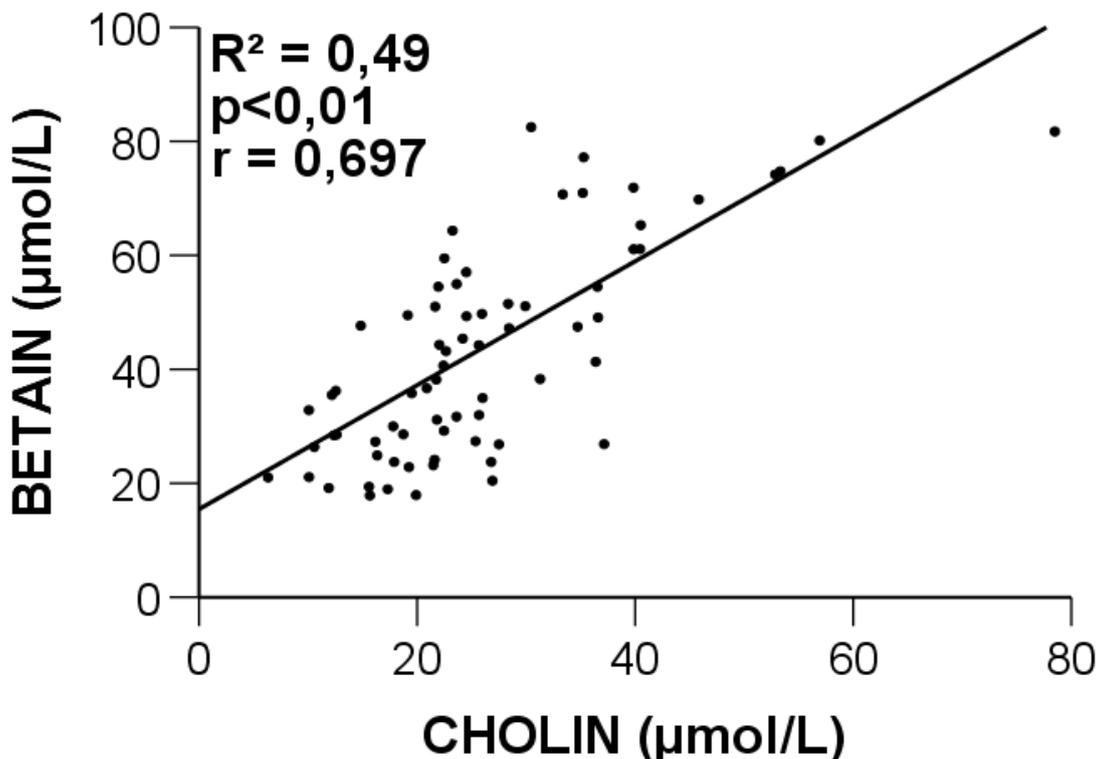
| PAT ID | Gesamt Cholin (mg/kg/d) | Cholin (mg/kg/d) | Phosphocholin (mg/kg/d) | Glycerophosphocholin (mg/kg/d) | PC (mg/kg/d) | Lyso-PC (mg/kg/d) | SPH (mg/kg/d) | DHA (mg/kg/d) | ARA (mg/kg/d) | Linol-säure (mg/kg/d) | Ölsäure (mg/kg/d) | Gesättigte FS (mg/kg/d) |
|-------------------|-------------------------|------------------|-------------------------|--------------------------------|--------------|-------------------|---------------|---------------|---------------|-----------------------|-------------------|-------------------------|
| 1 | 14,76 | 2,53 | 7,55 | 12,31 | 10,30 | 0,21 | 12,19 | 15,77 | 26,28 | 536,23 | 1.630,12 | 1.597,37 |
| 2 | 16,56 | 1,68 | 12,60 | 12,11 | 12,96 | 0,19 | 9,35 | 22,49 | 19,76 | 416,97 | 1.217,19 | 1.235,23 |
| 3 | 17,05 | 0,95 | 14,61 | 14,37 | 12,60 | 0,15 | 9,18 | 9,21 | 20,77 | 383,84 | 1.240,65 | 1.428,18 |
| 4 | 19,77 | 3,64 | 10,33 | 15,16 | 15,17 | 0,26 | 13,27 | 16,79 | 26,56 | 488,76 | 1.705,25 | 1.782,97 |
| 5 | 18,36 | 2,16 | 10,07 | 18,80 | 11,86 | 0,25 | 10,70 | 7,45 | 24,03 | 323,14 | 1.098,15 | 1.279,54 |
| 6 | 19,66 | 1,17 | 14,69 | 17,81 | 10,96 | 0,16 | 11,36 | 21,10 | 26,44 | 404,66 | 1.179,00 | 1.320,21 |
| 7 | 19,07 | 0,58 | 15,53 | 16,81 | 11,07 | 0,19 | 10,87 | 19,75 | 27,60 | 820,57 | 1.571,53 | 1.755,70 |
| 8 | 20,31 | 3,55 | 8,70 | 22,89 | 7,46 | 0,19 | 10,54 | 8,94 | 13,97 | 314,87 | 1.201,79 | 1.207,28 |
| 9 | 24,61 | 1,90 | 16,99 | 25,25 | 10,76 | 0,16 | 10,19 | 18,05 | 22,95 | 465,56 | 1.309,72 | 1.465,16 |
| 10 | 25,28 | 1,95 | 18,03 | 26,16 | 12,07 | 0,18 | 11,39 | 22,09 | 25,85 | 497,9 | 1.393,12 | 1.610,47 |
| 11 | 17,48 | 2,31 | 10,72 | 12,14 | 12,53 | 0,17 | 13,19 | 15,61 | 27,52 | 338,24 | 1.351,37 | 1.681,67 |
| 12 | 13,59 | 2,12 | 4,80 | 13,19 | 12,02 | 0,17 | 10,63 | 5,96 | 13,18 | 273,62 | 881,26 | 957,06 |
| 13 | 26,38 | 2,43 | 15,81 | 28,15 | 14,76 | 0,21 | 11,58 | 20,95 | 24,82 | 373,32 | 1.284,60 | 1.551,96 |
| 14 | 24,49 | 1,89 | 15,67 | 23,83 | 11,10 | 0,25 | 12,84 | 18,56 | 27,64 | 435,52 | 1.269,82 | 1.537,45 |
| 15 | 17,37 | 1,96 | 12,24 | 13,23 | 7,80 | 0,16 | 9,15 | 15,69 | 13,95 | 262,08 | 614,84 | 748,63 |
| 17 | 22,20 | 2,50 | 19,71 | 11,88 | 11,29 | 0,27 | 13,61 | 15,84 | 23,86 | 512,84 | 1.057,04 | 1.003,06 |
| 18 | 16,77 | 2,78 | 13,24 | 9,05 | 10,17 | 0,20 | 8,42 | 12,42 | 19,23 | 316,67 | 1.099,23 | 1.515,57 |
| 19 | 11,27 | 2,71 | 9,11 | 2,75 | 6,72 | 0,15 | 6,77 | 6,15 | 13,47 | 177,54 | 554,53 | 602,26 |
| 20 | 8,48 | 2,22 | 6,53 | 2,10 | 5,00 | 0,12 | 5,16 | 5,15 | 10,98 | 127,4 | 397,91 | 432,16 |
| 21 | 1,10 | 0,60 | 0,47 | 0,29 | 1,06 | 0,02 | 1,00 | 1,35 | 1,32 | 22,2 | 62,1 | 88,9 |
| 22 | 28,73 | 3,02 | 17,16 | 31,02 | 12,64 | 0,27 | 12,27 | 7,20 | 14,51 | 253,56 | 1.053,40 | 1.585,16 |
| 23 | 28,03 | 2,97 | 16,87 | 30,10 | 12,62 | 0,27 | 12,79 | 7,39 | 14,29 | 245,54 | 1.020,09 | 1.535,03 |
| 24 | 24,62 | 1,32 | 20,42 | 21,03 | 14,33 | 0,38 | 13,05 | 23,36 | 28,63 | 568,4 | 1.548,16 | 1.745,87 |
| Median | 22,20 | 2,43 | 15,67 | 13,23 | 11,10 | 0,21 | 11,58 | 12,42 | 14,51 | 373,32 | 1201,79 | 1465,16 |
| 1. Quartil | 16,66 | 1,79 | 9,59 | 12,13 | 10,23 | 0,16 | 9,27 | 7,42 | 14,13 | 267,85 | 1036,75 | 1105,17 |
| 3. Quartil | 24,55 | 2,62 | 16,34 | 23,36 | 12,61 | 0,25 | 12,53 | 19,16 | 26,36 | 477,16 | 1330,55 | 1591,27 |

Anhang 2: Medianer Aufnahmewert relevanter Nährstoffe über die MM. Angegeben ist der Mediane Aufnahmewert einzelner Stoffe der jeweiligen Patienten und Patientinnen in mg/kg/d. Abkürzungen: Pat ID = Patienten und Patientinnen Identifikation; PC = Phosphatidylcholin; SPH = Sphingomyelin; DHA = Docosahexaensäure; ARA = Arachidonsäure; FS = Fettsäure





Anhang 3 A-C: Inter- und intraindividuelle Ranges der Myristinsäure (A), Linolsäure (B) und Ölsäure (C) in Mol% in der MM. Dargestellt als Boxplots. Aufgeteilt in die einzelnen Versuchsgruppen. Pat. 19+20 sowie 22+23 sind Zwillinge und haben daher die gleiche Muttermilch erhalten. Diese wurde hier, zur besseren Übersichtlichkeit der einzelnen Gruppen einzeln dargestellt. Abkürzungen und Symbole: PAT ID = Patienten und Patientinnen Identifikation; O = Ausreißer; * = Extremwert.



