

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Tübingen, Abteilung Kinderheilkunde IV

(Schwerpunkt: Neonatologie, neonatologische
Intensivmedizin)

Einfluss einer höheren Eiweißzufuhr auf Serum-
Wachstumsfaktoren und ihre Bindungsproteine bei unreifen
Frühgeborenen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Bleeker, Christine

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Franz
2. Berichterstatter: Professor Dr. E. Wieland
Tag der Disputation: 15.03.2017

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	10
1.1 STEIGENDE ANZAHL AN FRÜHGEBORENEN, BESTEHENDE DEFIZITE BEI DER ADÄQUATEN ERNÄHRUNG	10
1.2 BEDEUTUNG ENTERALER ERNÄHRUNG	11
1.3 VORTEILE DER MUTTERMILCHERNÄHRUNG	11
1.4 NACHTEILE DER MUTTERMILCHERNÄHRUNG	12
1.4.1 VARIABILITÄT DER MAKRONÄHRSTOFFE IN MUTTERMILCH	12
1.4.2 NÄHRSTOFFDEFIZITE DER MUTTERMILCH	12
1.4.3 MÖGLICHE ÜBERVERSORGUNG BEI DER MUTTERMILCHERNÄHRUNG	13
1.5 INDIVIDUELLE SUPPLEMENTIERUNG ZUM AUSGLEICH DER NÄHRSTOFFVARIABILITÄT BEI DER ERNÄHRUNG MIT MUTTERMILCH	13
1.5.1 INDIVIDUELLE SUPPLEMENTIERUNG MIT HILFE DER MUTTERMILCHANALYSE ...	14
1.5.2 INDIVIDUELLE SUPPLEMENTIERUNG MIT HILFE VON METABOLITEN	14
1.6 PROTEINE UND IHR STELLENWERT FÜR DAS WACHSTUM	15
1.7 AKTUELLE EMPFEHLUNGEN ZUR PROTEINZUFUHR	16
1.8 DER EINFLUSS HORMONELLER WACHSTUMSFAKTOREN	16
1.9 DIE BEDEUTUNG VON INSULIN LIKE GROWTH FACTOR-I (IGF-I)	17
1.9.1 IGF-I UND BRONCHOPULMONALE DYSPLASIE (BPD)	18
1.9.2 IGF- I UND FRÜHGEBORENEN RETINOPATHIE (ROP)	18
1.9.3 IGF-I UND KOGNITIVE ENTWICKLUNG	18
1.9.4 IGF-I UND WACHSTUM	19
1.9.5 IGF-I UND NÄHRSTOFFZUFUHR	20
1.10 WEITERE HORMONELLE FAKTOREN DIE EINFLUSS AUF DAS WACHSTUM HABEN	20
1.11 ZUSAMMENFASSENDE BETRACHTUNG DER BISHERIGEN ERKENNTNISSE ÜBER DEN ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DER NÄHRSTOFFZUFUHR UND DEM WACHSTUM VON FRÜHGEBORENEN	21
1.12 FRAGESTELLUNG	22
2. PATIENTEN UND METHODEN	23
2.1 STUDIENDESIGN	23
2.2 PRIMÄRES ÜBERGEORDNETES ZIEL DER STUDIE	23
2.3 VOTUM DER ETHIK-KOMMISSION	24
2.4 PROBANDEN (EIN- UND AUSSCHLUSSKRITERIEN)	25
2.5 ABLAUF DER STUDIE	25

2.6 ERHOBENE DATEN	26
2.6.1 EINMALIG ERHOBENE DATEN.....	26
2.6.2 TÄGLICH ERHOBENE DATEN	27
2.6.3 WÖCHENTLICH ERHOBENE DATEN.....	28
2.6.4 ERFASSTE DIAGNOSEN EINSCHLIEßLICH MAXIMALER AUSPRÄGUNG/ SCHWERE-GRAD.....	28
2.6.5 MEDIKAMENTE.....	29
2.7 BLUTENTNAHMEN.....	29
2.8 FRAUENMILCHANALYSEN	30
2.9 INTERVENTION.....	31
2.9.1 GRUPPE 1: GEGENWÄRTIGE STANDARDISIERTE FRAUENMILCH- SUPPLEMENTIERUNG.....	31
2.9.2 GRUPPE 2A: INDIVIDUALISIERTE FRAUENMILCHSUPPLEMENTIERUNG.....	32
2.9.3 GRUPPE 2B: STANDARDISIERTE FRAUENMILCHSUPPLEMENTIERUNG MIT EINEM NEUEN FRAUENMILCHSUPPLEMENT MIT ERHÖHTEM EIWEIßGEHALT UND FETT.....	33
2.9.4 VERORDNUNG DER GESAMTNAHRUNGSMENGE (ML/KG/D) UND VORGEHEN BEI UNZUREICHENDER VERFÜGBARKEIT VON MUTTERMILCH.....	33
2.9.5 MAßNAHMEN BEI UNZUREICHENDEM GEDEIHEN.....	34
2.10 INHALTSSTOFFE DER FRAUENMILCHSUPPLEMENTE PRO 5 G PULVER	34
2.11 DOKUMENTATION	36
2.12 BESTIMMUNG VON INSULIN-LIKE-GROWTH-FACTOR-I (IGF-I) IM PLASMA	37
2.12.1 QUANTITATIVER NACHWEIS VON IGF-I MIT HILFE EINES SPEZIFISCHEN KOMPETITIVEN RADIOIMMUNOASSAYS	37
2.12.2 EINHEITEN UND MESSBEREICH	37
2.12.3 TESTSPEZIFISCHE MATERIALEN	38
2.12.4 TESTDURCHFÜHRUNG	38
2.12.5 AUSWERTUNG	39
2.13 BESTIMMUNG VON INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR II (IGF-II) IM PLASMA.....	40
2.13.1 QUANTITATIVER NACHWEIS VON IGF-II MIT HILFE EINES SPEZIFISCHEN KOMPETITIVEN RADIOIMMUNOASSAYS	40
2.13.2 EINHEITEN UND MESSBEREICHE.....	40
2.13.3 PROBENEXTRAKTION.....	41
2.13.4 TESTSPEZIFISCHE MATERIALIEN	41
2.13.5 TESTDURCHFÜHRUNG	42
2.13.6 AUSWERTUNG	42

2.14 BESTIMMUNG VON INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR BINDUNGSPROTEIN-3 (IGFBP-3) IM PLASMA.....	43
2.14.1 QUANTITATIVER NACHWEIS MIT HILFE EINES SPEZIFISCHEN KOMPETITIVEN RADIOIMMUNOASSAYS (RIA).....	43
2.14.2 EINHEITEN UND MESSBEREICHE	43
2.14.3 TESTSPEZIFISCHE MATERIALIEN	44
2.14.4 TESTDURCHFÜHRUNG	44
2.14.5 AUSWERTUNG	45
2.15 BESTIMMUNG VON INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR BINDUNGSPROTEIN 1 (IGFBP-1) IM PLASMA.....	45
2.15.1 QUANTITATIVER NACHWEIS VON IGFBP-1 MIT HILFE EINES KOMMERZIELLEN ENZYMIMMUNOASSAYS.....	45
2.15.2 TESTDURCHFÜHRUNG	46
2.15.3 AUSWERTUNG	47
2.16 BESTIMMUNG VON HUMANEM WACHSTUMSHORMON (HGH) IM PLASMA	47
2.16.1 QUANTITATIVER NACHWEIS DES WACHSTUMSHORMON (GH) MIT HILFE EINES KOMMERZIELLEN ENZYMIMMUNOASSAYS.....	47
2.16.2 EINHEITEN UND MESSBEREICH	48
2.16.3 TESTDURCHFÜHRUNG	48
2.16.4 AUSWERTUNG	49
2.17 STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	50
3. ERGEBNISSE	51
3.1 CHARAKTERISTIKA DER PROBANDEN	51
3.2 MORBIDITÄT DER PROBANDEN.....	53
3.3 BLUTENTNAHMEN.....	53
3.4 PROTEINZUFUHR JEWEILS FÜNF TAGE VOR DEN EINZELNEN BLUTENTNAHMEN .54	
3.5 WACHSTUMSFAKTOREN: STANDARDEIWEIßGRUPPE (1) VERGLICHEN MIT DER HOCHWEIßGRUPPE (2)	56
3.5.1 IGF-I	56
3.5.2 IGF-II	57
3.5.3 IGFBP-3.....	58
3.5.4 IGFBP-1	60
3.5.5 WACHSTUMSHORMON (GH)	62
3.6 KORRELATIONSANALYSEN ZWISCHEN DER EIWEIßZUFUHR UND DEM JEWEILIGEN WACHSTUMSFAKTOR	63
3.6.1 IGF-I	63

3.6.2 IGF-II	65
3.6.3 IGFBP-3	66
3.6.4 IGFBP-1	67
3.6.5 WACHSTUMSHORMON (GH)	68
3.7 KORRELATION DER MITTLEREN GEWICHTSZUNAHME MIT DEM JEWEILIGEN WACHSTUMSFAKTOR	69
3.7.1 IGF-I	69
3.7.2 IGF-II	71
3.7.3 IGFBP-3	72
3.7.4 IGFBP-1	73
3.7.5 WACHSTUMSHORMON (GH)	74
3.8 WACHSTUMSFAKTOREN: VERGLEICH DER BEIDEN HOCHWEIßGRUPPEN MITEINANDER, INDIVIDUELLE SUPPLEMENTIERUNG (2A) VERGLICHEN MIT SUPPLEMENTIERUNG MIT DEM EIWEIFREICHEREN NEUEN FRAUENMILCHSUPPLEMENT (2B).	75
3.8.1 IGF-I	75
3.8.2 IGF-II	75
3.8.3 IGFBP-3	76
3.8.4 IGFBP-1	76
3.8.5 WACHSTUMSHORMON (GH)	77
4. DISKUSSION.....	78
4.1 WACHSTUMSFAKTOREN: STANDARDEIWEIFGRUPPE (1) VERGLICHEN MIT HOCHWEIßGRUPPE (2) SOWIE KORRELATIONSANALYSE ZWISCHEN DER VERABREICHTEN PROTEINMENGE FÜNF TAGE VOR DER BLUTENTNAHME UND DEM JEWEILIGEN WACHSTUMSFAKTOR	78
4.1.1 IGF-I	78
4.1.2 IGF-II	80
4.1.3 IGFBP-3	81
4.1.4 IGFBP-1	82
4.1.5 WACHSTUMSHORMON (GH)	83
4.2 KORRELATION ZWISCHEN DER MITTLEREN GEWICHTSZUNAHME UND DEM JEWEILIGEN WACHSTUMSFAKTOR	84
4.3 PRÜFUNG DER HYPOTHESE B: VERGLEICH DER BEIDEN HOCHWEIßGRUPPEN (GRUPPE 2A/2B).....	85
4.4 ZUSAMMENFASSENDER BETRACHTUNG DES FEHLENDEN ZUSAMMENHANGS ZWISCHEN DER PROTEINZUFUHR UND DEN BESTIMMTEN WACHSTUMSFAKTOREN ..	87
4.5 METHODENKRITIK.....	89

4.5.1 CHARAKTERISTIKA DER PROBANDEN	89
4.5.2 BLUTENTNAHMEN	89
4.5.3 PROTEINZUFUHR JEWEILS FÜNF TAGE VOR DEN EINZELNEN BLUTENTNAHMEN	90
4.6 SCHLUSSFOLGERUNG	91
5. ZUSAMMENFASSUNG	92
5.1 EINLEITUNG	92
5.2 PROBANDEN UND METHODEN	92
5.3. ERGEBNISSE	93
5.4 DISKUSSION	93
5.5 SCHLUSSFOLGERUNG	93
LITERATURVERZEICHNIS	94
ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL DER DISSERTATIONSSCHRIFT	99
DANKSAGUNG	100
LEBENS LAUF	101