Anhang 4: Streudiagramm zur Korrelation zwischen Cholin und seinem Präkursor Betain im kindlichen Plasma. Dargestellt sind Einzelwerte ($n = 72$). Die Merkmale sind normalverteilt. Signifikanzniveau: $p < 0,01$. r : Korrelationskoeffizient nach Pearson.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Adarme-Vega, T. Catalina; Lim, David K. Y.; Timmins, Matthew; Vernen, Felicitas; Li, Yan; Schenk, Peer M. (2012): Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. In: *Microbial cell factories* 11, S. 96. DOI: 10.1186/1475-2859-11-96.
2. Agostoni, C.; Buonocore, G.; Carnielli, V. P.; Curtis, M. de; Darmaun, D.; Decsi, T. et al. (2010): Enteral nutrient supply for preterm infants: commentary from the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition. In: *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 50 (1), S. 85–91. DOI: 10.1097/MPG.0b013e3181adaee0.
3. Alshweki, Ayham; Muñuzuri, Alejandro Pérez; Baña, Ana M.; Castro, Ma José de; Andrade, Fernando; Aldamiz-Echevarría, Luís et al. (2015): Effects of different arachidonic acid supplementation on psychomotor development in very preterm infants; a randomized controlled trial. In: *Nutrition journal* 14, S. 101. DOI: 10.1186/s12937-015-0091-3.
4. Al-Waiz, M.; Mikov, M.; Mitchell, S. C.; Smith, R. L. (1992): The exogenous origin of trimethylamine in the mouse. In: *Metabolism* 41 (2), S. 135–136. DOI: 10.1016/0026-0495(92)90140-6.
5. Andreas, Nicholas J.; Kampmann, Beate; Mehring Le-Doare, Kirsty (2015): Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. In: *Early human development* 91 (11), S. 629–635. DOI: 10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013.
6. Angelico, Mario; Corradini, Stefano Ginanni; Masella, Roberta; Alvaro, Domenico; Cantafora, Alfredo; Capocaccia, Livio (1992): Molecular composition of biliary phosphatidylcholines, as related to cholesterol saturation, transport and nucleation in human gallbladder bile. In: *Journal of Hepatology* 15 (1-2), S. 59–66. DOI: 10.1016/0168-8278(92)90012-E.
7. Apte, S. V.; Iyengar, L. (1972): Composition of the human foetus. In: *The British journal of nutrition* 27 (2), S. 305–312. DOI: 10.1079/BJN19720095.

8. Arterburn, Linda M.; Oken, Harry A.; Bailey Hall, Eileen; Hamersley, Jacqueline; Kuratko, Connye N.; Hoffman, James P. (2008): Algal-oil capsules and cooked salmon: nutritionally equivalent sources of docosahexaenoic acid. In: *Journal of the American Dietetic Association* 108 (7), S. 1204–1209. DOI: 10.1016/j.jada.2008.04.020.
9. Arterburn, Linda M.; Oken, Harry A.; Hoffman, James P.; Bailey-Hall, Eileen; Chung, Gloria; Rom, Dror et al. (2007): Bioequivalence of Docosahexaenoic Acid from Different Algal Oils in Capsules and in a DHA-Fortified Food. In: *Lipids* 42 (11). DOI: 10.1007/s11745-007-3098-5.
10. Arts, Michael T.; Kohler, Christopher C. (2009): Health and condition in fish: the influence of lipids on membrane competency and immune response. In: Martin Kainz, Michael T. Brett und Michael T. Arts (Hg.): *Lipids in Aquatic Ecosystems*, Bd. 58. New York, NY: Springer New York, S. 237–256.
11. B. Koletzko (2019): Grundlagen der Ernährung. In: Christian P. Speer, Manfred Gahr und Jörg Dötsch (Hg.): *Pädiatrie*. 5., vollständig überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 26–40.
12. B. Koletzko et al (2013): Frühe metabolische Programmierung der langfristigen kindlichen Gesundheit. Unter Mitarbeit von B. Koletzko, B. Brands, H. Demmelmair, P. Rzehak, M. Weber und V. Grote. In: Frank Jochum (Hg.): *Ernährungsmedizin Pädiatrie. Infusionstherapie und Diätetik*. 2. Aufl. Berlin: Springer, S. 27–35.
13. Baker, Ella J.; Miles, Elizabeth A.; Burdge, Graham C.; Yaqoob, Parveen; Calder, Philip C. (2016): Metabolism and functional effects of plant-derived omega-3 fatty acids in humans. In: *Progress in lipid research* 64, S. 30–56. DOI: 10.1016/j.plipres.2016.07.002.
14. Ballard, Olivia; Morrow, Ardythe L. (2013): Human milk composition: nutrients and bioactive factors. In: *Pediatric clinics of North America* 60 (1), S. 49–74. DOI: 10.1016/j.pcl.2012.10.002.

15. Bartmann, Peter (2002): Pädiatrie. 2., vollst. überarb. Aufl. Hg. v. Friedrich C. Sitzmann. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).
16. Bernhard, Wolfgang; Böckmann, Katrin; Maas, Christoph; Mathes, Michaela; Hövelmann, Julia; Shunova, Anna et al. (2019a): Combined choline and DHA supplementation: a randomized controlled trial. In: *European journal of nutrition*. DOI: 10.1007/s00394-019-01940-7.
17. Bernhard, Wolfgang; Full, Anna; Arand, Jörg; Maas, Christoph; Poets, Christian F.; Franz, Axel R. (2013): Choline supply of preterm infants: assessment of dietary intake and pathophysiological considerations. In: *European journal of nutrition* 52 (3), S. 1269–1278. DOI: 10.1007/s00394-012-0438-x.
18. Bernhard, Wolfgang; Lange, Robert; Graepler-Mainka, Ute; Engel, Corinna; Machann, Jürgen; Hund, Verena et al. (2019b): Choline Supplementation in Cystic Fibrosis-The Metabolic and Clinical Impact. In: *Nutrients* 11 (3). DOI: 10.3390/nu11030656.
19. Bernhard, Wolfgang; Maas, Christoph; Shunova, Anna; Mathes, Michaela; Böckmann, Katrin; Bleeker, Christine et al. (2018): Transport of long-chain polyunsaturated fatty acids in preterm infant plasma is dominated by phosphatidylcholine. In: *European journal of nutrition* 57 (6), S. 2105–2112. DOI: 10.1007/s00394-017-1484-1.
20. Bernhard, Wolfgang; Poets, Christian F.; Franz, Axel R. (2019c): Choline and choline-related nutrients in regular and preterm infant growth. In: *European journal of nutrition*. DOI: 10.1007/s00394-018-1834-7.
21. Bernhard, Wolfgang; Pynn, Christopher J.; Jaworski, Andreas; Rau, Gunnar A.; Hohlfeld, Jens M.; Freihorst, Joachim et al. (2004): Mass spectrometric analysis of surfactant metabolism in human volunteers using deuteriated choline. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 170 (1), S. 54–58. DOI: 10.1164/rccm.200401-0890C.

22. Bernhard, Wolfgang; Raith, Marco; Koch, Vera; Kunze, Rebecca; Maas, Christoph; Abele, Harald et al. (2014): Plasma phospholipids indicate impaired fatty acid homeostasis in preterm infants. In: *European journal of nutrition* 53 (7), S. 1533–1547. DOI: 10.1007/s00394-014-0658-3.
23. Bernhard, Wolfgang; Raith, Marco; Koch, Vera; Maas, Christoph; Abele, Harald; Poets, Christian F.; Franz, Axel R. (2016): Developmental changes in polyunsaturated fetal plasma phospholipids and feto-maternal plasma phospholipid ratios and their association with bronchopulmonary dysplasia. In: *European journal of nutrition* 55 (7), S. 2265–2274. DOI: 10.1007/s00394-015-1036-5.
24. Bernhard, Wolfgang; Raith, Marco; Kunze, Rebecca; Koch, Vera; Heni, Martin; Maas, Christoph et al. (2015): Choline concentrations are lower in postnatal plasma of preterm infants than in cord plasma. In: *European journal of nutrition* 54 (5), S. 733–741. DOI: 10.1007/s00394-014-0751-7.
25. Berseth, C. L.; Harris, C. L.; Wampler, J. L.; Hoffman, D. R.; Diersen-Schade, D. A. (2014): Liquid human milk fortifier significantly improves docosahexaenoic and arachidonic acid status in preterm infants. In: *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 91 (3), S. 97–103. DOI: 10.1016/j.plefa.2014.03.002.
26. Birch, Eileen E.; Carlson, Susan E.; Hoffman, Dennis R.; Fitzgerald-Gustafson, Kathleen M.; Fu, Valeria L. N.; Drover, James R. et al. (2010): The DIAMOND (DHA Intake And Measurement Of Neural Development) Study: a double-masked, randomized controlled clinical trial of the maturation of infant visual acuity as a function of the dietary level of docosahexaenoic acid. In: *The American journal of clinical nutrition* 91 (4), S. 848–859. DOI: 10.3945/ajcn.2009.28557.
27. Birch, Eileen E.; Garfield, Sharon; Hoffman, Dennis R.; Uauy, Ricardo; Birch, David G. (2000): A randomized controlled trial of early dietary supply of long-chain polyunsaturated fatty acids and mental development in term infants. In:

Developmental Medicine & Child Neurology 42 (3), S. 174–181. DOI: 10.1111/j.1469-8749.2000.tb00066.x.

28. Bitsanis, Demetris; Crawford, Michael A.; Moodley, Therishnee; Holmsen, Holm; Ghebremeskel, Kebeab; Djahanbakhch, Ovrang (2005): Arachidonic acid predominates in the membrane phosphoglycerides of the early and term human placenta. In: *The Journal of nutrition* 135 (11), S. 2566–2571. DOI: 10.1093/jn/135.11.2566.
29. Blencowe, Hannah; Cousens, Simon; Oestergaard, Mikkel Z.; Chou, Doris; Moller, Ann-Beth; Narwal, Rajesh et al. (2012): National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. In: *The Lancet* 379 (9832), S. 2162–2172. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60820-4.
30. Bligh, E. G.; Dyer, W. J. (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. In: *Canadian journal of biochemistry and physiology* 37 (8), S. 911–917. DOI: 10.1139/o59-099.
31. Böckmann, K. A.; Stumpff, A. von; Bernhard, W.; Shunova, A.; Minarski, M.; Frische, B. et al. (2020): Fatty acid composition of adipose tissue at term indicates deficiency of arachidonic and docosahexaenoic acid and excessive linoleic acid supply in preterm infants. In: *European journal of nutrition*. DOI: 10.1007/s00394-020-02293-2.
32. Borow, Kenneth M.; Nelson, John R.; Mason, R. Preston (2015): Biologic plausibility, cellular effects, and molecular mechanisms of eicosapentaenoic acid (EPA) in atherosclerosis. In: *Atherosclerosis* 242 (1), S. 357–366. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.07.035.
33. Bosetti, Francesca (2007): Arachidonic acid metabolism in brain physiology and pathology: lessons from genetically altered mouse models. In: *J Neurochem* 102 (3), S. 577–586. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.04558.x.

34. Brenna, J. Thomas; Varamini, Behzad; Jensen, Robert G.; Diersen-Schade, Deborah A.; Boettcher, Julia A.; Arterburn, Linda M. (2007): Docosahexaenoic and arachidonic acid concentrations in human breast milk worldwide. In: *The American journal of clinical nutrition* 85 (6), S. 1457–1464. DOI: 10.1093/ajcn/85.6.1457.
35. Buckingham S.; Avery M.E. (1962): Time of appearance of lung surfactant in the foetal mouse. In: *Nature* 193, S. 688–689. DOI: 10.1038/193688a0.
36. Budzikiewicz, Herbert; Schäfer, Mathias (2013): Massenspektrometrie. Eine Einführung. 6., vollst. überarb. und aktualisierte Aufl. Weinheim: Wiley-VCH. Online verfügbar unter <http://lib.myilibrary.com?id=478857>.
37. Burdge, Graham C.; Calder, Philip C. (2005): Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. In: *Reproduction, nutrition, development* 45 (5), S. 581–597. DOI: 10.1051/rnd:2005047.
38. Carnielli, V. P.; Verlatto, G.; Pederzini, F.; Luijendijk, I.; Boerlage, A.; Pedrotti, D.; Sauer, P. J. (1998): Intestinal absorption of long-chain polyunsaturated fatty acids in preterm infants fed breast milk or formula. In: *The American journal of clinical nutrition* 67 (1), S. 97–103. DOI: 10.1093/ajcn/67.1.97.
39. Caudill, Marie A.; Strupp, Barbara J.; Muscalu, Laura; Nevins, Julie E. H.; Canfield, Richard L. (2018): Maternal choline supplementation during the third trimester of pregnancy improves infant information processing speed: a randomized, double-blind, controlled feeding study. In: *The FASEB Journal* 32 (4), S. 2172–2180. DOI: 10.1096/fj.201700692RR.
40. Chapman, Victoria; Dickenson, Anthony H. (1992): The spinal and peripheral roles of bradykinin and prostaglandins in nociceptive processing in the rat. In: *European Journal of Pharmacology* 219 (3-4), S. 427–433. DOI: 10.1016/0014-2999(92)90484-L.
41. Cheatham, Carol L.; Goldman, Barbara Davis; Fischer, Leslie M.; da Costa, Kerry-Ann; Reznick, J. Steven; Zeisel, Steven H. (2012): Phosphatidylcholine

supplementation in pregnant women consuming moderate-choline diets does not enhance infant cognitive function: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. In: *The American journal of clinical nutrition* 96 (6), S. 1465–1472. DOI: 10.3945/ajcn.112.037184.

42. Chen, Alice H.; Innis, Sheila M.; Davidson, A. George F.; James, S. Jill (2005): Phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine excretion is increased in children with cystic fibrosis and is associated with plasma homocysteine, S-adenosylhomocysteine, and S-adenosylmethionine. In: *The American journal of clinical nutrition* 81 (3), S. 686–691. DOI: 10.1093/ajcn/81.3.686.
43. Cheng, Wei-Ling; Holmes-McNary, Minnie Q.; Mar, Mei-Heng; Lien, Eric L.; Zeisel, Steven H. (1996): Bioavailability of choline and choline esters from milk in rat pups. In: *The Journal of nutritional biochemistry* 7 (8), S. 457–464. DOI: 10.1016/0955-2863(96)00079-4.
44. Clandinin, M. T.; Chappell, J. E.; Heim, T.; Swyer, P. R.; Chance, G. W. (1981): Fatty acid utilization in perinatal de novo synthesis of tissues. In: *Early human development* 5 (4), S. 355–366. DOI: 10.1016/0378-3782(81)90016-5.
45. Cohen, Jacob (1988): *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. 2nd Edition: Routledge.
46. Coll, Marta; Libralato, Simone; Tudela, Sergi; Palomera, Isabel; Pranovi, Fabio (2008): Ecosystem overfishing in the ocean. In: *PloS one* 3 (12), e3881. DOI: 10.1371/journal.pone.0003881.
47. Collins, Carmel T.; Makrides, Maria; McPhee, Andrew J.; Sullivan, Thomas R.; Davis, Peter G.; Thio, Marta et al. (2017): Docosahexaenoic Acid and Bronchopulmonary Dysplasia in Preterm Infants. In: *The New England journal of medicine* 376 (13), S. 1245–1255. DOI: 10.1056/NEJMoa1611942.
48. Colombo, John; Jill Shaddy, D.; Kerling, Elizabeth H.; Gustafson, Kathleen M.; Carlson, Susan E. (2017): Docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (ARA)

- balance in developmental outcomes. In: *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 121, S. 52–56. DOI: 10.1016/j.plefa.2017.05.005.
49. Colombo, Stefanie M.; Rodgers, Timothy F. M.; Diamond, Miriam L.; Bazinet, Richard P.; Arts, Michael T. (2019): Projected declines in global DHA availability for human consumption as a result of global warming. In: *Ambio*. DOI: 10.1007/s13280-019-01234-6.
 50. Coppa, G. V.; Pierani, P.; Zampini, L.; Carloni, I.; Carlucci, A.; Gabrielli, O. (1999): Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation. In: *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992). Supplement 88 (430)*, S. 89–94. DOI: 10.1111/j.1651-2227.1999.tb01307.x.
 51. Crawford, M. (2000): Placental delivery of arachidonic and docosahexaenoic acids: implications for the lipid nutrition of preterm infants. In: *The American journal of clinical nutrition* 71 (1 Suppl), 275S-84S. DOI: 10.1093/ajcn/71.1.275S.
 52. Crawford, M. A.; Golfetto, I.; Ghebremeskel, K.; Min, Y.; Moodley, T.; Poston, L. et al. (2003): The potential role for arachidonic and docosahexaenoic acids in protection against some central nervous system injuries in preterm infants. In: *Lipids* 38 (4), S. 303–315. DOI: 10.1007/s11745-003-1065-1.
 53. Crawford, M. A.; Sinclair, A. J. (1971): Nutritional influences in the evolution of mammalian brain. In: lipids, malnutrition & the developing brain. In: *Ciba Foundation symposium*, S. 267–292.
 54. Crawford, M. A.; Williams, G.; Hassam, A. G.; Whitehouse, W. L. (1976): ESSENTIAL FATTY ACIDS AND FETAL BRAIN GROWTH. In: *The Lancet* 307 (7957), S. 452–453. DOI: 10.1016/S0140-6736(76)91476-8.
 55. Crawford, Michael A. (2006): Docosahexaenoic acid in neural signaling systems. In: *Nutrition and health* 18 (3), S. 263–276. DOI: 10.1177/026010600601800309.
 56. Crawford, Michael A.; Broadhurst, C. Leigh (2012): The role of docosahexaenoic and the marine food web as determinants of evolution and hominid brain

development: the challenge for human sustainability. In: *Nutrition and health* 21 (1), S. 17–39. DOI: 10.1177/0260106012437550.

57. Crawford, Michael A.; Wang, Yiqun; Forsyth, Stewart; Brenna, J. Thomas (2015): The European Food Safety Authority recommendation for polyunsaturated fatty acid composition of infant formula overrules breast milk, puts infants at risk, and should be revised. In: *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 102-103, S. 1–3. DOI: 10.1016/j.plefa.2015.07.005.
58. da Costa, Kerry-Ann; Corbin, Karen D.; Niculescu, Mihai D.; Galanko, Joseph A.; Zeisel, Steven H. (2014): Identification of new genetic polymorphisms that alter the dietary requirement for choline and vary in their distribution across ethnic and racial groups. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28 (7), S. 2970–2978. DOI: 10.1096/fj.14-249557.
59. Darios, Frédéric; Ruipérez, Violeta; López, Inmaculada; Villanueva, Jose; Gutierrez, Luis M.; Davletov, Bazbek (2010): Alpha-synuclein sequesters arachidonic acid to modulate SNARE-mediated exocytosis. In: *EMBO reports* 11 (7), S. 528–533. DOI: 10.1038/embor.2010.66.
60. Deoni, Sean; Dean, Douglas; Joelson, Sarah; O'Regan, Jonathan; Schneider, Nora (2018): Early nutrition influences developmental myelination and cognition in infants and young children. In: *NeuroImage* 178, S. 649–659. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2017.12.056.
61. DiMarco, Diana M.; Missimer, Amanda; Murillo, Ana Gabriela; Lemos, Bruno S.; Malysheva, Olga V.; Caudill, Marie A. et al. (2017): Intake of up to 3 Eggs/Day Increases HDL Cholesterol and Plasma Choline While Plasma Trimethylamine-N-oxide is Unchanged in a Healthy Population. In: *Lipids* 52 (3), S. 255–263. DOI: 10.1007/s11745-017-4230-9.
62. Dobbie, J. W. (1996): Surfactant protein A and lamellar bodies: a homologous secretory function of peritoneum, synovium, and lung. In: *Peritoneal dialysis*

international : journal of the International Society for Peritoneal Dialysis 16 (6), S. 574–581.

63. Drover, James R.; Hoffman, Dennis R.; Castañeda, Yolanda S.; Morale, Sarah E.; Garfield, Sharon; Wheaton, Dianna H.; Birch, Eileen E. (2011): Cognitive function in 18-month-old term infants of the DIAMOND study: a randomized, controlled clinical trial with multiple dietary levels of docosahexaenoic acid. In: *Early human development* 87 (3), S. 223–230. DOI: 10.1016/j.earlhumdev.2010.12.047.
64. Duan, Rui-Dong; Nilsson, Ake (2009): Metabolism of sphingolipids in the gut and its relation to inflammation and cancer development. In: *Progress in lipid research* 48 (1), S. 62–72. DOI: 10.1016/j.plipres.2008.04.003.
65. Eckey, Hans-Friedrich; Kosfeld, Reinhold; Rengers, Martina (2002): *Multivariate Statistik. Grundlagen, Methoden, Beispiele*. 1. Aufl. Wiesbaden: Gabler (Gabler-Lehrbuch).
66. EFSA (2016): Dietary Reference Values for choline. In: *EFSA* 14 (8), S. 158. DOI: 10.2903/j.efsa.2016.4484.
67. Euro-Peristat (2015): The European Perinatal Health Report 2015. Online verfügbar unter <https://www.europeristat.com/index.php/reports/european-perinatal-health-report-2015.html>.
68. Fernandez, C. A.; Des Rosiers, C.; Previs, S. F.; David, F.; Brunengraber, H. (1996): Correction of ¹³C mass isotopomer distributions for natural stable isotope abundance. In: *Journal of mass spectrometry : JMS* 31 (3), S. 255–262. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9888(199603)31:3<255::AID-JMS290>3.0.CO;2-3.
69. Fewtrell, Mary S.; Abbott, Rebecca A.; Kennedy, Kathy; Singhal, Atul; Morley, Ruth; Caine, Eleanor et al. (2004): Randomized, double-blind trial of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation with fish oil and borage oil in preterm infants. In: *The Journal of Pediatrics* 144 (4), S. 471–479. DOI: 10.1016/j.jpeds.2004.01.034.