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
AGA	Appropriate for Gestational Age, entsprechend dem Gestationsalter
DHA	Docosahexaensäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESPGHAN	European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition
FG	Frühgeborene
FM 85	Frauenmilch Supplement der Firma Nestlé
GA	Gestationsalter
GH	Growth Hormon = Wachstumshormon
GG	Geburtsgewicht
Hgh	humanes Wachstumshormon
HMA	Human Milk Analyser
IGF-I	Insulin like Growth Faktor-I
IGF-II	Insulin like Growth Faktor-II
IGFBP-1	Insulin like Growth Faktor Bindungsprotein-1
IGFBP-3	Insulin like Growth Faktor-3
KH	Kohlenhydrate
LGA	Large for gestational age, groß bezogen auf das Gestationsalter
MDI	Mental Development Index
RIA	Radioimmunoassay
ROP	Retinopathy of Prematurity = Frühgeborenen Retinopathie
SGA	Small for gestational age, klein bezogen auf das Gestationsalter

SSW

Schwangerschaftswoche

1. Einleitung

1.1 Steigende Anzahl an Frühgeborenen, bestehende Defizite bei der adäquaten Ernährung

Jährlich werden in Deutschland mehr als 9000 Kinder mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g geboren. [1] Die medizinische Versorgung und das Überleben von sehr kleinen Frühgeborenen (FG), die beispielweise mit 24 Schwangerschaftswochen (SSW) und einem Geburtsgewicht (GG) von 500-600 g geboren werden, hat sich deutlich verbessert. [2] Die postnatale Wachstumsrestriktion bleibt jedoch ein Hauptproblem bei der Versorgung von Frühgeborenen: Im Alter von 36 Wochen post menstruationem zeigen 91 % der Kinder eine Wachstumsrestriktion. [3] Es wurde beobachtet, dass das Wachstum von Frühgeborenen zwischen der Geburt und der Entlassung aus der stationären Behandlung einen Einfluss auf die langfristige motorische Entwicklung der Kinder zu haben scheint. [4] Die Ernährung spielt für das Wachstum und die neurokognitive Entwicklung eine zentrale Rolle. [5] Das Ziel der Ernährung sollte nicht nur sein, die Wachstumsrate entsprechend der intrauterinen Wachstumsrate zu erreichen, sondern darüber hinaus eine gesunde Körperzusammensetzung zu erzielen. Außerdem sollte eine physiologische Zellfunktion und eine normale Entwicklung von Geweben und Organen erreicht werden. [2]

Das steigende Körpergewicht scheint somit kein guter Indikator für eine erfolgreiche Ernährung zu sein, da das Gewicht die Veränderung der Körperzusammensetzung nicht zwingend widerspiegelt. [2] Allerdings ist das Körpergewicht immer noch das Standardmaß für die Verordnung der Nahrung in den Kliniken. Die wahren ernährungsphysiologischen Bedürfnisse bleiben weitestgehend unbekannt. [2]

1.2 Bedeutung enteraler Ernährung

Bei der Versorgung der Frühgeborenen mit Nährstoffen sollte die enterale Ernährung angestrebt werden, da diese nach der Geburt den natürlicheren Weg der Nahrungsaufnahme darstellt. Sowohl die Nahrungsmenge, als auch die Nahrungszusammensetzung sind bei der enteralen Ernährung von entscheidender Bedeutung. Darüber hinaus haben der Beginn der enteralen Ernährung, die Steigerungsrate der Nahrungsmenge und die Art der Nahrung einen Einfluss auf die Entwicklung des Frühgeborenen. [6] Sowohl die Nahrungsmenge als auch die Dosierung der Nährstoffe muss dem Bedarf des Kindes angepasst werden.

1.3 Vorteile der Muttermilchernährung

Neben den weitläufig bekannten Vorteilen von Muttermilch, wie beispielsweise Infektionsschutz [7], [8] und bessere kognitive Entwicklung [9] hat sie auch für Frühgeborene mit niedrigem Geburtsgewicht viele Vorteile. Beispielsweise im Zusammenhang mit möglichen Erkrankungen hat Muttermilch positive Effekte. Eine Studie mit 212 Frühgeborenen mit sehr niedrigem Geburtsgewicht zeigte, dass das Vorkommen von Infektionen, Septitiden und Meningitiden signifikant niedriger war, wenn diese mit Muttermilch ernährt wurden. [8] Darüber hinaus haben Frühgeborene, die mit Muttermilch ernährt werden, seltener eine nekrotisierende Enterocolitis als Frühgeborenen, die mit Formula ernährt werden. Schon eine nur anteilige Ernährung mit Muttermilch senkt das Risiko. [10] Frauenmilch führt außerdem zu einer Verbesserung der neurokognitiven Entwicklung. [11] Daher ist Muttermilch für Frühgeborene die bevorzugte Nahrung.

1.4 Nachteile der Muttermilchernährung

1.4.1 Variabilität der Makronährstoffe in Muttermilch

Bei Frauenmilch handelt es sich um ein Produkt der Natur, das starken Schwankungen der Inhaltsstoffe unterworfen sein kann. Studien konnten zeigen, dass es zu Schwankungen im Verlauf der Laktationsperiode kommt, aber dass es auch von Frau zu Frau große Unterschiede gibt. [12], [13] Der angenommene Proteingehalt der Muttermilch von 2,1 -2,4 g / 100 kcal existiert nur um Tag 14 der Laktationperiode. Früher produzierte Milch hat einen höheren Proteingehalt, später produzierte Milch hat einen niedrigeren Proteingehalt. [14] Der Fettgehalt variiert ebenfalls. Es konnten Schwankungen im Tagesverlauf, zwischen Vor- und Nachmilch und zwischen den Frauen beobachtet werden. Die Schwankungen sind über die Dauer der Laktation aber weniger stark als bei den Proteinen. Der Fettgehalt der Muttermilch bestimmt den Energiegehalt. [15] Der Beitrag von Laktose und Protein zum Energiegehalt der Muttermilch ist im Allgemeinen konstant. [16]

1.4.2 Nährstoffdefizite der Muttermilch

Muttermilch enthält allerdings nicht alle Nährstoffe, um den Ansprüchen der schnell wachsenden Frühgeborenen mit niedrigem Geburtsgewicht gerecht zu werden. [17] Aus diesem Grund werden der Muttermilch sogenannte Multikomponenten Fortifier, welche die Muttermilch mit zusätzlichen Proteinen, Kohlenhydraten, Vitaminen und Mineralstoffen anreichern, zugesetzt. [18] Wird Muttermilch standardisiert nach der Empfehlung des Herstellers mit den beschriebenen Frauenmilchsupplementen angereichert, ist dies in der Hälfte der Fälle auch noch unzureichend und die empfohlene Nährstoffzufuhr wird verfehlt. Es besteht das Risiko einer Unterernährung. Das Nichterreichen der

empfohlenen Nährstoffzufuhr ist dabei unabhängig vom verwendeten Supplement und beruht allein auf der schon beschriebenen Variabilität der Inhaltstoffe der Muttermilch. [19]

1.4.3 Mögliche Überversorgung bei der Muttermilchernährung

Ist die Milch überdurchschnittlich reichhaltig an Makronährstoffen besteht bei standardisierter Supplementierung das Risiko der Überversorgung was zumindest theoretisch die langfristige körperliche Entwicklung beeinträchtigen könnte. Es besteht beispielsweise das Risiko für die Entstehung von Adipositas und dem metabolischen Syndrom. [20] Eine mögliche Lösung um sowohl eine Überversorgung als auch eine Unterversorgung zu vermeiden ist die individuelle Supplementierung von Muttermilch.

1.5 Individuelle Supplementierung zum Ausgleich der Nährstoffvariabilität bei der Ernährung mit Muttermilch

Frühgeborene Kinder erhalten aufgrund der beschriebenen Vorteile Muttermilch, die mit Frauenmilchsupplement angereichert wird, um dem hohen Nährstoffbedarf der Frühgeborenen gerecht zu werden. Damit auch die beschriebenen Nachteile wie beispielsweise eine Über- bzw. Unterversorgung vermieden werden können, sollten die Inhaltstoffe der Frauenmilch bekannt sein. Werden die Inhaltstoffe wie Protein, Fett und Energie bestimmt oder werden über Metabolite (z.B. Harnstoffkonzentration im Serum) Rückschlüsse auf die Zufuhr gezogen, so können Defizite bzw. eine Überversorgung erkannt werden und diese gezielt durch Zugabe oder Reduktionen der Zugabe von Makronährstoffen ausgeglichen werden. [21] Für die individuelle

Supplementierung gibt es also verschiedene Ansätze, die im Folgenden beschrieben werden.

1.5.1 Individuelle Supplementierung mit Hilfe der Muttermilchanalyse

Menjo et al. haben dafür in einer Studie die Genauigkeit des Human Milk Analyser (HMA) der Firma Miris (Uppsala, Schweden) im Vergleich zu einem als Goldstandard betrachteten chemischen Verfahren getestet. Der HMA ermöglicht es schnell, ohne großen Aufwand und mit nur ca. 2 ml Muttermilch die Inhaltstoffe Fett, Protein, Kalorien und Laktose in der Muttermilch zu bestimmen. Eine Messung der Muttermilch am Patientenbett unmittelbar vor der Mahlzeit ist dadurch möglich. In der Studie wurde auch die Reproduzierbarkeit der Messwerte des HMA getestet: lediglich bei verdünnten Proben waren die Lactosewerte nicht zuverlässig. Die übrigen Inhaltstoffe wurden zuverlässig bestimmt. [21]

1.5.2 Individuelle Supplementierung mit Hilfe von Metaboliten

Arslanoglu et al. entwickelten eine weitere Methode der individuellen Supplementierung. Der Ansatz dieser Studie basierte nicht auf der Milchanalyse, die Supplementierung orientierte sich an der metabolischen Antwort des Kindes. Diese Methode funktioniert über die Messung von Harnstoff im kindlichen Blut. Die Blutentnahmen erfolgten in dieser Studie zweimal pro Woche, verglichen wurde eine standardisiert ernährte Gruppe mit einer Gruppe die eine höhere Proteinzufuhr erhielt. Voraussetzung war dabei eine physiologische Nierenfunktion. [22] Die Studie konnte zeigen, dass diese harnstoffbasierte Methode der individuellen Supplementierung durchführbar und

wahrscheinlich sicher ist. Darüber hinaus hatten die Frühgeborenen die nach dieser individuellen Supplementierungsmethode ernährt wurden im Vergleich mit der standardisiert ernährten Gruppe eine signifikant höhere Gewichtszunahme und eine signifikant höhere Zunahme bezüglich des Kopfumfangs. [22] Da Kopfumfangwachstum unter anderem ein Ausdruck des Gehirnwachstums ist, könnte dies darauf hindeuten, dass die Nahrungsintervention auch das Gehirnwachstum verbessert hat.

1.6 Proteine und ihr Stellenwert für das Wachstum

Proteine nehmen bei der Ernährung des Frühgeborenen eine besondere Stellung ein. Neben einem physiologischen Wachstum haben Proteine eine große Bedeutung für die magere/fettfreie Körpermasse, beispielsweise konnte ein Zusammenhang zwischen dem Wachstum von Organen, wie dem Gehirn mit der Proteinzufuhr beobachtet werden. [23] Intrauterin erhalten Feten diaplazentar ca. 4 g/kg/d Aminosäuren. Studien haben gezeigt, dass Frühgeborene häufig weniger Proteine erhalten als für eine adäquate Entwicklung notwendig sind. [2] Die Zurückhaltung in der Proteinzufuhr bei Frühgeborenen in der Vergangenheit beruhte unter anderem auf der Befürchtung, mit höherer Zufuhr die oft aufgrund der Unreife bei Frühgeborenen bestehende metabolische Azidose zu aggravieren oder überhöhte Ammoniakkonzentrationen bzw. eine Urämie zu verursachen. [20] Diese Befürchtungen, beruhen auf älteren Studien, die unter anderen Voraussetzungen durchgeführt wurden und mit den heutigen Gegebenheiten nicht vergleichbar sind: Zunächst haben sich die Proteinzusätze für parenterale und enterale Ernährung in ihrer Qualität und Zusammensetzung der Aminosäuren deutlich verbessert. Darüber hinaus trägt der allgemeine medizinische Fortschritt zu einer besseren physiologischen Verfassung von Frühgeborenen in der heutigen Zeit bei. Dies macht einen Vergleich mit den

alten Beobachtungen schwierig. Diese nicht mehr zeitgemäßen Beobachtungen, die durch neuere Studien auch nicht bestätigt wurden, sollten nicht dazu führen, dass Frühgeborene zu wenige Aminosäuren zugeführt bekommen. Sie können nur noch darstellen, was bei einer deutlich zu hohen Dosierung die Folge sein könnte. Daher ist es von entscheidender Bedeutung, zu jeder Zeit eine an den Bedarf des Kindes angepasste Menge an Proteinen zu verabreichen und so einen Mangel oder eine Überdosierung zu vermeiden.

1.7 Aktuelle Empfehlungen zur Proteinzufuhr

Der Bedarf an Aminosäuren eines frühgeborenen Kindes für eine ausreichende Proteinbiosynthese und eine gute Proteinbilanz, sowie ein adäquates Wachstum beträgt zwischen der 24. und 30. Schwangerschaftswoche 3,6-4,8 g/kg/d. Zwischen der 30. und 36. Schwangerschaftswoche geht der Bedarf auf 2-3 g/kg/d zurück und am errechneten Geburtstermin hat das Kind einen Proteinbedarf von 1,5-2 g/kg/d. Das entspricht dem eines am Termin geborenen Kindes. [6] Die American Academy of Pediatrics empfiehlt eine enterale Eiweißzufuhr von 3,5 bis 4 g/kg/d für Frühgeborene. [19] Eine ähnliche Empfehlung gibt die European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN). Sie empfiehlt ein Ziel von 4,0-4,5 g/kg/d für Frühgeborene bis 1000 g und 3,5-4,0 g/kg/d von 1000-1800 g. [24]

1.8 Der Einfluss hormoneller Wachstumsfaktoren

Das fetale und postnatale Wachstum wird nicht nur durch die Nährstoffzufuhr bestimmt, sondern auch durch verschiedene endogene Wachstumsfaktoren. Die Regulation des postnatalen Wachstums findet unter anderem über Insulin und Insulin-like-growth Faktor-I (IGF-I) statt. [25] Einflussfaktoren auf die

Produktion vom Wachstumsfaktor IGF-I sind wiederum eine ausreichende Nährstoffzufuhr, sowie eine adäquate Insulinwirkung. [26],[27]. Neben den beschriebenen Faktoren spielt das Wachstumshormon, weitere Insulin like growth Faktoren und ihre Bindungsproteine eine Rolle bei der hormonellen Steuerung des Wachstums.

1.9 Die Bedeutung von Insulin like growth factor-I (IGF-I)

Das Polypeptid IGF-I, welches überwiegend in der Leber synthetisiert wird, stimuliert die Zellproliferation, die Reifung und Differenzierung der Zellen und reduziert die Apoptose innerhalb des zentralen Nervensystems, der Netzhaut und der Bauchspeicheldrüse. [28] Niedrige IGF-I Plasmakonzentrationen bei Frühgeborenen gehen mit einem höheren Risiko für eine Frühgeborenen Retinopathie (ROP), einer langsameren Gewichtszunahme, sowie einem schlechteren Kopfwachstum und niedrigerem Gehirnvolumen einher. [29] Unmittelbar nach der Geburt verringert sich die IGF-I Konzentration schnell. Diese, im Vergleich zu intrauterinen Konzentrationen, niedrigen IGF-I Spiegel bleiben bei Frühgeborenen über mehrere Wochen bestehen. [30], [31] Die Aktivität von IGF-I wird auch über die Bindungsproteine reguliert, diese verändern sich in der perinatalen Periode. In der intrauterinen Umgebung dominieren Insulin like growth Faktor Bindungsprotein-1 (IGFBP- 1) und IGFBP-2, während IGFBP-3 die Hauptrolle im späteren Leben spielt. [32] IGF-I hat auch eine Bedeutung bei der postnatalen Entstehung von Krankheiten.

1.9.1 IGF-I und Bronchopulmonale Dysplasie (BPD)

(Definition siehe 2.6.4)

Bei Frühgeborenen, die an einer Bronchopulmonalen Dysplasie erkrankt waren, zeigten sich niedrige IGF-I Konzentrationen, verglichen mit Frühgeborenen die nicht erkrankt waren. Dies konnte für den IGF-I Spiegel in den ersten drei Lebenswochen gezeigt werden. [32]

1.9.2 IGF- I und Frühgeborenen Retinopathie (ROP)

Auch bei anderen Erkrankungen konnte ein Zusammenhang mit niedrigen IGF-I Konzentrationen festgestellt werden. Hellström et al. fanden heraus, dass neben den größten bekannten Risikofaktoren für eine Frühgeborenen Retinopathie (ROP), dem niedrigen Geburtsgewicht und dem Gestationsalter, die IGF-I Serumkonzentration im postmenstruellen Alter von der 30. bis zu der 33. Woche ein mindestens genauso wichtiger prädiktiver Faktor ist. [31] Geringe Konzentration an IGF-I im Serum bei Frühgeborenen scheinen mit einem erhöhten Risiko für eine ROP in Verbindung zu stehen, sowie für andere schwere perinatale Morbiditäten unter anderem für die bereits beschriebene BPD. [31]

1.9.3 IGF-I und kognitive Entwicklung

Hansen-Pupp et al. untersuchten in einer Studie den Zusammenhang zwischen Serum IGF-I, dem Gehirnvolumen und der neurologischen Entwicklung. Das wichtigste Ergebnis dieser Studie war, dass eine höhere Steigerungsrate der

IGF-I Konzentration im Blut von der Geburt bis zu einem postmenstruellen Alter von 35 Wochen bei sehr kleinen Frühgeborenen mit einem geringeren Risiko für einen erniedrigten Mental Development Index (MDI) im Alter von zwei Jahren verbunden war. [33] Außerdem waren mit der erhöhten Steigerungsrate der IGF-I Konzentration ein höheres Kleinhirnvolumen, sowie ein größeres Volumen der weißen Substanz und eine verbesserte Entwicklung im Alter von zwei Jahren assoziiert. [33]

1.9.4 IGF-I und Wachstum

In Studien konnte gezeigt werden, dass es eine Verbindung zwischen dem IGF-I Spiegel bei Frühgeborenen und ihrem Geburtsgewicht gibt. [34] Es wurde festgestellt, dass am errechneten Entbindungstermin eine Assoziation des IGF-I Spiegels mit der Gewichtszunahme vor dem errechneten Entbindungstermin und auch nach dem errechneten Entbindungstermin besteht. Höhere IGF-I Spiegel zeigen höhere Wachstumsraten sowohl vor, als auch nach dem errechneten Entbindungstermin. [30] Bei am Termin geborenen Kindern konnte keine Korrelation zwischen der IGF-I Konzentration und der anschließenden Gewichtszunahme gefunden werden, während es aber eine Assoziation mit der Längenzunahme gab. Es wurde darüber hinaus eine Assoziation zwischen hohen IGF-I Spiegel im Alter von 3 und 12 Monaten und niedrigen BMI-Werten zur Zeit der Messung gefunden. [35], Daraus könnte man ableiten, dass hohe IGF-I Spiegel vor Adipositas schützen. Frühgeborene und Kinder mit Wachstumsrestriktion hätten im Umkehrschluss ein erhöhtes Risiko für Fettleibigkeit aufgrund der niedrigen IGF-I Spiegel. [36] Studien belegen diese Vermutung. Ehemalige Frühgeborene weisen in der Kindheit eine erhöhte Fettmasse und verringerte Muskelmasse auf. Dieser Trend kann sich bis ins Erwachsenenalter fortsetzen. [37]

1.9.5 IGF-I und Nährstoffzufuhr

Bezüglich der Beeinflussung des IGF-I Spiegels durch die Proteinzufuhr findet man in Studien unterschiedliche Ergebnisse. Es wurde beobachtet, dass eine niedrige Proteinzufuhr mit niedrigen IGF-I Spiegeln verbunden ist. [38], was wiederum zu einer erhöhten Körperfettmasse in der späteren Kindheit führt. [36] Eine weitere Studie hatte zum Ergebnis, dass Kinder die Folgemilch mit hohem Proteinanteil erhielten, höhere IGF-Spiegel aufwiesen, als solche die mit Folgemilch mit niedrigerem Proteinanteil ernährt wurden. [39] Hansen-Pupp et al. konnten zeigen, dass die IGF-I Konzentration und die Nahrungsaufnahme erst 30 Wochen postnatal korrelieren. [30] Im Gegensatz zu den beschriebenen Studien, haben andere Forschungsgruppen das Gegenteil herausgefunden. Van de Lagemaat et al. konnten keine Assoziation zwischen der Nährstoffzufuhr und dem IGF-I Spiegel bei Frühgeborenen am errechneten Entbindungstermin feststellen. Sie vermuten, dass der IGF-I Spiegel unabhängig von der Nährstoffzufuhr ist, und auch genetisch bestimmt sein kann. [25] Sie schränken jedoch ein, dass der fehlende Zusammenhang zwischen IGF-I Spiegel und Nährstoffzufuhr in dieser Studie, auch durch die unzureichenden Kenntnisse über die exakte Zusammensetzung der Muttermilch bei gestillten Kindern bedingt sein könnte. [25]

1.10 Weitere hormonelle Faktoren die Einfluss auf das Wachstum haben

IGFBP-1, IGFBP-3, IGF-II und das Wachstumshormon (GH) spielen in der Steuerung des Wachstums ebenfalls eine Rolle, sie sind in Studien aber längst nicht so gut untersucht wie IGF-I. Steigende IGFBP-3 Spiegel werden als guter Marker für ein adäquates Ernährungsmanagement beschrieben, wodurch das Aufholwachstum in den ersten Lebenswochen gesteigert und das Risiko für Komplikationen im späteren Leben verringert wird. [40]

IGF-II ist ein Polypeptid, dass in der fetalen Phase für die frühe Zellentwicklung eine wichtige Rolle spielt, aber bis jetzt in Zusammenhang mit dem Wachstum von Frühgeborenen und den Veränderung durch verschiedene Ernährungsregime wenig untersucht ist.

GH scheint sowohl pränatal als auch nach der Geburt eine geringere wachstumsfördernde Wirkung zuhaben als die IGF's, insbesondere eine geringere Wirkung als IGF-I. In einer Studie mit Knock-out Mäusen konnte gezeigt werden, dass Säuglinge mit einem angeborenen GH-Mangel oder einem Defekt am GH-Rezeptor- Gen nur leichte Verzögerungen im Wachstum zeigten, während Defekte am IGF-I-Gen schwere embryonale und postnatale Wachstumsverzögerungen zur Folge hatten. [41]

1.11 Zusammenfassende Betrachtung der bisherigen Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen der Nährstoffzufuhr und dem Wachstum von Frühgeborenen

Trotz einer verbesserten Versorgung von sehr unreifen Frühgeborenen, leiden diese auch heute noch unter einem verzögerten postnatalen Wachstum verglichen mit der intrauterinen Wachstumsrate. Er wird vermutet, dass diese postnatale Wachstumsstörung der Frühgeborenen durch eine optimierte Ernährung verbessert werden kann. Mögliche Strategien sind unter anderem 1.) die Verabreichung von höheren Proteindosen 2.) die individualisierte Zufuhr auf Grundlage der tatsächlichen Konzentration der Nährstoffe in Frauenmilch

Hormonelle Wachstumsfaktoren spielen nicht nur für das Wachstum von Frühgeborenen, sondern auch bei der Entstehung von Krankheiten wie der ROP, eine Rolle. Es besteht wahrscheinlich ein Zusammenhang zwischen der Nährstoffzufuhr und Konzentrationen der Wachstumsfaktoren.