70. Fischer, Leslie M.; da Costa, Kerry Ann; Galanko, Joseph; Sha, Wei; Stephenson, Brigitte; Vick, Julie; Zeisel, Steven H. (2010a): Choline intake and genetic polymorphisms influence choline metabolite concentrations in human breast milk and plasma. In: *The American journal of clinical nutrition* 92 (2), S. 336–346. DOI: 10.3945/ajcn.2010.29459.
71. Fischer, Leslie M.; da Costa, Kerry Ann; Galanko, Joseph; Sha, Wei; Stephenson, Brigitte; Vick, Julie; Zeisel, Steven H. (2010b): Choline intake and genetic polymorphisms influence choline metabolite concentrations in human breast milk and plasma. In: *The American journal of clinical nutrition* 92 (2), S. 336–346. DOI: 10.3945/ajcn.2010.29459.
72. Foiles, Amanda M.; Kerling, Elizabeth H.; Wick, Jo A.; Scalabrin, Deolinda M. F.; Colombo, John; Carlson, Susan E. (2016): Formula with long-chain polyunsaturated fatty acids reduces incidence of allergy in early childhood. In: *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 27 (2), S. 156–161. DOI: 10.1111/pai.12515.
73. Foreman-van Drongelen, Magritha M.H.P.; van Houwelingen, Adriana C.; Kester, Arnold D.M.; Hasaart, Tom H.M.; Blanco, Carlos E.; Hornstra, Gerard (1995): Long-chain polyunsaturated fatty acids in preterm infants: Status at birth and its influence on postnatal levels. In: *The Journal of Pediatrics* 126 (4), S. 611–618. DOI: 10.1016/S0022-3476(95)70363-2.
74. Fukaya, Taisuke; Gondaira, Takumi; Kashiya, Yasuto; Kotani, Susumu; Ishikura, Yoshiyuki; Fujikawa, Shigeaki et al. (2007): Arachidonic acid preserves hippocampal neuron membrane fluidity in senescent rats. In: *Neurobiology of aging* 28 (8), S. 1179–1186. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2006.05.023.
75. Furuya, Hideki; Ohkawara, Sou; Nagashima, Kousuke; Asanuma, Narito; Hino, Tsuneo (2008): Dietary sphingomyelin alleviates experimental inflammatory bowel disease in mice. In: *International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal*

international de vitaminologie et de nutrition 78 (1), S. 41–49. DOI: 10.1024/0300-9831.78.1.41.

76. Fusch, Christoph (2019): Avoiding Postnatal Growth Retardation by Individualized Fortification of Breast Milk: Implications for Somatic and Neurodevelopmental Outcomes. In: *Breastfeeding medicine : the official journal of the Academy of Breastfeeding Medicine* 14 (S1), S15-S17. DOI: 10.1089/bfm.2019.0031.
77. G. Dockter (2002): Natürliche Ernährung in der Neugeborenen- und frühen Säuglingsperiode. In: Peter Bartmann: Pädiatrie. 2., vollst. überarb. Aufl. Hg. v. Friedrich C. Sitzmann. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe), S. 37–41.
78. Gao, Chang; Liu, Ge; Whitfield, Kyly C.; Kroeun, Hou; Green, Timothy J.; Gibson, Robert A. et al. (2018): Comparison of Human Milk Fatty Acid Composition of Women From Cambodia and Australia. In: *Journal of human lactation : official journal of International Lactation Consultant Association* 34 (3), S. 585–591. DOI: 10.1177/0890334418772279.
79. Gaschromatographie, GC (2017). In: aprentas (Hg.): Laborpraxis Band 3: Trennungsmethoden. Cham: Springer International Publishing, S. 293–327.
80. Ghebremeskel, K.; Min, Y.; Crawford, M. A.; Nam, J. H.; Kim, A.; Koo, J. N.; Suzuki, H. (2000): Blood fatty acid composition of pregnant and nonpregnant Korean women: red cells may act as a reservoir of arachidonic acid and docosahexaenoic acid for utilization by the developing fetus. In: *Lipids* 35 (5), S. 567–574. DOI: 10.1007/s11745-000-557-3.
81. Goss, Kevin C. W.; Goss, Victoria M.; Townsend, J. Paul; Koster, Grielof; Clark, Howard W.; Postle, Anthony D. (2020): Postnatal adaptations of phosphatidylcholine metabolism in extremely preterm infants: implications for choline and PUFA metabolism. In: *The American journal of clinical nutrition* 112 (6), S. 1438–1447. DOI: 10.1093/ajcn/nqaa207.

82. Goswami, Ipsita; Rochow, Niels; Fusch, Gerhard; Liu, Kai; Marrin, Michael L.; Heckmann, Matthias et al. (2016): Length Normalized Indices for Fat Mass and Fat-Free Mass in Preterm and Term Infants during the First Six Months of Life. In: *Nutrients* 8 (7). DOI: 10.3390/nu8070417.
83. Gould, Jacqueline F.; Treyvaud, Karli; Yelland, Lisa N.; Anderson, Peter J.; Smithers, Lisa G.; McPhee, Andrew J.; Makrides, Maria (2017): Seven-Year Follow-up of Children Born to Women in a Randomized Trial of Prenatal DHA Supplementation. In: *JAMA* 317 (11), S. 1173–1175. DOI: 10.1001/jama.2016.21303.
84. Griffiths, William J. (2003): Tandem mass spectrometry in the study of fatty acids, bile acids, and steroids. In: *Mass spectrometry reviews* 22 (2), S. 81–152. DOI: 10.1002/mas.10046.
85. Grothe, Judith; Riethmüller, Joachim; Tschürtz, Sandra M.; Raith, Marco; Pynn, Chris J.; Stoll, Dieter; Bernhard, Wolfgang (2015): Plasma phosphatidylcholine alterations in cystic fibrosis patients: impaired metabolism and correlation with lung function and inflammation. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 35 (4), S. 1437–1453. DOI: 10.1159/000373964.
86. Guschina, Irina A.; Harwood, John L. (2006): Mechanisms of temperature adaptation in poikilotherms. In: *FEBS letters* 580 (23), S. 5477–5483. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.06.066.
87. Hadley, Kevin B.; Ryan, Alan S.; Forsyth, Stewart; Gautier, Sheila; Salem, Norman (2016): The Essentiality of Arachidonic Acid in Infant Development. In: *Nutrients* 8 (4), S. 216. DOI: 10.3390/nu8040216.
88. Haggarty, Paul (2010): Fatty acid supply to the human fetus. In: *Annual review of nutrition* 30, S. 237–255. DOI: 10.1146/annurev.nutr.012809.104742.
89. Hammad, Samar M.; Pierce, Jason S.; Soodavar, Farzan; Smith, Kent J.; Gadban, Mohammed M. al; Rembiesa, Barbara et al. (2010): Blood sphingolipidomics in

healthy humans: impact of sample collection methodology. In: *Journal of Lipid Research* 51 (10), S. 3074–3087. DOI: 10.1194/jlr.D008532.

90. Hawkes, Joanna S.; Bryan, Dani-Louise; Makrides, Maria; Neumann, Mark A.; Gibson, Robert A. (2002): A randomized trial of supplementation with docosahexaenoic acid-rich tuna oil and its effects on the human milk cytokines interleukin 1 beta, interleukin 6, and tumor necrosis factor alpha. In: *The American journal of clinical nutrition* 75 (4), S. 754–760. DOI: 10.1093/ajcn/75.4.754.
91. Henriksen, Christine; Haugholt, Kristin; Lindgren, Magnus; Aurvåg, Anne Karin; Rønnestad, Arild; Grønn, Morten et al. (2008): Improved cognitive development among preterm infants attributable to early supplementation of human milk with docosahexaenoic acid and arachidonic acid. In: *Pediatrics* 121 (6), S. 1137–1145. DOI: 10.1542/peds.2007-1511.
92. Hirsch, Madelyn J.; Growdon, John H.; Wurtman, Richard J. (1978): Relations between dietary choline or lecithin intake, serum choline levels, and various metabolic indices. In: *Metabolism* 27 (8), S. 953–960. DOI: 10.1016/0026-0495(78)90139-7.
93. Hofmann, A. F.; Borgstroem, B. (1964): THE INTRALUMINAL PHASE OF FAT DIGESTION IN MAN: THE LIPID CONTENT OF THE MICELLAR AND OIL PHASES OF INTESTINAL CONTENT OBTAINED DURING FAT DIGESTION AND ABSORPTION. In: *The Journal of clinical investigation* 43, S. 247–257. DOI: 10.1172/JCI104909.
94. Hofmann, Alan F.; Hagey, Lee R. (2014): Key discoveries in bile acid chemistry and biology and their clinical applications: history of the last eight decades. In: *Journal of Lipid Research* 55 (8), S. 1553–1595. DOI: 10.1194/jlr.R049437.
95. Holmes-McNary, M. Q.; Cheng, W. L.; Mar, M. H.; Fussell, S.; Zeisel, S. H. (1996): Choline and choline esters in human and rat milk and in infant formulas. In: *The American journal of clinical nutrition* 64 (4), S. 572–576. DOI: 10.1093/ajcn/64.4.572.