1.12 Fragestellung

A priori geplant und Grundlage der vorliegenden Dissertation:

Frage A: Führt eine an den neusten, noch nicht auf randomisierten Studien beruhenden Empfehlungen der ESPGHAN orientierte Eiweißzufuhr von ca. 4,5g/kg/d im Vergleich zu einer Standardernährung mit ca. 3,5-4,0 g/kg/d Eiweiß zu höheren IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-3 und Wachstumshormon-Konzentrationen im Blut der Frühgeborenen?

Frage B: Führt eine individualisierte, am tatsächlichen Eiweißgehalt der Frauenmilch ausgerichtete Supplementierung im Vergleich zur standardisierten Verwendung eines neuen, proteinreicheren Frauenmilchsupplements bei im Mittel ähnlicher Eiweißzufuhr zu höheren IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-3 und Wachstumshormon- Konzentrationen im Blut der Frühgeborenen?

2. Patienten und Methoden

2.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Interventionsstudie handelt es sich um eine prospektive, monozentrische, randomisiert kontrollierte und partiell verblindete Studie, bei der drei Parallelgruppen untersucht wurden.

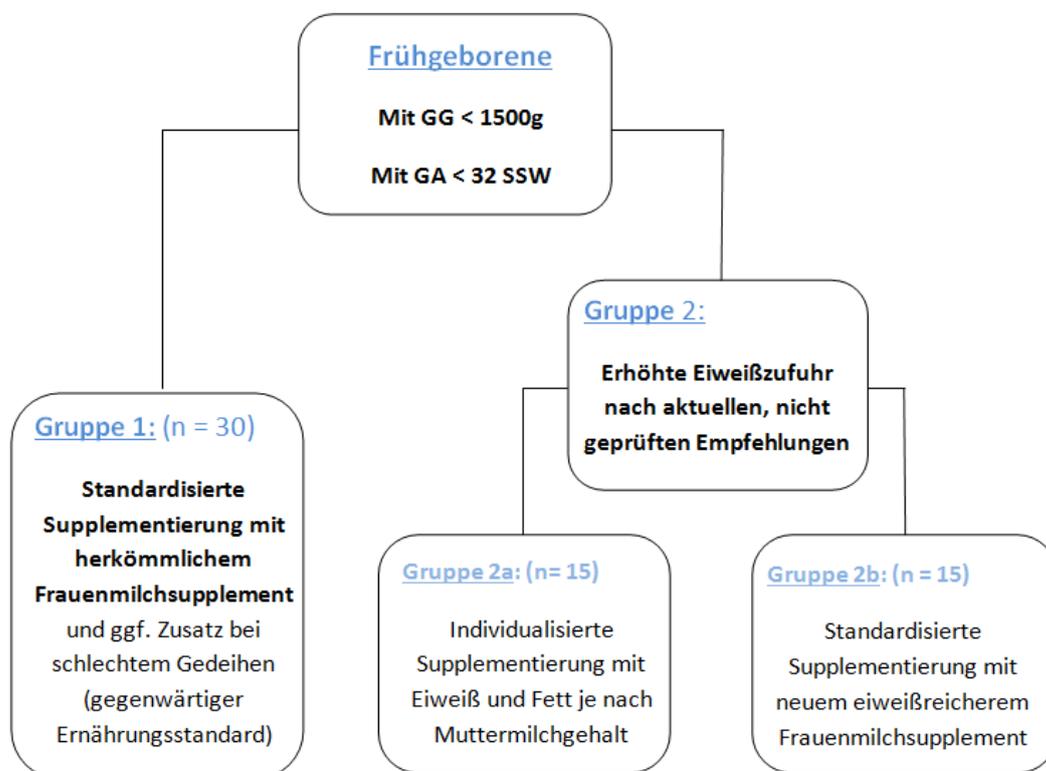


Abbildung 1: Studiendesign

2.2 Primäres übergeordnetes Ziel der Studie

Übergeordnetes Ziel der Studie „Protein for Premies“ war die Prüfung der folgenden a priori hierarchisch geordneten Fragestellungen:

Frage A): Führt eine an den neusten, noch nicht auf randomisierten Studien beruhenden Empfehlungen der ESPGHAN orientierte Eiweißzufuhr von ca. 4,5 g/kg/d im Vergleich zu einer Standardernährung mit ca. 3,5-4,0 g/kg/d Eiweiß zu einer Verbesserung des Wachstums der Frühgeborenen?

Frage B): Führt eine individualisierte, am tatsächlichen Eiweißgehalt der Frauenmilch ausgerichtete Supplementierung im Vergleich zur standardisierten Verwendung eines neuen, proteinreicheren Frauenmilchsupplements bei im Mittel ähnlicher Eiweißzufuhr zu einer Verbesserung des Wachstums der Frühgeborenen?

Das übergeordnete Ziel dieser Studie war es, das Wachstum der Frühgeborenen (Gewichtszunahme, Kopfumfang und Unterschenkelänge) in Abhängigkeit von der Eiweißzufuhr zu untersuchen. Über die Auswertung dieser Daten wurde eine separate Dissertation von Frau Michaela Mathes angefertigt. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Studiengruppen in Bezug auf das Wachstum der Frühgeborenen.

2.3 Votum der Ethik-Kommission

Die Studie wurde bei der Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen eingereicht und genehmigt. Mit dem klinischen Teil der Studie konnte begonnen werden, als das positive Ethikvotum (Projektnummer: 038/2012BO1) vorlag. (s. Anhang) Die aus dieser Studie gewonnen Daten bilden die Grundlage der vorliegenden Dissertation.

2.4 Probanden (Ein- und Ausschlusskriterien)

Im Zeitraum zwischen September 2012 und Dezember 2014 wurden 60 Probanden in die Studie eingeschlossen. Die Einschlusskriterien der Studie waren: ein Geburtsgewicht von weniger als 1500 g, ein Gestationsalter von kleiner 32 Schwangerschaftswochen, eine enterale Nahrungszufuhr von mehr als 100 ml/kg/d, sowie ein postnatales Alter von weniger als acht Tagen. Zu den Ausschlusskriterien zählten fehlendes Einverständnis der Eltern, primäres Abstillen der Mutter oder schwerwiegende Fehlbildungen des Kindes.

2.5 Ablauf der Studie

Die Eltern der potentiellen Probanden, die laut Einschlusskriterien für die Studie in Frage kamen, wurden vor dem 8. Lebenstag ihres Kindes auf der neonatologischen Station der Universitätsklinik Tübingen über die Studie aufgeklärt. Bei der Zustimmung zur Teilnahme an der Studie wurden die Frühgeborenen in die Studie eingeschlossen. Für die Randomisierung wurde zunächst von einem unabhängigen Statistiker ein computergeneriertes System erstellt, mit dem die Probanden den Studiengruppen im Verhältnis 2:1:1 zugeteilt wurden. Mithilfe versiegelter Briefumschläge, die fortlaufend nummeriert waren, erfolgte die randomisiert kontrollierte Zuteilung in eine der drei Parallelgruppen. Dreißig Probanden wurden der Gruppe 1, und jeweils 15 der Gruppe 2a und 2b zugeteilt. Die Gruppenzuteilung war den behandelnden Ärzten und Pflegekräften nicht bekannt. Der Beginn der Studienintervention war der Tag der Randomisierung. Sie endete mit der Planung der Entlassung des Probanden ca. eine Woche vor dem entgeltigen Entlassungstermin. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Ernährung auf die im häuslichen Umfeld geplante Ernährung umgestellt, in den meisten Fällen entsprach das der standardisierten Supplementierung mit FM 85 der Firma Nestlé. Wenn notwendig wurde die Muttermilchernährung mit Beba Frühgeborennahrung Stufe 2 ergänzt.

Zweimal wöchentlich erfolgte eine Analyse der Muttermilch. Die Analysenergebnisse, sowie das Gedeihen, bildeten die Grundlage für die Verordnung der Supplementdosis. Während der Studienintervention wurde zu drei Zeitpunkten, im Rahmen klinisch notwendiger Blutentnahmen, bei den Probanden eine Blutprobe entnommen. Aus diesen Blutproben erfolgte unter anderem die Messung der dieser Dissertation zugrunde liegenden Parameter. Einmal wöchentlich wurde die Unterschenkellänge der Probanden mit Hilfe eines Mini-Knemometer (Hermanussen) bestimmt. Die anthropometrischen Daten, wie zum Beispiel der Kopfumfang und die Länge, wurden durch das Pflegepersonal einmal wöchentlich gemessen. Die tägliche Bestimmung des Gewichts erfolgte ebenfalls durch das Pflegepersonal. Alle zehn Tage wurde eine Gewichtsanalyse durchgeführt, um einem perzentienflüchtigen Gedeihen zeitnah entgegen zu wirken. Alle Maßnahmen, die an den Kindern durchgeführt wurden, fanden im Rahmen der Pflegerunde in Absprache mit dem Pflegepersonal statt, um den Probanden möglichst wenig zusätzlichen Stress zuzumuten.

2.6 Erhobene Daten

2.6.1 Einmalig erhobene Daten

Tabelle 1: Einmalig erhobene Daten

Bei Geburt erhobene Daten:	Bei Entlassung erhobene Daten:
Geburtsdatum	Kopfumfang
Geschlecht	Länge im Stadiometer
Gestationsalter	Hautfaldendicke am M. triceps brachii
Geburtsgewicht	Hautfaldendicke unterhalb der Scapula

Körperlänge bei Geburt	
Kopfumfang bei Geburt	
Geburtsmodus	
Lebenstag der spätesten Mekonium- ausscheidung	
Nahrungsaufbau vollständig: 140 ml/kg/d über 48 Stunden	

2.6.2 Täglich erhobene Daten

Tabelle 2: Täglich erhobene Daten

Bei allen Probanden:	Bei Probanden der Gruppe 2a:
Körpergewicht (kg)	Verabreichte Menge Aptamil Eiweiß Plus (g)
Verabreichte Muttermilchmenge in 24h (ml)	Verabreichte Menge MCT-Öl (ml)
Verabreichte Menge Formula (ml)	Verabreichte Menge Duocal (g)
Menge an Studiensupplement (g)	
Magenrest (ml)	
Verworfenener Magenrest (ml)	

2.6.3 Wöchentlich erhobene Daten

Tabelle 3: Wöchentlich erhobene Daten

Anthropometrische Daten:	Urinanalyse:
Länge	Calcium
Kopfumfang	Kreatinin
Unterschenkellänge mittels Knemometrie	Harnstoff
	Anorganisches Phosphat

2.6.4 Erfasste Diagnosen einschließlich maximaler Ausprägung/ Schweregrad

Tabelle 4: Erfasste Diagnosen

Bronchopulmonale Dysplasie	Retinopathie
Persistierender Ductus Arteriosus (mit erfolgter Therapie)	Nekrotisierende Enterokolitis
Fokal intestinale Perforation	Hirnblutung

Definition: Bronchopulmonale Dysplasie (BPD):

Die Bronchopulmonale Dysplasie ist eine chronisch inflammatorische Atemwegserkrankung mit typischen Röntgenzeichen und Abhängigkeit von Sauerstoff und/oder künstlicher Beatmung noch nach dem 28. Lebenstag. Es wird zwischen einer leichten (GA <32 SSW Spontanatmung mit 21% O₂ mit 36 SSW oder bei Entlassung oder GA >32 SSW Spontanatmung mit 21% O₂ mit

56 Tagen oder bei Entlassung), mittelschweren (GA < 32 SSW Spontanatmung mit >21% aber <30% O₂ mit 36 Wochen oder bei Entlassung oder GA >32 SSW Spontanatmung mit < 30% O₂ mit 56 Tagen oder bei Entlassung) und schweren BPD (GA <32 SSW Spontanatmung mit >30% O₂ und/oder IPPV/CPAP mit 36 Wochen oder bei Entlassung oder GA >32 SSW Spontanatmung mit >30% O₂ und oder IPPV/CPAP mit 56 Tagen oder bei Entlassung) unterschieden. [42]

2.6.5 Medikamente

Folgende Medikamente wurden mit Dauer der Einnahme dokumentiert: Coffein, Doxapram, Furosemid, Hydrochlorothiazid, Spironolacton, Dexamethason, Budesonid und Hydrocortison

Im Weiteren werden ausschließlich die Methoden und erhobenen Daten ausführlich beschrieben, die für das Thema der vorliegenden Dissertation von Bedeutung sind.

2.7 Blutentnahmen

Im Rahmen der klinisch indizierten Blutentnahmen während des stationären Aufenthaltes wurde zu drei Zeitpunkten eine EDTA-Blutprobe von 350 µl abgenommen. Das Blut wurde durch eine venöse Punktion gewonnen. Die Blutentnahmen waren an den Lebenstagen 21 (+/-2), 35 (+/-4) und 49 (+/-7) geplant, die Entnahmezeitpunkte mussten aber an die klinisch indizierten Blutentnahmen angepasst werden. Die Blutproben wurden ausschließlich

präprandial abgenommen. Das EDTA-Blut wurde unmittelbar weiter versorgt, oder für nicht länger als eine Stunde im Kühlschrank gelagert und dann zentrifugiert. Die gewonnene Probe wurde in den EDTA-Blutröhrchen in einer Zentrifuge von Heraeus (Biofuge fresco) für zehn Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand an Blutplasma mit einer manuellen Mikroliterpipette in drei Aliquots zu 100 µl (Metabolom-Analyse), 50 µl (Wachstumsfaktorenanalyse) und 30 µl (Bestimmung von Plasmaphospholipiden, Cholin und seinen Metaboliten) in Eppendorfcups (Mikroreaktionsgefäß) pipettiert. Die drei gewonnenen Aliquots wurden unmittelbar bei -30 Grad Celsius tiefgefroren. Zuvor erfolgte die Beschriftung der Eppendorf Gefäße mit dem Datum und der Uhrzeit der Probeentnahme und der Studiennummer des Probanden auf einheitlichen Klebeetiketten.

Nach Abschluss der Studie und Entnahme aller Blutproben wurden die Proben gesammelt auf Eis an die jeweiligen Labore für die Analysen verschickt. Die Proben wurden für den Transport auf Trockeneis gelagert. Aufgrund von Entlassung vor dem 42. Lebensjahr oder Schwierigkeiten bei der Blutgewinnung waren nicht bei allen Probanden drei Blutentnahmen möglich.

Nach Abschluss der Studie wurden die Proben mit 50 µl Blutplasma an das Hormonlabor der Kinderklinik Tübingen versandt. Hier erfolgte die Bestimmung der Wachstumsfaktoren IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, IGFBP-1 und GH. Die Beschreibung der analytischen Methode erfolgt im Detail in Kapitel 2.12- 2.16.

2.8 Frauenmilchanalysen

Um bestimmen zu können, wie viel Protein und Fett ein Proband tatsächlich erhalten hat, wurden zweimal wöchentlich (Dienstag und Freitag) Analysen der Muttermilch durchgeführt. Die Muttermilchproben für die Analyse wurden aus einer abgepumpten im Kühlschrank gelagerten Mahlzeit entnommen. Bevor die Probe von 5 ml aus der Nahrungsportion entnommen wurde, erfolgte die

manuelle Homogenisierung der Muttermilch, sodass sich abgesetzte Bestandteile wieder in Emulsion übergangen. Eine Probe wurde in einer Spritze aufgezogen und in einem Flaschenwärmer auf 37 Grad erwärmt. Die Inhaltstoffe der erwärmten Probe wurden mit dem Human Milk Analyser (HMA) der Firma Miris bestimmt. Vor der Messung wurde das Gerät zunächst mit einer speziellen Lösung der Firma Miris gereinigt und anschließend mit Hilfe einer Eichlösung kalibriert. Bevor die Muttermilch in den HMA gefüllt wurde, wurde sie in der Spritze erneut manuell homogenisiert. Der HMA bestimmt den Fettgehalt (g/100ml), den Proteingehalt (g/100ml), den Lactosegehalt (g/100ml) und den Energiegehalt (kcal/100ml) in der Muttermilch. Die Messung erfolgte bei 40 Grad Celsius mittels Infrarotspektroskopie. Für eine Messung wurden 1-1,5 ml Muttermilch benötigt. Aus der 5ml-Probe wurden drei Einzelmessungen durchgeführt, anschließend wurde der arithmetische Mittelwert der Ergebnisse berechnet. Der Mittelwert der drei Messungen bildete die Grundlage für die Verordnung der zusätzlichen Makronährstoffe bei der Gruppe 2a. Die Ergebnisse der Muttermilchanalysen wurden in der Datenmappe des Probanden und im Laborbuch dokumentiert.

2.9 Intervention

2.9.1 Gruppe 1: gegenwärtige standardisierte Frauenmilch-supplementierung

Die Probanden der Standardeiweißgruppe erhielten als Supplement FM 85 der Firma Nestle. Die Dosierung lag bei 5 g/100ml Frauenmilch. Bei einer Nahrungszufuhr von 150 ml/kg erhielt das Frühgeborene durch den Frauenmilch-Fortifier also 1,5 g/kg/d Eiweiß. Unter dieser Zufuhr erhielt der Proband eine Gesamteiweißzufuhr von 4,5 beziehungsweise 3,0 g/kg/d, wenn der Eiweißgehalt der Frauenmilch bei 2,0 beziehungsweise 1,0 g/100ml lag.

2.9.2 Gruppe 2A: individualisierte Frauenmilchsupplementierung

In der individuell supplementierten Gruppe erhielten die Probanden als Basissupplement ebenfalls FM 85 der Firma Nestle in der Dosierung 5 g/100ml Frauenmilch. In Abhängigkeit von den Ergebnissen der Muttermilchanalyse erhielten sie zusätzlich bei Bedarf Aptamil Eiweiß Plus der Firma Milupa und MCT-Öl, um Zielwerte entsprechend der Empfehlung des Committee on Nutrition der European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition aus dem Jahr 2010 zu erreichen. (siehe 1.7)

Tabelle 5: Schema der individualisierten Supplementierung

Proteinzufuhr in g/kg/d	
Bei < 1,5 kg Körpergewicht	Bei > 1,5 kg Körpergewicht
(4,0)- 4,5	(3,5)- 4,0
Fettzufuhr in g/kg/d	4,8-6,6

In die Berechnung der zusätzlich zu verabreichenden Makronährstoffe ging der Anteil an Flüssigkeit pro Tag (ml) ein, sowie der Anteil an Muttermilch (%) an der Gesamtnahrungsmenge, sowie ggf. über Formula-Nahrung verabreichte Nährstoffe und die Ergebnisse der Muttermilchanalyse für den Proteingehalt und den Fettgehalt der Frauenmilch. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe einer Excel-Tabelle. Die daraus resultierende Verordnung war jeweils bis zur nächsten Muttermilchanalyse gültig.

2.9.3 Gruppe 2B: standardisierte Frauenmilchsupplementierung mit einem neuen Frauenmilchsupplement mit erhöhtem Eiweißgehalt und Fett

Die Probanden der Gruppe 2b erhielten ein neues Supplement der Firma Nestlé, das einen im Vergleich zu FM 85, höheren Proteinanteil und zusätzlich Fette enthielt. Auch dieses Frauenmilchsupplement wurde mit 5g/100ml Frauenmilch dosiert. Bei dieser Dosierung erhielten die Probanden durch den Frauenmilch-Fortifier 2,7 g/kg/d Eiweiß und 0,9 g/kg/d Fett bei einer Frauenmilchzufuhr von 150ml/kg/d. Lag der Eiweißgehalt der Frauenmilch bei 2,0 beziehungsweise bei 1,0 g/100ml, erhielt der Proband also eine Gesamteiweißmenge von 5,7 beziehungsweise 4,2 g/kg/d. Ausgehend von einem mittleren Fettgehalt der Muttermilch von 4g/100ml, erhielt der Proband mit dem „FMneu“ also eine Gesamtfettzufuhr von ca. 6,9 g/kg/d bei 150 ml/kg/d Muttermilchzufuhr.

2.9.4 Verordnung der Gesamtnahrungsmenge (ml/kg/d) und Vorgehen bei unzureichender Verfügbarkeit von Muttermilch

In allen Gruppen wurden die Nahrungsmenge und die Steigerung der Nahrungsmenge von den behandelnden Ärzten auf den Stationen bestimmt. Der Frauenmilch-Fortifier wurde für alle Gruppen in einheitlichen Dosen bereitgestellt, so dass die Verblindung gewährleistet war.

War nicht ausreichend Muttermilch vorhanden, wurden die Probanden zusätzlich mit Beba Frühgeborennahrung Stufe 2 ernährt.

2.9.5 Maßnahmen bei unzureichendem Gedeihen

Um ein unzureichendes Gedeihen zu erkennen, wurde alle 10 Tage die Gewichtszunahme in g/kg/d über 10 Tage berechnet. Bei einer Gewichtszunahme von weniger als 10 g/kg/d nach dem zehnten Lebenstag über einen Zeitraum von mehr als zehn Tagen und einer Harnstoff-Konzentration von weniger als 20mg/dl im Serum sowie einem Eiweißgehalt unter 1,5 g/100ml in der Muttermilch wurde der Frauenmilch-Fortifier auf 7,5 g/100 ml Muttermilch erhöht. Diese Erhöhung ist für die Standard-eiweißgruppe und für die individuell supplementierte Gruppe wirksam, bei denen FM 85 eingesetzt wurde. In der Gruppe die das neu Supplement erhielt, wurde der Fortifier auf 6 g/100ml erhöht.

2.10 Inhaltsstoffe der Frauenmilchsupplemente pro 5 g Pulver

Tabelle 6: Vergleich der beiden Frauenmilchsupplemente

Komponenten	Kommerzielles Frauenmilchsupplement (FM 85, Nestlé)	Studien Frauenmilchsupplement (10.01.DE.INF, Nestlé)
Brennwert	74 kJ /18 kcal	90 kJ/ 22 kcal
Eiweiß	1,0 g	1,8 g
Kohlenhydrate	3,3 g	1,8 g
Davon Laktose	0 g	0 g
Davon Maltodextrin	3,2 g	1,8 g
Andere KH	0,1 g	0g

Fett	0,02 g	0,87 g
Davon DHA		0,0075 g
Davon AA		0,0006 g
Natrium	20 mg	33 mg
Kalium	42 mg	83 mg
Chlorid	17 mg	29 mg
Calcium	75 mg	94 mg
Phosphor	45 mg	56 mg
Magnesium	2 mg	5 mg
Eisen	1,3 mg	0,94 mg
Kupfer	0,04 mg	0 mg
Zink	0,8 mg	0 mg
Jod	15 µg	19 µg
Selen	1,5 µg	4,25 µg
Vitamin A	0,15 mg	0,5 mg
Vitamin D	2,5 µg	5 µg
Vitamin E	2,0 mg	5 mg
Vitamin K	4,0 µg	10 µg

Vitamin C	10 mg	25 mg
Vitamin B1	0,05 mg	0,19 mg
Vitamin B2	0,10 mg	0,25 mg
Vitamin B6	0,05 mg	0,16 mg
Folsäure	40 µg	50 µg
Pantothensäure	0,4 mg	0,88 mg
Vitamin B12	0,1µg	0,25µg
Biotin	3 µg	4 µg

Quelle: Studiensupplement: Dr. Mike Possner, Firma Nestlé Nutrition, Frankfurt am Main

Quelle: FM 85: Angaben des Herstellers auf der Verpackung

2.11 Dokumentation

Für jeden Probanden wurde bei der Aufnahme in die Studie eine Datenmappe angelegt. Sie diente als Hilfsmittel für die Dokumentation der Daten, bevor diese in regelmäßigen Abständen in eine Excel-Tabelle übertragen wurden. Alle Messergebnisse wurden zusätzlich im Laborbuch dokumentiert.