96. Horta, Bernardo L. (2007): Evidence on the long-term effects of breastfeeding. Systematic reviews and meta-analyses. [Geneva]: World Health Organization.
97. Hsieh, Andrea T.; Anthony, Joshua C.; Diersen-Schade, Deborah A.; Rumsey, Steven C.; Lawrence, Peter; Li, Cun et al. (2007): The Influence of Moderate and High Dietary Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids (LCPUFA) on Baboon Neonate Tissue Fatty Acids. In: *Pediatr Res* 61 (5), S. 537–545. DOI: 10.1203/pdr.0b013e318045bec9.
98. Ilcol, Yeşim Ozarda; Ozbek, Resul; Hamurtekin, Emre; Ulus, Ismail H. (2005): Choline status in newborns, infants, children, breast-feeding women, breast-fed infants and human breast milk. In: *The Journal of nutritional biochemistry* 16 (8), S. 489–499. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2005.01.011.
99. Innis, S. M. (2005): Essential fatty acid transfer and fetal development. In: *Placenta* 26 Suppl A, S70-5. DOI: 10.1016/j.placenta.2005.01.005.
100. Innis, Sheila M. (2003): Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. In: *The Journal of Pediatrics* 143 (4), S. 1–8. DOI: 10.1067/S0022-3476(03)00396-2.
101. Innis, Sheila M. (2004): Polyunsaturated fatty acids in human milk: an essential role in infant development. In: *Advances in experimental medicine and biology* 554, S. 27–43. DOI: 10.1007/978-1-4757-4242-8_5.
102. Innis, Sheila M. (2007a): Fatty acids and early human development. In: *Early human development* 83 (12), S. 761–766. DOI: 10.1016/j.earlhumdev.2007.09.004.
103. Innis, Sheila M. (2007b): Human milk: maternal dietary lipids and infant development. In: *The Proceedings of the Nutrition Society* 66 (3), S. 397–404. DOI: 10.1017/S0029665107005666.
104. Innis, Sheila M. (2014): Impact of maternal diet on human milk composition and neurological development of infants. In: *The American journal of clinical nutrition* 99 (3), 734S-41S. DOI: 10.3945/ajcn.113.072595.

105. Institute of Medicine (U.S.) (1998): Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline. Washington, D.C: National Academy Press.
106. Jacobi, Sheila K.; Moeser, Adam J.; Corl, Benjamin A.; Harrell, Robert J.; Blikslager, Anthony T.; Odle, Jack (2012): Dietary long-chain PUFA enhance acute repair of ischemia-injured intestine of suckling pigs. In: *The Journal of nutrition* 142 (7), S. 1266–1271. DOI: 10.3945/jn.111.150995.
107. Jang, Sung-Hee; Lee, Byong Sop; Park, Jung Hwa; Chung, Eun Jung; Um, Young Sook; Lee-Kim, Yang Cha; Kim, Ellen Ai-Rhan (2011): Serial changes of fatty acids in preterm breast milk of Korean women. In: *Journal of human lactation : official journal of International Lactation Consultant Association* 27 (3), S. 279–285. DOI: 10.1177/0890334411405059.
108. Jenness, R. (1979): The composition of human milk. In: *Seminars in perinatology* 3 (3), S. 225–239.
109. Jeong, Hanok; Suh, Yoonsuk; Chung, Young-Jin (2010): Choline and Betaine Concentrations in Breast Milk of Korean Lactating Women and the Choline and Betaine Intakes of Their Infants. In: *Korean J Nutr* 43 (6), S. 588. DOI: 10.4163/kjn.2010.43.6.588.
110. Jiang, Xinyin; Bar, Haim Y.; Yan, Jian; Jones, Sara; Brannon, Patsy M.; West, Allyson A. et al. (2013): A higher maternal choline intake among third-trimester pregnant women lowers placental and circulating concentrations of the antiangiogenic factor fms-like tyrosine kinase-1 (sFLT1). In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27 (3), S. 1245–1253. DOI: 10.1096/fj.12-221648.
111. Katrin Böckmann et al (2017): Kombinierte Cholin- und DocosahexaensäureSupplementierung bei sehr unreifen Frühgeborenen – Untersuchungen mit stabiler Isotopenmarkierung. Unter Mitarbeit von Katrin

Böckmann, Christoph Maas, Axel Franz, Anna Shunova, Michaela Mathes, Emmanuelle Seybold, Julia Hövelmann, Christian F. Poets, Wolfgang Bernhard.

112. Katsuki, Hiroshi; Okuda, Shoki (1995): Arachidonic acid as a neurotoxic and neurotrophic substance. In: *Progress in Neurobiology* 46 (6), S. 607–636. DOI: 10.1016/0301-0082(95)00016-O.
113. Kaufmann, W. E.; Worley, P. F.; Pegg, J.; Bremer, M.; Isakson, P. (1996): COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (6), S. 2317–2321. DOI: 10.1073/pnas.93.6.2317.
114. Kitajka, Klára; Sinclair, Andrew J.; Weisinger, Richard S.; Weisinger, Harrison S.; Mathai, Michael; Jayasooriya, Anura P. et al. (2004): Effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on brain gene expression. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (30), S. 10931–10936. DOI: 10.1073/pnas.0402342101.
115. Klein, Jochen; Köppen, Andrea; Löffelholz, Konrad (1990): Small Rises in Plasma Choline Reverse the Negative Arteriovenous Difference of Brain Choline. In: *J Neurochem* 55 (4), S. 1231–1236. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1990.tb03129.x.
116. Koletzko, Berthold; Carlson, Susan E.; van Goudoever, Johannes B. (2015): Should Infant Formula Provide Both Omega-3 DHA and Omega-6 Arachidonic Acid? In: *Annals of nutrition & metabolism* 66 (2-3), S. 137–138. DOI: 10.1159/000377643.
117. Köstlin, Natascha; Schoetensack, Carolin; Schwarz, Julian; Spring, Bärbel; Marmé, Alexander; Goelz, Rangmar et al. (2018): Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells (GR-MDSC) in Breast Milk (BM); GR-MDSC Accumulate in Human BM and Modulate T-Cell and Monocyte Function. In: *Frontiers in immunology* 9, S. 1098. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01098.

118. Laeter, J. R. de; Heumann, K. G.; Rosman, K. J. R. (1991): Isotopic Compositions of the Elements 1989. In: *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 20 (6), S. 1327–1337. DOI: 10.1063/1.555903.
119. Lambou, Karine; Pennati, Andrea; Valsecchi, Isabel; Tada, Rui; Sherman, Stephen; Sato, Hajime et al. (2013): Pathway of glycine betaine biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. In: *Eukaryotic cell* 12 (6), S. 853–863. DOI: 10.1128/EC.00348-12.
120. Landfald, Bjarne; Valeur, Jørgen; Berstad, Arnold; Raa, Jan (2017): Microbial trimethylamine-N-oxide as a disease marker: something fishy? In: *Microbial ecology in health and disease* 28 (1), S. 1327309. DOI: 10.1080/16512235.2017.1327309.
121. Lapillonne, Alexandre; Groh-Wargo, Sharon; Gonzalez, Carlos H. Lozano; Uauy, Ricardo (2013): Lipid needs of preterm infants: updated recommendations. In: *The Journal of Pediatrics* 162 (3 Suppl), S37-47. DOI: 10.1016/j.jpeds.2012.11.052.
122. Lapillonne, Alexandre; Jensen, Craig L. (2009): Reevaluation of the DHA requirement for the premature infant. In: *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 81 (2-3), S. 143–150. DOI: 10.1016/j.plefa.2009.05.014.
123. Larsson, Susanna C.; Kumlin, Maria; Ingelman-Sundberg, Magnus; Wolk, Alicja (2004): Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. In: *The American journal of clinical nutrition* 79 (6), S. 935–945. DOI: 10.1093/ajcn/79.6.935.
124. Lee, Jung Eun; Giovannucci, Edward; Fuchs, Charles S.; Willett, Walter C.; Zeisel, Steven H.; Cho, Eunyoung (2010): Choline and betaine intake and the risk of colorectal cancer in men. In: *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 19 (3), S. 884–887. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-09-1295.

125. Leucht, Katharina; Fischbeck, Anne; Caj, Michaela; Liebisch, Gerhard; Hartlieb, Eva; Benes, Petr et al. (2014): Sphingomyelin and phosphatidylcholine contrarily affect the induction of apoptosis in intestinal epithelial cells. In: *Molecular nutrition & food research* 58 (4), S. 782–798. DOI: 10.1002/mnfr.201300369.
126. Levene, H. (1960): Robust Tests for Equality of Variances. In: *Contributions to Probability and Statistics* 1960, S. 278–292.
127. Li, Zhaoyu; Agellon, Luis B.; Vance, Dennis E. (2007a): A role for high density lipoproteins in hepatic phosphatidylcholine homeostasis. In: *Biochimica et biophysica acta* 1771 (7), S. 893–900. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2007.04.009.
128. Li, Zhaoyu; Agellon, Luis B.; Vance, Dennis E. (2007b): Choline redistribution during adaptation to choline deprivation. In: *J. Biol. Chem.* 282 (14), S. 10283–10289. DOI: 10.1074/jbc.M611726200.
129. Li, Zhaoyu; Vance, Dennis E. (2008): Phosphatidylcholine and choline homeostasis. In: *Journal of Lipid Research* 49 (6), S. 1187–1194. DOI: 10.1194/jlr.R700019-JLR200.
130. Lockman, P. R.; Allen, D. D. (2002): The transport of choline. In: *Drug development and industrial pharmacy* 28 (7), S. 749–771. DOI: 10.1081/ddc-120005622.
131. Loewi, O. (1922): Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. In: *Pflüger, Arch.* 193 (1), S. 201–213. DOI: 10.1007/BF02331588.
132. Löffler, Georg (2007): Biochemie und Pathobiochemie. Mit 192 Tabellen ; [+ online specials]. 8., vollst. neu bearb. Aufl. Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch).
133. Louris, John N.; Wright, Larry G.; Cooks, R. Graham.; Schoen, Alan E. (1985): New scan modes accessed with a hybrid mass spectrometer. In: *Anal. Chem.* 57 (14), S. 2918–2924. DOI: 10.1021/ac00291a039.