2.12 Bestimmung von Insulin-like-growth-factor-I (IGF-I) im Plasma

2.12.1 Quantitativer Nachweis von IGF-I mit Hilfe eines spezifischen kompetitiven Radioimmunoassays

Für die Bestimmung von IGF-I wurde ein quantitativer Nachweis mit Hilfe eines spezifischen Radioimmunoassays aus dem hauseigenen Hormonlabor der Universitätskinderklinik Tübingen verwendet. Bei dieser Methode handelt es sich um einen kompetitiven Radioimmunoassay (RIA), mit welchem IGF-I in verdünntem Plasma bestimmt werden kann. Für die Bestimmung von IGF-I musste zunächst der Analyt von IGF-Bindungsproteinen freigesetzt werden, dies wurde dadurch erreicht, dass die Analysenproben mit einem sauren Puffer verdünnt wurden. Die Neutralisierung der Probe wurde durch die Zugabe von radioaktiv markiertem IGF-I (IGF-I Tracer) und einem spezifischen polyklonalen Antikörper erreicht. Die Antikörperlösung enthielt außerdem einen IGF-I Überschuss um noch vorhandene Bindungsproteine mit Liganden abzusättigen und ein erneutes binden des Analyten zu verhindern. Bei diesem Verfahren verdrängt der Analyt in der Probe den IGF-I- Tracer. Im darauf folgenden Schritt wurde der IGF-I Tracer mit dem IGF-I spezifischen Antikörper und einen Zweitantikörper gefällt. Letztendlich wurde die gefällte Radioaktivität im Präzipitat bestimmt und diente als Maß für die eingesetzte Menge an Analyten.

2.12.2 Einheiten und Messbereich

Analytische Sensitivität: Verdünnung 1:51 Serum

Minimal: 8 ng/ml

Maximal: 500 ng/ml

Die Plasmaproben wurden vor dem Test zunächst aufgetaut und mit Hilfe eines Dilutors 1:51 mit Puffer-A verdünnt. Das entsprach 5µl Plasma + 250 µl Puffer-A.

2.12.3 Testspezifische Materialien

Zur Durchführung des IGF-I RIAs wurden folgende Lösungen benötigt

- Puffer A
- Puffer B
- IGF-I-Antikörper-Lösung
- IGF-I Standard 7
- IGF-I Tracer
- Interner Serumpool (Kblau)
- Interner Serumpool (Krot)
- Interner Serumpool (Kgrün)
- Zweit-Antikörperlösung
- PEG-Lösung
- Deionisiertes Wasser

2.12.4 Testdurchführung

Der RIA wurde in konischen Polystyrolröhrchen (Greiner 1 x 7,5 cm) als Doppelbestimmung durchgeführt. Nach der Markierung der Röhrchen wurden die Reagenzien nach dem Schema des Labors entsprechend zusammenpipettiert (Hamilton Pipettierautomat Microlab 2200 und Microlab 500). Die verdünnte Probe, die Standards oder die Kontrolle wurden mit der IGF-I-Antikörperlösung versetzt. Im Anschluss wurde der Tracer zugefügt und

die Probe auf einem Vortexmixer gemischt. Darauf folgend wurde die Probe für zwei Tage bei 4°C inkubiert. Die Probe wurde mit Präzipitationsreagenz versetzt, gemischt und anschließend für eine weitere Stunde bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Immunkomplexe durch Zentrifugation ((Zentrifuge Rotixa)15min, 4°C, 3400 x g) präzipitiert. Der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Es folgte eine erneute Zentrifugation (5min, 4°C bei 3400 x g) nach dem das Sediment zuvor mit 1ml kaltem deionisiertem Wasser gewaschen wurde. Über dem pelletierten Sediment wurde der Überstand abgesaugt und die Radioaktivität der Präzipitate mit Hilfe eines Gammazählers (Gammacounters LB 2111 im Programm 1) für die Dauer von einer Minute gezählt.

2.12.5 Auswertung

Die gewonnen Daten wurden mit dem Programm 1 des Gammecounters ausgewertet. Es wurde an Hand der Standardreihe ein logarithmischer-linearer Fit durchgeführt und mit dem bekannten Verdünnungsfaktor aus dieser Standardkurve die Probenkonzentration berechnet. Dafür wurde bei der Inbetriebnahme des Gerätes immer die Einstellung der Parameter Verdünnungsfaktor und Konzentration der Standards kontrolliert.

2.13 Bestimmung von Insulin-like growth factor II (IGF-II) im Plasma

2.13.1 Quantitativer Nachweis von IGF-II mit Hilfe eines spezifischen kompetitiven Radioimmunoassays

Für die Bestimmung von IGF-II wurde ein quantitativer Nachweis mit Hilfe eines spezifischen Radioimmunoassays aus dem hauseigenen Hormonlabor der Universitätskinderklinik Tübingen verwendet. Bei dieser Methode handelt es sich um einen kompetitiven Radioimmunoassay (RIA), mit welchem IGF-II in verdünntem Plasma bestimmt werden kann. Als Vorbereitung für diesen Test mussten zunächst störende IGF-Bildungsproteine abgetrennt werden, dazu wurde die Probe extrahiert. Anschließend wurde die Probe nach einer weiteren Verdünnung mit radioaktivem IGF-II (IGF-II Tracer) und einem spezifischen polyklonalen Antikörper inkubiert. Die Antikörperlösung enthielt außerdem einen IGF-II Überschuss um noch vorhandene Bindungsproteine mit Liganden abzusättigen. Bei diesem Verfahren verdrängt der Analyt in der Probe den IGF-II- Tracer. Im darauf folgenden Schritt wurde der IGF-II Tracer mit dem IGF-II spezifischen Antikörper und eines Zweitantikörpers gefällt. Letztendlich wurde die gefällte Radioaktivität im Präzipitat bestimmt und diente als Maß für die eingesetzte Menge an Analyten.

2.13.2 Einheiten und Messbereiche

Analytische Sensitivität: 1: 119 extrahierte und verdünnte Serumprobe

Minimal: 37 ng/ml

Maximal: 4760 ng/ml

2.13.3 Probenextraktion

Vor dem Test wurden 10µl der Serumprobe in Polyesterl rhrchen (Greiner; 1cm x 7,5cm) mit 40µl Extraktionspuffer versetzt. Die Probe wurde geschüttelt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 15 min bei 3800 rpm zentrifugiert (Rotixa 50 RS; Programm 1). Im Anschluss wurden 25µl des Überstandes in ein neues Polystyrolröhrchen überführt und mit 10µl Tris-Puffer zur Neutralisierung versetzt und gemischt. 25 µl der so entstandenen Probenlösung wurden nun in ein neues Polystyrolröhrchen überführt und mit 400 µl RIA-Puffer versetzt. Die so entstandene 1:119 Verdünnung wurde über Nacht bei -20°C eingefroren. Das gleiche Verfahren durchliefen alle Kontrollen vor dem Test. Von dem Extrakt wurden 100µl eingesetzt.

2.13.4 Testspezifische Materialien

Zur Durchführung des IGF-II Radioimmunoassays wurden folgende Lösungen benötigt:

- RIA-Puffer
- Extraktionspuffer
- Tris-Puffer
- IGF-II-Tracer
- IGF-II-Antikörperlösung
- IGF-II Standard8
- Interner Serumpool Kblau und Kgr n
- Zweit-Antikörperlösung
- PEG-Lösung 4%
- Deionisiertes Wasser

2.13.5 Testdurchführung

Der RIA wurde in konischen Polystyrolröhrchen (Greiner 1 x 7,5 cm) als Doppelbestimmung durchgeführt. Nach der Markierung der Röhrchen wurden die Reagenzien nach dem Schema des Labors entsprechend zusammenpipettiert (Hamilton Pipettierautomat Microlab 2200 und Microlab 500). Der Extrakt der Probe, die Standards oder die Kontrolle wurden mit der IGF-II-Antikörperlösung versetzt. Im Anschluss wurde der Tracer zugefügt und die Probe auf einem Vortexmixer gemischt. Darauf folgend wurde die Probe für zwei Tage bei 4°C inkubiert. Die Probe wurde mit Präzipitationsreagenz versetzt, gemischt und anschließend für eine weitere Stunde bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Immunkomplexe durch Zentrifugation ((Zentrifuge Rotixa) 15min, 4°C, 3400 x g) präzipitiert. Der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Es folgte eine erneute Zentrifugation (5min, 4°C bei 3400 x g) nach dem das Sediment zuvor mit 1ml kaltem deionisiertem Wasser gewaschen wurde. Über dem pelletierten Sediment wurde der Überstand abgesaugt und die Radioaktivität der Präzipitate mit Hilfe eines Gammazählers (Gammacounters LB 2111 im Programm 2) für die Dauer von einer Minute gezählt.

2.13.6 Auswertung

Die gewonnenen Daten wurden mit dem Programm 2 des Gammacounters ausgewertet. Es wurde an Hand der Standardreihe ein logarithmischer-linearer Fit durchgeführt und mit dem bekannten Verdünnungsfaktor aus dieser Standardkurve nach Mittelung der Doppelwerte die Probenkonzentration berechnet. Dafür wurde bei der Inbetriebnahme des Gerätes immer die Einstellung der Parameter Verdünnungsfaktor und Konzentration der Standards kontrolliert.

2.14 Bestimmung von Insulin-like growth Factor Bindungsprotein-3 (IGFBP-3) im Plasma

2.14.1 Quantitativer Nachweis mit Hilfe eines spezifischen kompetitiven Radioimmunoassays (RIA)

Für die Bestimmung von Insulin-like growth factor Bindungsprotein-3 (IGFBP-3) wurde ein quantitativer Nachweis mit Hilfe eines spezifischen Radioimmunoassays aus dem hauseigenen Hormonlabor der Universitätskinderklinik Tübingen verwendet. Bei dieser Methode handelt es sich um einen kompetitiven Radioimmunoassay (RIA), mit welchem IGFBP-3 in verdünntem Plasma bestimmt werden kann. Dafür wurde radioaktiv markiertes IGFBP-3 (IGFBP-3 Tracer der Firma Mediagnost) zusammen mit dem Plasma und einem IGFBP-3 spezifischen polyklonalen Antikörper inkubiert. Der Analyt in der Probe verdrängt kompetitiv den IGFBP-3 Tracer. Im folgenden Schritt wurde der IGFBP-3 spezifische Antikörper unter zu Hilfenahme eines zweiten Antikörpers gefällt. Die gefällte Radioaktivität im Präzipitat wurde gemessen und dient als Maß für die eingesetzte Menge an Analyten.

2.14.2 Einheiten und Messbereiche

Analytische Sensitivität: Serum 1:151 verdünnt

Minimal: 131 ng/ml

Maximal: 8380 ng/ml

Die Plasmaproben wurden vor dem Test zunächst aufgetaut und mit Hilfe eines Dilutors 1:151 mit RIA-Puffer verdünnt. Das entsprach 5 µl Plasma + 750 µl RIA Puffer.