134. Luukkainen et al: Changes in the fatty acid composition of preterm and term human milk from 1 week to 6 months of lactation. Unter Mitarbeit von Nikkai T. Salo MK. In: *Journal of Pediatric Gastroenterology*, S. 355–360.
135. Maas, Christoph; Franz, Axel R.; Shunova, Anna; Mathes, Michaela; Bleeker, Christine; Poets, Christian F. et al. (2017): Choline and polyunsaturated fatty acids in preterm infants' maternal milk. In: *European journal of nutrition* 56 (4), S. 1733–1742. DOI: 10.1007/s00394-016-1220-2.
136. Maas C, Franz A, Bernhard W, Poets C (2014): Ethikantrag - Nahrungsergänzung mit Cholin- und Docosahexaensäure bei sehr unreifen Frühgeborenen.
137. Mahaffy, Paul (2013): Mass Spectrometer: Detector. Online verfügbar unter https://attic.gsfc.nasa.gov/huygensgcms/MS_Detector_1.htm.
138. Makrides, M.; Neumann, M. A.; Byard, R. W.; Simmer, K.; Gibson, R. A. (1994): Fatty acid composition of brain, retina, and erythrocytes in breast- and formula-fed infants. In: *The American journal of clinical nutrition* 60 (2), S. 189–194. DOI: 10.1093/ajcn/60.2.189.
139. Makrides, Maria; Gibson, Robert A.; McPhee, Andrew J.; Yelland, Lisa; Quinlivan, Julie; Ryan, Philip (2010): Effect of DHA supplementation during pregnancy on maternal depression and neurodevelopment of young children: a randomized controlled trial. In: *JAMA* 304 (15), S. 1675–1683. DOI: 10.1001/jama.2010.1507.
140. Manley, Brett J.; Makrides, Maria; Collins, Carmel T.; McPhee, Andrew J.; Gibson, Robert A.; Ryan, Philip et al. (2011): High-dose docosahexaenoic acid supplementation of preterm infants: respiratory and allergy outcomes. In: *Pediatrics* 128 (1), e71-7. DOI: 10.1542/peds.2010-2405.
141. Mantzioris, E.; James, M. J.; Gibson, R. A.; Cleland, L. G. (1994): Dietary substitution with an alpha-linolenic acid-rich vegetable oil increases eicosapentaenoic acid concentrations in tissues. In: *The American journal of clinical nutrition* 59 (6), S. 1304–1309. DOI: 10.1093/ajcn/59.6.1304.

142. Martínez-Beamonte, Roberto; Lou-Bonafonte, Jose M.; Martínez-Gracia, María V.; Osada, Jesús (2013): Sphingomyelin in high-density lipoproteins: structural role and biological function. In: *International journal of molecular sciences* 14 (4), S. 7716–7741. DOI: 10.3390/ijms14047716.
143. Martins, Julian G. (2009): EPA but not DHA appears to be responsible for the efficacy of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid supplementation in depression: evidence from a meta-analysis of randomized controlled trials. In: *Journal of the American College of Nutrition* 28 (5), S. 525–542.
144. Mason, R. Preston; Jacob, Robert F. (2015): Eicosapentaenoic acid inhibits glucose-induced membrane cholesterol crystalline domain formation through a potent antioxidant mechanism. In: *Biochimica et biophysica acta* 1848 (2), S. 502–509. DOI: 10.1016/j.bbamem.2014.10.016.
145. Maurer, M.; Stebut, E. von (2004): Macrophage inflammatory protein-1. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 36 (10), S. 1882–1886. DOI: 10.1016/j.biocel.2003.10.019.
146. McMaster, Christopher R. (2018): From yeast to humans - roles of the Kennedy pathway for phosphatidylcholine synthesis. In: *FEBS letters* 592 (8), S. 1256–1272. DOI: 10.1002/1873-3468.12919.
147. McNeil, N. I.; Cummings, J. H.; James, W. P. (1978): Short chain fatty acid absorption by the human large intestine. In: *Gut* 19 (9), S. 819–822. DOI: 10.1136/gut.19.9.819.
148. Menard, Chantale R.; Goodman, Keith J.; Corso, Thomas N.; Brenna, J. Thomas; Cunnane, Stephen C. (1998): Recycling of Carbon into Lipids Synthesized De Novo Is a Quantitatively Important Pathway of α -[U- ^{13}C]Linolenate Utilization in the Developing Rat Brain. In: *J Neurochem* 71 (5), S. 2151–2158. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1998.71052151.x.

149. Ménard, Daniel; Monfils, Sophie; Tremblay, Eric (1995): Ontogeny of human gastric lipase and pepsin activities. In: *Gastroenterology* 108 (6), S. 1650–1656. DOI: 10.1016/0016-5085(95)90125-6.
150. Miller, Jacqueline; Tonkin, Emma; Damarell, Raechel A.; McPhee, Andrew J.; Sukanuma, Machiko; Sukanuma, Hiroki et al. (2018): A Systematic Review and Meta-Analysis of Human Milk Feeding and Morbidity in Very Low Birth Weight Infants. In: *Nutrients* 10 (6). DOI: 10.3390/nu10060707.
151. Mohd Razali, Nornadiah; Wah, Yap Bee (2011): Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. In: *Journal of Statistical Modeling and Analytics* (2), S. 21–33.
152. Moolenaar, Wouter H. (1995): Lysophosphatidic Acid, a Multifunctional Phospholipid Messenger. In: *J. Biol. Chem.* 270 (22), S. 12949–12952. DOI: 10.1074/jbc.270.22.12949.
153. Moore, Keith L.; Persaud, T. Vidhya N.; Viebahn, Christoph (2011): Embryologie. Entwicklungsstadien, Frühentwicklung, Organogenese, Klinik. 5. Aufl., [Nachdr.]. München: Elsevier, Urban & Fischer.
154. Muc, Magdalena; Kreiner-Møller, Eskil; Larsen, Jeppe M.; Birch, Sune; Brix, Susanne; Bisgaard, Hans; Lauritzen, Lotte (2015): Maternal fatty acid desaturase genotype correlates with infant immune responses at 6 months. In: *The British journal of nutrition* 114 (6), S. 891–898. DOI: 10.1017/S0007114515002561.
155. Najm, Svetlana; Löfqvist, Chatarina; Hellgren, Gunnel; Engström, Eva; Lundgren, Pia; Hård, Anna-Lena et al. (2017): Effects of a lipid emulsion containing fish oil on polyunsaturated fatty acid profiles, growth and morbidities in extremely premature infants: A randomized controlled trial. In: *Clinical nutrition ESPEN* 20, S. 17–23. DOI: 10.1016/j.clnesp.2017.04.004.
156. Nič, Miloslav; Jirát, Jiří; Košata, Bedřich; Jenkins, Aubrey; McNaught, Alan (2009): IUPAC Compendium of Chemical Terminology. Research Triangle Park, NC: IUPAC.

157. Nilsson, Anders K.; Löfqvist, Chatarina; Najm, Svetlana; Hellgren, Gunnel; Sävman, Karin; Andersson, Mats X. et al. (2018): Long-chain polyunsaturated fatty acids decline rapidly in milk from mothers delivering extremely preterm indicating the need for supplementation. In: *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)* 107 (6), S. 1020–1027. DOI: 10.1111/apa.14275.
158. Nilsson, Anders K.; Löfqvist, Chatarina; Najm, Svetlana; Hellgren, Gunnel; Sävman, Karin; Andersson, Mats X. et al. (2019): Influence of Human Milk and Parenteral Lipid Emulsions on Serum Fatty Acid Profiles in Extremely Preterm Infants. In: *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition* 43 (1), S. 152–161. DOI: 10.1002/jpen.1172.
159. Norris, Gregory H.; Porter, Caitlin M.; Jiang, Christina; Millar, Courtney L.; Blesso, Christopher N. (2017): Dietary sphingomyelin attenuates hepatic steatosis and adipose tissue inflammation in high-fat-diet-induced obese mice. In: *The Journal of nutritional biochemistry* 40, S. 36–43. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2016.09.017.
160. Novak, E. M.; King, D. J.; Innis, S. M. (2012): Low linoleic acid may facilitate $\Delta 6$ desaturase activity and docosahexaenoic acid accretion in human fetal development. In: *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 86 (3), S. 93–98. DOI: 10.1016/j.plefa.2012.02.004.
161. Office for National Statistics (2013): Pregnancy and ethnic factors influencing births and infant mortality in England and Wales. London. Online verfügbar unter <https://www.ons.gov.uk/peoplepopulationandcommunity/healthandsocialcare/causesofdeath/bulletins/pregnancyandethnicfactorsinfluencingbirthsandinfantmortality/2015-10-14>.
162. Ohnishi, T.; Posner, J. B.; Shapiro, W. R. (1992): Vasogenic brain edema induced by arachidonic acid: role of extracellular arachidonic acid in blood-brain barrier dysfunction. In: *Neurosurgery* 30 (4), S. 545–551. DOI: 10.1227/00006123-199204000-00012.

163. Olivecrona, Gunilla (2016): Role of lipoprotein lipase in lipid metabolism. In: *Current opinion in lipidology* 27 (3), S. 233–241. DOI: 10.1097/MOL.0000000000000297.
164. Parnetti, Lucilla; Mignini, Fiorenzo; Tomassoni, Daniele; Traini, Enea; Amenta, Francesco (2007): Cholinergic precursors in the treatment of cognitive impairment of vascular origin: ineffective approaches or need for re-evaluation? In: *Journal of the neurological sciences* 257 (1-2), S. 264–269. DOI: 10.1016/j.jns.2007.01.043.
165. Patterson, Kristine Y.; Bhagwat, Seema A.; Williams, Juhi R.; Howe, Juliette C.; Holden, Joanne M.; Zeisel, Steven H. et al. (2015): USDA Database for the Choline Content of Common Foods, Release 2 (2008).
166. Pietinen, Pirjo; Paturi, Merja; Reinivuo, Heli; Tapanainen, Heli; Valsta, Liisa M. (2010): FINDIET 2007 Survey: energy and nutrient intakes. In: *Public health nutrition* 13 (6A), S. 920–924. DOI: 10.1017/S1368980010001102.
167. Prof. Dr. med. Axel Franz: Amendment 1: Nahrungsergänzung mit Cholin- und Docosahexaensäure bei sehr unreifen Frühgeborenen.
168. Pynn, Christopher J.; Henderson, Neil G.; Clark, Howard; Koster, Grielof; Bernhard, Wolfgang; Postle, Anthony D. (2011): Specificity and rate of human and mouse liver and plasma phosphatidylcholine synthesis analyzed in vivo. In: *Journal of Lipid Research* 52 (2), S. 399–407. DOI: 10.1194/jlr.D011916.
169. Qian, Linxi; Zhao, Aihua; Zhang, Yanan; Chen, Tianlu; Zeisel, Steven H.; Jia, Wei; Cai, Wei (2016): Metabolomic Approaches to Explore Chemical Diversity of Human Breast-Milk, Formula Milk and Bovine Milk. In: *International journal of molecular sciences* 17 (12). DOI: 10.3390/ijms17122128.
170. Rand, James B. (2007): Acetylcholine. In: *WormBook : the online review of C. elegans biology*, S. 1–21. DOI: 10.1895/wormbook.1.131.1.
171. Rassow, Joachim (2012): Biochemie. 67 Tabellen ; [mit Stoffwechselweg-Animationen]. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).

172. Repa, Andreas; Binder, Christoph; Thanhaeuser, Margarita; Kreissl, Alexandra; Pablik, Eleonore; Huber-Dangl, Mercedes et al. (2018): A Mixed Lipid Emulsion for Prevention of Parenteral Nutrition Associated Cholestasis in Extremely Low Birth Weight Infants: A Randomized Clinical Trial. In: *The Journal of Pediatrics* 194, 87-93.e1. DOI: 10.1016/j.jpeds.2017.11.012.
173. Rivera, R.; Chun, J. (2008): Biological effects of lysophospholipids. In: Susan G. Amara (Hg.): *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*. [Online-ausg.]. Berlin [u.a.]: Springer (SpringerLink: Springer e-Books, 160), S. 25–46. Online verfügbar unter https://doi.org/10.1007/112_0507.
174. Rochow, Niels; Fusch, Gerhard; Choi, Arum; Chessell, Lorraine; Elliott, Louann; McDonald, Kimberley et al. (2013): Target fortification of breast milk with fat, protein, and carbohydrates for preterm infants. In: *The Journal of Pediatrics* 163 (4), S. 1001–1007. DOI: 10.1016/j.jpeds.2013.04.052.
175. Rooy, L. de; Hamdallah, H.; Dyall, S. C. (2017): Extremely preterm infants receiving standard care receive very low levels of arachidonic and docosahexaenoic acids. In: *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* 36 (6), S. 1593–1600. DOI: 10.1016/j.clnu.2016.09.033.
176. Ross, Alastair B.; Zangger, Alicia; Guiraud, Seu Ping (2014): Cereal foods are the major source of betaine in the Western diet--analysis of betaine and free choline in cereal foods and updated assessments of betaine intake. In: *Food chemistry* 145, S. 859–865. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.08.122.
177. Ryan, Lisa; Symington, Amy M. (2015): Algal-oil supplements are a viable alternative to fish-oil supplements in terms of docosahexaenoic acid (22:6n-3; DHA). In: *Journal of Functional Foods* 19, S. 852–858. DOI: 10.1016/J.JFF.2014.06.023.
178. Salkind, Neil J. (2010): *Encyclopedia of research design*. Thousand Oaks, Calif: Sage. Online verfügbar unter

<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=474297>.

179. Sanchez-Mejia, Rene O.; Newman, John W.; Toh, Sandy; Yu, Gui-Qiu; Zhou, Yungui; Halabisky, Brian et al. (2008): Phospholipase A2 reduction ameliorates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. In: *Nature neuroscience* 11 (11), S. 1311–1318. DOI: 10.1038/nn.2213.
180. Sastry, P. S. (1985): Lipids of nervous tissue: Composition and metabolism. In: *Progress in lipid research* 24 (2), S. 69–176. DOI: 10.1016/0163-7827(85)90011-6.
181. Schönfeld, Peter; Wojtczak, Lech (2016): Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. In: *Journal of Lipid Research* 57 (6), S. 943–954. DOI: 10.1194/jlr.R067629.
182. Schulze, Susanne (2011): Basics Embryologie. 1. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer (Basics).
183. Schwarzenberg, Sarah Jane; Georgieff, Michael K. (2018): Advocacy for Improving Nutrition in the First 1000 Days to Support Childhood Development and Adult Health. In: *Pediatrics* 141 (2). DOI: 10.1542/peds.2017-3716.
184. Shaw, Gary M.; Carmichael, Suzan L.; Yang, Wei; Selvin, Steve; Schaffer, Donna M. (2004): Periconceptional dietary intake of choline and betaine and neural tube defects in offspring. In: *American journal of epidemiology* 160 (2), S. 102–109. DOI: 10.1093/aje/kwh187.
185. Shunova, Anna; Böckmann, Katrin A.; Minarski, Michaela; Franz, Axel R.; Wiechers, Cornelia; Poets, Christian F.; Bernhard, Wolfgang (2020): Choline Content of Term and Preterm Infant Formulae Compared to Expressed Breast Milk-How Do We Justify the Discrepancies? In: *Nutrients* 12 (12). DOI: 10.3390/nu12123815.
186. Shunova, Anna; Franz, Axel R.; Bernhard, Wolfgang (2019): Unveröffentlicht: Gesamtcholin und unterschiedliche Cholinlieferanten in Formulanahrungen. Uniklinik Tübingen. GNPI Tagung 2019, 2019.

187. Simmons, Daniel L.; Botting, Regina M.; Hla, Timothy (2004): Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. In: *Pharmacological reviews* 56 (3), S. 387–437. DOI: 10.1124/pr.56.3.3.
188. Speer, Christian P. (2019): Das Frühgeborene. In: Christian P. Speer, Manfred Gahr und Jörg Dötsch (Hg.): Pädiatrie. 5., vollständig überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 93–94.
189. Strain, J. J.; McSorley, Emeir M.; van Wijngaarden, Edwin; Kobrosly, Roni W.; Bonham, Maxine P.; Mulhern, Maria S. et al. (2013): Choline status and neurodevelopmental outcomes at 5 years of age in the Seychelles Child Development Nutrition Study. In: *The British journal of nutrition* 110 (2), S. 330–336. DOI: 10.1017/S0007114512005077.
190. Taber, Laura; Chiu, Chun-Hung; Whelan, Jay (1998): Assessment of the arachidonic acid content in foods commonly consumed in the American diet. In: *Lipids* 33 (12), S. 1151–1157. DOI: 10.1007/s11745-998-0317-4.
191. Tang, W. H. Wilson; Wang, Zeneng; Levison, Bruce S.; Koeth, Robert A.; Britt, Earl B.; Fu, Xiaoming et al. (2013): Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. In: *The New England journal of medicine* 368 (17), S. 1575–1584. DOI: 10.1056/NEJMoa1109400.
192. Thomas Rajarethnem, Huban; Megur Ramakrishna Bhat, Kumar; Jc, Malsawmzuali; Kumar Gopalkrishnan, Siva; Mugundhu Gopalram, Ramesh Babu; Rai, Kiranmai Sesappa (2017): Combined Supplementation of Choline and Docosaehaenoic Acid during Pregnancy Enhances Neurodevelopment of Fetal Hippocampus. In: *Neurology research international* 2017, S. 8748706. DOI: 10.1155/2017/8748706.
193. Timischl, Werner (2013): Angewandte Statistik. Eine Einführung für Biologen und Mediziner. 3. Auflage. Wien, Heidelberg, Dordrecht, London, New York: Springer (Lehrbuch).

194. Trujillo-Gonzalez, Isis; Friday, Walter B.; Munson, Carolyn A.; Bachleda, Amelia; Weiss, Ellen R.; Alam, Nazia M. et al. (2019): Low availability of choline in utero disrupts development and function of the retina. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, fj201900444R. DOI: 10.1096/fj.201900444R.
195. Uauy, R.; Hoffman, D. R.; Peirano, P.; Birch, D. G.; Birch, E. E. (2001): Essential fatty acids in visual and brain development. In: *Lipids* 36 (9), S. 885–895. DOI: 10.1007/s11745-001-0798-1.
196. Ueland, Per Magne (2011): Choline and betaine in health and disease. In: *Journal of inherited metabolic disease* 34 (1), S. 3–15. DOI: 10.1007/s10545-010-9088-4.
197. van de Lagemaat, Monique; Rotteveel, Joost; Muskiet, Frits A. J.; Schaafsma, Anne; Lafeber, Harrie N. (2011): Post term dietary-induced changes in DHA and AA status relate to gains in weight, length, and head circumference in preterm infants. In: *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 85 (6), S. 311–316. DOI: 10.1016/j.plefa.2011.09.005.
198. van der Veen, Jelske N.; Kennelly, John P.; Wan, Sereana; Vance, Jean E.; Vance, Dennis E.; Jacobs, René L. (2017): The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. In: *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes* 1859 (9 Pt B), S. 1558–1572. DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.04.006.
199. Vance, J. E.; Vance, D. E. (1990): The assembly of lipids into lipoproteins during secretion. In: *Experientia* 46 (6), S. 560–569. DOI: 10.1007/BF01939694.
200. Vesper, H.; Schmelz, E. M.; Nikolova-Karakashian, M. N.; Dillehay, D. L.; Lynch, D. V.; Merrill, A. H. (1999): Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. In: *The Journal of nutrition* 129 (7), S. 1239–1250. DOI: 10.1093/jn/129.7.1239.

201. Vijayaraghavan, S.; Huang, B.; Blumenthal, E. M.; Berg, D. K. (1995): Arachidonic acid as a possible negative feedback inhibitor of nicotinic acetylcholine receptors on neurons. In: *J. Neurosci.* 15 (5), S. 3679–3687. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.15-05-03679.1995.
202. Voigt, M.; Fusch, C.; Olbertz, D.; Hartmann, K.; Rochow, N.; Renken, C.; Schneider, K. (2006): Analyse des Neugeborenenkollektivs der Bundesrepublik Deutschland. In: *Geburtsh Frauenheilk* 66 (10), S. 956–970. DOI: 10.1055/s-2006-924458.
203. Wallace, Taylor C.; Blusztajn, Jan Krzysztof; Caudill, Marie A.; Klatt, Kevin C.; Natker, Elana; Zeisel, Steven H.; Zelman, Kathleen M. (2018): Choline: The Underconsumed and Underappreciated Essential Nutrient. In: *Nutrition today* 53 (6), S. 240–253. DOI: 10.1097/NT.0000000000000302.
204. Wanders, Anne J.; Zock, Peter L.; Brouwer, Ingeborg A. (2017): Trans Fat Intake and Its Dietary Sources in General Populations Worldwide: A Systematic Review. In: *Nutrients* 9 (8). DOI: 10.3390/nu9080840.
205. Wang, Zeneng; Klipfell, Elizabeth; Bennett, Brian J.; Koeth, Robert; Levison, Bruce S.; DuGar, Brandon et al. (2011): Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. In: *Nature* 472 (7341), S. 57–63. DOI: 10.1038/nature09922.
206. West, Allyson A.; Yan, Jian; Jiang, Xinyin; Perry, Cydne A.; Innis, Sheila M.; Caudill, Marie A. (2013): Choline intake influences phosphatidylcholine DHA enrichment in nonpregnant women but not in pregnant women in the third trimester. In: *The American journal of clinical nutrition* 97 (4), S. 718–727. DOI: 10.3945/ajcn.112.050211.
207. Whelan, Jay; Fritsche, Kevin (2013): Linoleic acid. In: *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)* 4 (3), S. 311–312. DOI: 10.3945/an.113.003772.
208. WHO (1977): WHO: recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for