2.14.3 Testspezifische Materialien

Für die Durchführung des IGFBP-3 RIAs wurden folgende Lösungen verwendet:

- RIA-Puffer
- IGFBP-3 –Tracer
- IGFBP-3- Antikörperlösung
- IGFBP-3 Standard7
- Interner Serumpool Kblau
- Interner Serumpool Krot
- Interner Serumpool Kgrün
- Zweit-Antikörperlösung
- PEG-Lösung 4%
- Deionisiertes Wasser

2.14.4 Testdurchführung

Der RIA wurde in konischen Polystyrolröhrchen (Greiner 1 x 7,5 cm) als Doppelbestimmung durchgeführt. Nach der Markierung der Röhrchen wurden die Reagenzien nach dem Schema des Labors zusammenpipettiert (Hamilton Pipettierautomat Microlab 2200 und Microlab 500). Die verdünnte Probe, die Standards oder die Kontrolle wurden mit der IGFBP-3-Antikörperlösung versetzt. Anschließend wurde der Tracer hinzugegeben und die Röhrchen wurden mit Hilfe eines Vortexmixers gemischt. Die Proben wurden dann in einem Kühlraum bei 4°C für zwei Tage inkubiert. Im Anschluss wurde das Präzipitationsreagenz hinzupipettiert, wiederum gemischt und für eine Stunde

bei 4°C inkubiert. Darauf folgend wurden die Immunkomplexe durch Zentrifugation ((Zentrifuge Rotixa)15min, 4°C, 3400 x g) präzipitiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Es folgte eine erneute Zentrifugation (5min, 4°C bei 3400 x g) nach dem das Sediment zuvor mit 1ml kaltem deionisiertem Wasser gewaschen wurde. Über dem pelletierten Sediment wurde der Überstand abgesaugt und die Radioaktivität der Präzipitate mit Hilfe eines Gammazählers (Gammacounters LB 2111 im Programm 3) für die Dauer von einer Minute gezählt.

2.14.5 Auswertung

Die gewonnen Daten wurden mit dem Programm 3 des Gammecounters ausgewertet. Es wurde an Hand der Standardreihe ein logarithmischer-linearer Fit durchgeführt und mit dem bekannten Verdünnungsfaktor aus dieser Standardkurve die Probenkonzentration berechnet. Dafür wurde bei der Inbetriebnahme des Gerätes immer die Einstellung der Parameter Verdünnungsfaktor und Konzentration der Standards kontrolliert.

2.15 Bestimmung von Insulin-like Growth Factor Bindungsprotein 1 (IGFBP-1) im Plasma

2.15.1 Quantitativer Nachweis von IGFBP-1 mit Hilfe eines kommerziellen Enzymimmunoassays

Für die Messung von IGFBP-1 wurde ein quantitativer Enzymimmunoassay der Firma Mediagnost mit der Referenznummer E01 verwendet. Der kommerziell erhältliche Test wird auch als sogenannter Sandwich-Assay bezeichnet. Nach

Zugabe der Probe oder des Standards bindet das IGFBP-1 an den Antikörper, darauf folgte ein Waschschrift. Danach wurde ein enzymgekoppelter anti-IGFBP-1 Antikörper hinzugegeben. Es bildete sich ein Sandwich. Dann erfolgte erneut ein Waschschrift, an den sich die Farbreaktion anschloss. Die entstandene Farbintensität ist proportional zur Menge an IGFBP-1 in der Probe. Die Farbintensität wird photometrisch bestimmt, mit Hilfe eines Microplatten-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 650 nm)

Die Plasmaproben wurden 1:16 verdünnt. 10 µl Plasma wurden mit 150 µl Probenpuffer verdünnt.

2.15.2 Testdurchführung

Der Test wurde nach den Angaben des Herstellers gemäß dem Kitprotokoll durchgeführt. Die Messung wurde hierbei als Doppelbestimmung durchgeführt. Es wurden 50 µl Antikörperkonjugat in die verwendeten Kavitäten pipettiert. Danach erfolgte die Zugabe von 50 µl Standard bzw. verdünnter Probenlösung und den entsprechenden Kontrollen. Anschließend wurde die Platte eine Stunde ohne schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Lösungen abgesaugt und die Platte mit 300 µl verdünntem Waschpuffer pro Kavität 5mal gewaschen und danach wurde in jede Kavität 100 µl Enzymlösung pipettiert. Es folgte eine erneute Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur, darauf folgte ein weiterer Waschgang wie oben beschrieben. Im Anschluss wurden 100 µl Substratlösung dazu gegeben und die Platte für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch die Zugabe von einer Stopplösung beendet. Innerhalb von 30 Minuten nach dem Abstoppen der Reaktion erfolgte die Auswertung der Farbreaktion mit Hilfe des Mikroplate Reader bei 450 nm.

2.15.3 Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Revelation, Program IGFBP1 beim Dynex MRX-II Reader. Ersatzweise war auch eine Auswertung mit DPC Milenia mit der Software Softmax Pro3.0 und dem gleichen Programm möglich. Es wurde hierbei anhand der Extinktion der Standardreihe ein logarithmischer-linearer 4-Parameter-Fit durchgeführt und anschließend aus den Extinktionswerten der Proben die Konzentration, unter Berücksichtigung der Verdünnung, bestimmt.

2.16 Bestimmung von humanem Wachstumshormon (hGH) im Plasma

2.16.1 Quantitativer Nachweis des Wachstumshormon (GH) mit Hilfe eines kommerziellen Enzymimmunoassays

Für die Messung der humanen Wachstumsfaktoren wurde ein quantitativer Enzymimmunoassay der Firma Mediagnost mit der Referenznummer E022 verwendet. Der kommerziell erhältliche Test wurde auch als sogenannter Sandwich-Assay bezeichnet. Die im Kit mitgelieferten Mikrotiterplatten waren mit einem spezifischen, hochaffinen, polyklonalen Kaninchen-anti-hGH-Antikörper beschichtet. Die Probe oder der Standard wurde auf die Platte pipettiert, dadurch bindet das Wachstumshormon an den gecoateten Antikörper. Darauf folgte ein Waschschrift, anschließend wurde ein zweiter biotinylierter anti- GH- Antikörper hinzupipittiert, es bildete sich ein Sandwich. Der Farbumschlag wurde letztendlich durch die abschließende Substratreaktion verursacht, bei der Streptavidin-Peroxidase-Enzymkonjugat am Biotin des anti-GH-Antiserums gebunden hat und die Reaktion katalysierte. Der Farbumschlag ist quantitativ abhängig vom GH-Gehalt der Probe. Die Farbintensität wurde

photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge > 590nm) mit einem Microplatten-Reader bestimmt.

2.16.2 Einheiten und Messbereich

Analytische Sensitivität: Verdünnung 1:51 Serum

Minimal: 0,08 ng/ml

Maximal: 51 ng/ml

Die Serumproben wurden vor dem Test 1:51 mit Verdünnungspuffer verdünnt. 5 µl Serum wurden mit 250 µl Verdünnungspuffer gemischt.

2.16.3 Testdurchführung

Der Test wurde nach den Angaben des Herstellers gemäß dem Kitprotokoll durchgeführt. Die Messung wurde hierbei als Doppelwert in nebeneinanderliegenden Spalten mit der geeigneten Menge, an vom Hersteller zur Verfügung gestellten, beschichteten 8-Well Streifen durchgeführt.

In das entsprechende Well der Mikrotiterplatte wurden 100 µl der Probenverdünnung, Standard und Kontrolle pipettiert. Im Anschluss wurde die Platte mit einer Klebefolie dicht abgedeckt und unter schütteln (≥ 350 upm) bei Raumtemperatur zwei Stunden inkubiert. Danach wurde die Reaktionslösung ausgeklopft und die Platte 5mal mit 300 µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 100 µl des Antikörperkonjugates dazu pipettiert und erneut für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter schütteln (≥ 350 upm) inkubiert. Dann wurden 100 µl des Enzymkonjugates hinzugefügt und ohne schütteln 30 min inkubiert. Nun wurde die Platte erneut 5mal mit Waschpuffer

gewaschen und danach 100 µl Substratlösung in jede Vertiefung pipettiert. Abschließend wurde die Platte für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Reaktion abgestoppt indem 100 µl Stopplösung hinzugefügt wurde. Die Farbreaktion wurde innerhalb von 30 min mit dem Photometer (Mikroplate Reader) mit dem Program hGHE022 gemessen.

2.16.4 Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Revelation, Program hGHE022 beim Dynex MRX-II Reader. Ersatzweise war auch eine Auswertung mit DPC Milenia mit der Software Softmax Pro3.0 und dem gleichen Programm möglich. Die Berechnung der Standardkurve erfolgte an Hand der Extinktion der Standardreihe mit einer 4-Parameter-Anpassung und danach wurde aus den Extinktionsdaten der Proben die Probenkonzentration bestimmt.

2.17 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm JMP 11.2.0 (SAS Institute Inc., USA). Zunächst wurden die Daten mittels Betrachtung von Säulen durch Darstellung der Häufigkeiten auf ihre Normalverteilung geprüft. Bei nicht offensichtlich normal verteilten Daten wurde zusätzlich ein Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Alle normal verteilten Daten wurden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben, alle nicht normal verteilten Daten als Median und Interquartilbereich. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden folgende Daten trotz Normalverteilung mit Median und Interquartilbereich angegeben: IGF-I zum Blutentnahmezeitpunkt 1 und 2, IGFBP-3 zu allen drei Blutentnahmezeitpunkten, IGF-II zum Blutentnahmezeitpunkt 1 und 2, sowie GH zum Zeitpunkt der 3. Blutentnahme.

Zum Vergleich der Gruppen wurde bei normal verteilten Daten der zweiseitige nicht verbundene t-Test durchgeführt, bei nicht normal verteilten Daten der Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Test. Mit Ausnahme der bereits oben beschriebenen Parameter, hier wurde trotz Normalverteilung der Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Test durchgeführt.

In den dargestellten Box-Whisker Plots zeigen die Boxen, den Median (Querlinie) sowie 25%- & 75% Quantile an. Die Whiskers sind als Minimum und Maximum definiert. Dies gilt für alle dargestellten Box-Whisker-Plots.

Die Korrelationsanalysen wurden bei den normalverteilten Daten nach Pearson durchgeführt. Bei den nicht normalverteilten Daten erfolgte die Korrelationsanalyse nach Spearman.

3. Ergebnisse

3.1 Charakteristika der Probanden

Die Studie Protein for Premies wurde in der Universitätskinderklinik Tübingen in der Abteilung für Neonatologie durchgeführt. Zwischen September 2012 und Dezember 2014 wurden wie a priori geplant, insgesamt 60 Frühgeborene mit einem Gestationsalter <32 SSW bei Geburt und einem Geburtsgewicht <1500 g in die Studie eingeschlossen. 60 Probanden konnten für die Studie gewonnen werden. Die Probanden wurden wie a priori geplant mittels versiegelter, nummerierter Umschläge den jeweiligen Gruppen im Verhältnis von 2:1:1 (30:15:15) zugeordnet. 25 Probanden waren männlich und 35 Probanden weiblichen Geschlechts. Das Geburtsgewicht der Probanden in der Standardweißgruppe (1) lag zwischen 580 g und 1495 g, in der Hocheiweißgruppe (2) zwischen 490 g und 1470 g. In der Standardweißgruppe hatten sechs Probanden ein Geburtsgewicht unter 1000 g in der Hocheiweißgruppe wogen acht Probanden bei der Geburt weniger als 1000 g. Das Geburtsgewicht in der Standardweißgruppe betrug im Median 1215 (1065- 1393)g in der Hocheiweißgruppe 1193 (984- 1326)g und unterschied sich damit nicht signifikant (Tabelle 7).

Das Gestationsalter lag in der Standardweißgruppe bei 30,0 (29,0-31,1) Schwangerschaftswochen (SSW), in der Hocheiweißgruppe bei 29,7 (27,9-31,0) SSW. Die Interventionsperiode dauerte in der Standardweißgruppe 43 (32-51) Tage, in der Hocheiweißgruppe 40 (30-58) Tage. Die Dauer des stationären Aufenthaltes lag bei der Standardweißgruppe bei 52 (42-65) Tagen. In der Hocheiweißgruppe lag die Dauer des stationären Aufenthalts bei 52 (37-70) Tagen. Der kumulative Muttermilchanteil am gesamt enteralen Nahrungsvolumen betrug in der Standardweißgruppe 92,9 (79,1 -97,9)%, in der Hocheiweißgruppe lag der kumulative Muttermilchanteil an dem gesamt

Nahrungsvolumen (von Geburt bis Interventionsende) bei 94,3 (61,8- 99,0)%.
Kein Proband verstarb während der Studienintervention.