- cause of perinatal deaths. Modifications recommended by FIGO as amended October 14, 1976. In: *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* 56 (3), S. 247–253.
209. WHO (2012): Born too soon: the global action report on preterm birth. (ISBN 978 92 4 150343 3). Online verfügbar unter https://www.who.int/pmnch/media/news/2012/201204_borntoosoon-report.pdf.
210. WHO (2022): ICD-11 for Mortality and Morbidity Statistics. KA21 Disorders of newborn related to short gestation or low birth weight, not elsewhere classified. Hg. v. WHO. Online verfügbar unter <https://icd.who.int/browse11/l-m/en#/http://id.who.int/icd/entity/1950379483>.
211. Wiechers, Cornelia; Bernhard, Wolfgang; Goelz, Rangmar; Poets, Christian F.; Franz, Axel R. (2021): Optimizing Early Neonatal Nutrition and Dietary Pattern in Premature Infants. In: *International journal of environmental research and public health* 18 (14). DOI: 10.3390/ijerph18147544.
212. Wiedeman, Alejandra M.; Barr, Susan I.; Green, Timothy J.; Xu, Zhaoming; Innis, Sheila M.; Kitts, David D. (2018a): Dietary Choline Intake: Current State of Knowledge Across the Life Cycle. In: *Nutrients* 10 (10). DOI: 10.3390/nu10101513.
213. Wiedeman, Alejandra M.; Chau, Cecil M. Y.; Grunau, Ruth E.; McCarthy, Deanna; Yurko-Mauro, Karin; Dyer, Roger A. et al. (2018b): Plasma Betaine Is Positively Associated with Developmental Outcomes in Healthy Toddlers at Age 2 Years Who Are Not Meeting the Recommended Adequate Intake for Dietary Choline. In: *The Journal of nutrition* 148 (8), S. 1309–1314. DOI: 10.1093/jn/nxy108.
214. Wiedeman, Alejandra M.; Whitfield, Kily C.; March, Kaitlin M.; Chen, Nancy N.; Kroeun, Hou; Sokhoing, Ly et al. (2018c): Concentrations of Water-Soluble Forms of Choline in Human Milk from Lactating Women in Canada and Cambodia. In: *Nutrients* 10 (3). DOI: 10.3390/nu10030381.

215. Wijendran, Vasuki; Lawrence, Peter; Diau, Guan-Yeu; Boehm, G.; Nathanielsz, P. W.; Brenna, J. T. (2002): Significant utilization of dietary arachidonic acid is for brain adrenergic acid in baboon neonates. In: *Journal of Lipid Research* 43 (5), S. 762–767.
216. William W Christie (2019): Plasma Lipoproteins. Hg. v. The lipid web. Online verfügbar unter <https://www.lipidhome.co.uk/lipids/simple/lipoprot/index.htm>, zuletzt aktualisiert am August 2019.
217. Willatts, P.; Forsyth, J. S.; DiModugno, M. K.; Varma, S.; Colvin, M. (1998): Effect of long-chain polyunsaturated fatty acids in infant formula on problem solving at 10 months of age. In: *Lancet (London, England)* 352 (9129), S. 688–691. DOI: 10.1016/s0140-6736(97)11374-5.
218. Williams, J. H.; Errington, M. L.; Lynch, M. A.; Bliss, T. V. (1989): Arachidonic acid induces a long-term activity-dependent enhancement of synaptic transmission in the hippocampus. In: *Nature* 341 (6244), S. 739–742. DOI: 10.1038/341739a0.
219. Wu, Brian T. F.; Dyer, Roger A.; King, D. Janette; Richardson, Kelly J.; Innis, Sheila M. (2012): Early second trimester maternal plasma choline and betaine are related to measures of early cognitive development in term infants. In: *PloS one* 7 (8), e43448. DOI: 10.1371/journal.pone.0043448.
220. Yagi, Shusuke; Fukuda, Daiju; Aihara, Ken-Ichi; Akaike, Masashi; Shimabukuro, Michio; Sata, Masataka (2017): n-3 Polyunsaturated Fatty Acids: Promising Nutrients for Preventing Cardiovascular Disease. In: *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 24 (10), S. 999–1010. DOI: 10.5551/jat.RV17013.
221. Yuhas, Rebecca; Pramuk, Kathryn; Lien, Eric L. (2006): Human milk fatty acid composition from nine countries varies most in DHA. In: *Lipids* 41 (9), S. 851–858. DOI: 10.1007/s11745-006-5040-7.
222. Zablocki, K.; Miller, S. P.; Garcia-Perez, A.; Burg, M. B. (1991): Accumulation of glycerophosphocholine (GPC) by renal cells: osmotic regulation of GPC:choline

- phosphodiesterase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (17), S. 7820–7824. DOI: 10.1073/pnas.88.17.7820.
223. Zeisel, S. H. (1981): Dietary choline: biochemistry, physiology, and pharmacology. In: *Annual review of nutrition* 1, S. 95–121. DOI: 10.1146/annurev.nu.01.070181.000523.
224. Zeisel, Steven (2017): Choline, Other Methyl-Donors and Epigenetics. In: *Nutrients* 9 (5). DOI: 10.3390/nu9050445.
225. Zeisel, Steven H. (2006): Choline: critical role during fetal development and dietary requirements in adults. In: *Annual review of nutrition* 26, S. 229–250. DOI: 10.1146/annurev.nutr.26.061505.111156.
226. Zeisel, Steven H.; Warriar, Manya (2017): Trimethylamine N-Oxide, the Microbiome, and Heart and Kidney Disease. In: *Annual review of nutrition* 37, S. 157–181. DOI: 10.1146/annurev-nutr-071816-064732.
227. Zhi, Wenbo; Wang, Meiyao; She, Jin-Xiong (2011): Selected reaction monitoring (SRM) mass spectrometry without isotope labeling can be used for rapid protein quantification. In: *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 25 (11), S. 1583–1588. DOI: 10.1002/rcm.5023.
228. Zhou, Bin; Xiao, Jun Feng; Tuli, Leepika; Ransom, Habtom W. (2012): LC-MS-based metabolomics. In: *Molecular bioSystems* 8 (2), S. 470–481. DOI: 10.1039/c1mb05350g.
229. Zhou, Jiming; You, Yong; Ryan, Alan J.; Mallampalli, Rama K. (2004): Upregulation of surfactant synthesis triggers ABCA1-mediated basolateral phospholipid efflux. In: *Journal of Lipid Research* 45 (9), S. 1758–1767. DOI: 10.1194/jlr.M400179-JLR200.
230. Zhu, Yeyi; Li, Mengying; Rahman, Mohammad L.; Hinkle, Stefanie N.; Wu, Jing; Weir, Natalie L. et al. (2019): Plasma phospholipid n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in relation to cardiometabolic markers and gestational diabetes: A

longitudinal study within the prospective NICHD Fetal Growth Studies. In: *PLoS medicine* 16 (9), e1002910. DOI: 10.1371/journal.pmed.1002910.

8 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen in der Abteilung Neonatologie unter Betreuung von Prof. Dr. med. Dr. rer. physiol. Wolfgang Bernhard durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. med. Christoph Maas (Facharzt für Kinder und Jugendmedizin, Neonatologie Tübingen), Prof. Dr. med. Axel Franz (Oberarzt für Kinder und Jugendmedizin, Neonatologie Tübingen), Prof. Dr. med. Dr. rer. physiol. Wolfgang Bernhard (Facharzt für Physiologie, Ernährungswissenschaftler und Laborleiter, klinische & experimentelle Forschung), Dr. med. Katrin Alexandra Böckmann (Fachärztin für Kinder und Jugendmedizin, Neonatologie Tübingen) und Prof. Dr. med. Christian Poets (Direktor der Abt. Neonatologie, Universitätskinderklinik Tübingen).

Die Messungen der Muttermilchproben mittels Massenspektrometer und Gaschromatographen wurden nach Einarbeitung durch Prof. Dr. Dr. med. Wolfgang Bernhard und Anna Shunova von mir eigenständig durchgeführt. Die Messung der Plasmen der Frühgeborenen wurde durch Anna Shunova durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte, nach Beratung durch das Institut für klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen, durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Quellen wurden als solche gekennzeichnet.

Wannweil, den

[Unterschrift]

9 VERÖFFENTLICHUNG

Bernhard, Wolfgang; Böckmann, Katrin; Maas, Christoph; Mathes, Michaela; Hövelmann, Julia; Shunova, Anna et al. (2019): Combined choline and DHA supplementation: a randomized controlled trial. In: *European journal of nutrition*. DOI: 10.1007/s00394-019-01940-7.

10 DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich mich bei den Eltern der Frühgeborenen dieser Studie für ihr Vertrauen und ihre bereitwillige Mitarbeit bedanken. Auch bedanke ich mich bei den Müttern, die bereit waren ihre Muttermilch für unsere Messungen zu spenden und bei den Mitarbeitenden der Neonatologie Tübingen, die bereit waren die Mehrarbeit zu leisten, um die Frühgeborenen täglich mit dem Studiensupplement zu füttern. Außerdem gilt mein Dank Frau Dr. Böckmann, Herrn Prof. Dr. Franz und Herrn Dr. Maas die mich in der klinischen Ausführung und Ausarbeitung der Studie tatkräftig unterstützt haben. Zudem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Schleicher und Herrn Prof. Dr. Cegan für Ihre Unterstützung in der gaschromatographischen Messung im Zentrallabor der Uniklinik Tübingen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Bernhard für die Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Dissertation. Das große Vertrauen, welches Herr Dr. Dr. Bernhard in mich hatte hat mich sehr bestärkt. Ich habe mich immer äußerst gut betreut, unterstützt und gefördert gefühlt und bin Herrn Dr. Dr. Bernhard sehr dankbar, mit welcher Geduld er mich bei der Ausarbeitung dieser Doktorarbeit unterstützt hat und auch wieviel wir dabei lachen konnten. Überdies hinaus war es eine sehr bereichernde Erfahrung auf dem GNPI Kongress 2019 sprechen zu dürfen und von Herrn Dr. Franz und Herrn Dr. Dr. Bernhard so sehr unterstützt zu werden.

Zuletzt möchte ich mich bei Anna Shunova für die große Unterstützung in der Laborarbeit bedanken. Mit einer unglaublichen Geduld hat sie es geschafft mir das Arbeiten im Labor nahe zu bringen und mich unterstützt, wo sie nur konnte. Die gemeinsame Zeit mit ihr war nicht nur Arbeit, sie hat auch viel Spaß gemacht.

„If you think you are too small to make a difference, you haven't spent a night with a mosquito.“ – Subsahara afrikanisches Sprichwort.