Der Vergleich der Studiengruppen ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Tabelle 7: Charakteristika der Studienprobanden

	Standardgruppe (1)	Hocheiweißgruppe (2a +2b)	p-Wert
Anzahl der Probanden	30	30	
Geschlecht	w = 19 (63%)	w =14 (47%)	p = 0,29 ^(x)
Geburtsgewicht (g)	1215 (1115-1393)	1208 (984-1326)	p= 0,46 ^(y)
Gestationsalter bei Geburt (SSW)	30,0 (29,0-31,1)	29,7 (27,9-31,0)	p= 0,20 ^(y)
Alter bei Studienbeginn (d)	7 (6-7)	7 (6-8)	p= 0,75 ^(y)
Interventionsdauer (d)	52 (42-65)	52 (37-70)	p=0,59 ^(y)

Alle Parameter sind als Median und IQR angegeben.

^(x) Fishers exakter Test, zwei seitig

^(y) Wilcoxon Test

3.2 Morbidität der Probanden

Zur besseren Vergleichbarkeit der Studiengruppen wurden folgende Erkrankungen bei den Probanden erfasst. Eine intraventrikuläre Blutung trat bei drei Probanden in der Standardweißgruppe auf, in der Hocheiweißgruppe hatte kein Proband eine intraventrikuläre Blutung ($p = 0,24$). Eine Retinopathie kam nur bei einem Proband in der Hocheiweißgruppe vor ($p = 1,0$). Eine nekrotisierende Enterocolitis und eine fokale intestinale Perforation betraf kein Kind in der gesamten Studie. Ebenso hatte kein Proband eine periventrikuläre Leukomalazie. Eine Bronchopulmonale Dysplasie hatten zwei Probanden in der Standardweißgruppe und fünf Probanden in der Hocheiweißgruppe ($p = 0,70$). Bezüglich der Morbidität ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen feststellen.

3.3 Blutentnahmen

In der Standardweißgruppe konnte bei 14 Probanden an 3 Zeitpunkten Blut gewonnen werden, bei 11 Probanden wurde an zwei Zeitpunkten Blut entnommen, bei fünf Probanden konnte nur eine Blutprobe gewonnen werden. In der Hocheiweißgruppe wurde bei 16 Probanden zu drei Zeitpunkten Blutproben für die Studie abgenommen, bei 11 Probanden konnte zu zwei Zeitpunkten eine Blutprobe entnommen werden, bei drei Probanden war nur eine Blutentnahme möglich. Da bei einigen Probanden nicht ausreichend Blut gewonnen wurde, standen bei der 3. Blutentnahme in der Standardweißgruppe nur 12 Proben zur Verfügung, in der Hocheiweißgruppe waren es 13. In der Standardweißgruppe erfolgte die erste Blutentnahme am Lebenstag 15 (14- 16) ebenso in der Hocheiweißgruppe 15 (14- 17) ($p = 0,57$), die zweite Blutentnahme erfolgte am Lebenstag 35 (31- 39) in der Standardweißgruppe, am Lebenstag 35 (32- 41) in der Hocheiweißgruppe ($p =$

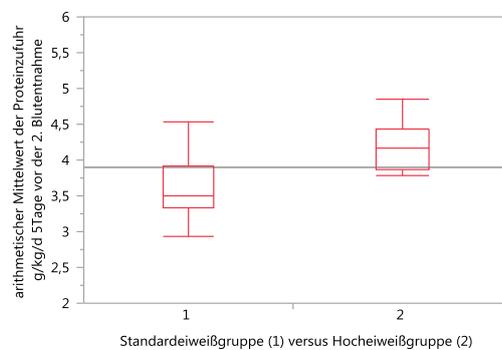
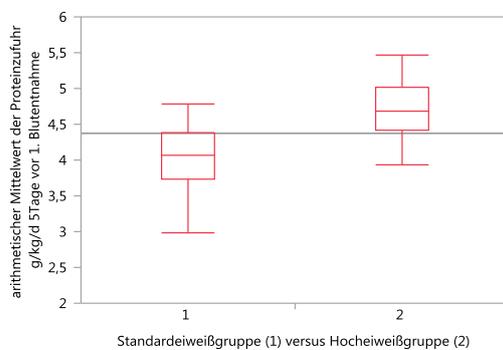
0,54). Die dritte Blutentnahme erfolgte am Lebenstag 54 (50,75- 58,5) bei der Standardweißgruppe beziehungsweise an Lebenstag 53 (46,5- 62) bei Hocheiweißgruppe ($p= 0,72$).

3.4 Proteinzufuhr jeweils fünf Tage vor den einzelnen Blutentnahmen

Die Standardweißgruppe erhielt in den fünf Tagen vor der ersten Blutentnahme 4,1 (3,5- 4,4) g/kg/d Protein (Gesamtproteinmenge aus Muttermilch + Supplement), bei der Hocheiweißgruppe waren es 4,7 (4,2- 5,0) g/kg/d. Der Vergleich beider Gruppen zeigt einen signifikanten Unterschied ($p= <0,001$)

In den fünf Tagen vor der zweiten Blutentnahme erhielt die Standardweißgruppe 3,5 (3,3- 3,9) g/kg/d Protein. In der Hocheiweißgruppe waren es 4,2 (3,8- 4,4) g/kg/d. Vergleicht man die Proteinzufuhr vor der 2. Blutentnahme, findet man einen signifikanten Unterschied ($p= <0,001$).

Alle Probanden der Standardweißgruppe erhielten in den fünf Tagen vor der dritten Blutentnahme 3,3 (3,1-3,8) g/kg/d Protein, bei den Probanden der Hocheiweißgruppe waren es 4,1 (3,2-4,6) g/kg/d Protein. Beim Vergleich der Proteinzufuhr zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,11$).



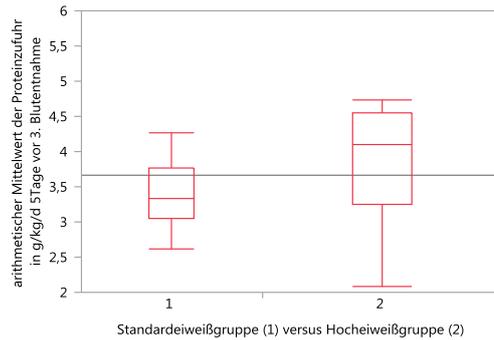


Abbildung 2: Proteinzufuhr art. Mittelwert 5 Tagen jeweils vor Blutentnahme 1, 2 und 3.

Vergleicht man die beiden Hocheiweißgruppen miteinander, ergibt sich für die Proteinzufuhr fünf Tage vor der ersten Blutentnahme für die individuell supplementierte Probandengruppe (2a) eine Zufuhr von 4,5 (4,3- 4,7) g/kg/d, die Gruppe, die FM neu erhielt (2b), hat 4,9 (4,7- 5,1) g/kg/d Protein erhalten. Es ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p=0,003$).

Die verabreichte Proteinmenge vor der zweiten Blutentnahme lag bei 3,9 (3,8- 4,2) g/kg/d bei der individuell supplementierten Gruppe und 4,4 (4,2- 4,6) g/kg/d bei der Gruppe die FM neu erhielt. Im Vergleich beider Gruppen ergab sich auch hier ein statistisch signifikanter Unterschied ($p =0,006$).

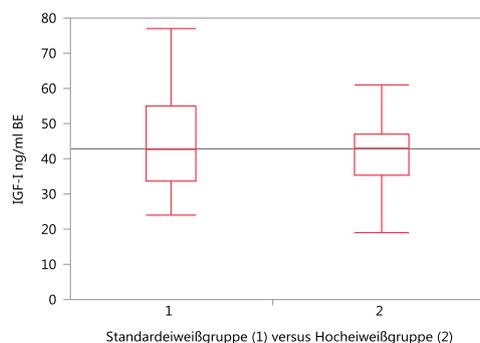
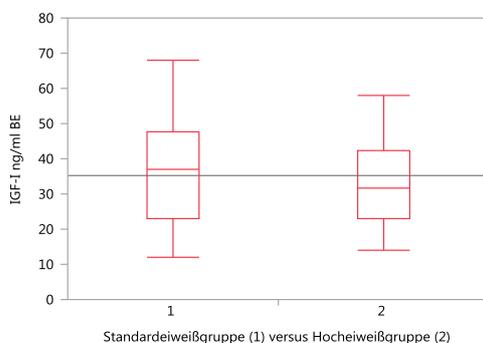
Fünf Tage vor der dritten Blutentnahme erhielt die individuell supplementierte Gruppe 3,8 (3,3- 4,4) g/kg/d und die Gruppe, die das FM neu erhielt, 4,2 (3,1- 4,6) g/kg/d Protein. Es ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied feststellen ($p= 0,67$).

3.5 Wachstumsfaktoren: Standardweißgruppe (1) verglichen mit der Hocheiweißgruppe (2)

3.5.1 IGF-I

Die Ergebnisse der Bestimmung der IGF-I Konzentration bei der ersten Blutentnahme lagen in der Standardweißgruppe bei 37,0 (23,0- 47,5) ng/ml, bei der Hocheiweißgruppe bei 31,5 (23,0- 42,0) ng/ml. Bei der Bestimmung aus der zweiten Blutprobe lag der Wert bei der Standardweißgruppe bei 42,5 (33,5- 55,0) ng/ml bei der Hocheiweißgruppe bei 43,0 (35,0- 47,0) ng/ml. Die Ergebnisse der dritten Blutproben ergaben einen Wert von 44,0 (43,0- 50,5) ng/ml für die Standardweißgruppe und 47,0 (41,5- 58,0) ng/ml für die Hocheiweißgruppe. Zu allen drei Zeitpunkten ergaben sich jeweils keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ($p = 0,42$; $p = 0,64$; $p = 0,78$).

Vergleicht man den Anstieg der IGF-I Konzentrationen zwischen den Interventionsgruppen zeigte sich ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,52$). Der Anstieg der IGF-I Konzentrationen zwischen der ersten und zweiten Blutentnahme lag bei der Standardweißgruppe im Median bei 6,5 (-0,3- +18,3) ng/ml, bei der Hocheiweißgruppe bei 12,5 (1,3- 16,8) ng/ml. Auch der Anstieg der IGF-I Werte zwischen der ersten und dritten Blutentnahme zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 1,00$). In der Standardweißgruppe stieg die IGF-I Konzentration im Mittel um 24,0 (12,0- 25,5) ng/ml und in der Hocheiweißgruppe um 21,0 (10,5- 29,5) ng/ml.



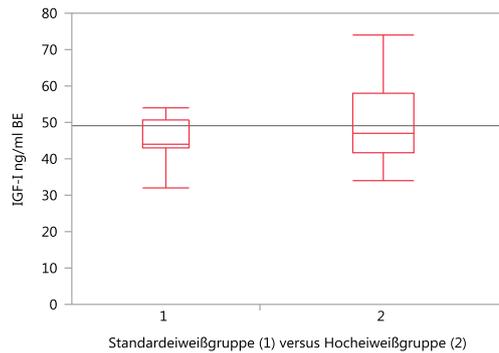


Abbildung 3: Vergleich IGF-I zwischen Standardprotein- versus Hocheiweißgruppe zum Zeitpunkt 1, 2 und 3.

3.5.2 IGF-II

Bei der Standardproteingruppe wurde bei der ersten Blutprobe eine IGF-II-Konzentration von 209,0 (187,3- 240,8) ng/ml gemessen. Bei der Hocheiweißgruppe lag das Ergebnis der ersten Blutprobe bei 221,0 (196,5 – 247,0) ng/ml. Die Analyse der zweiten Blutprobe brachte folgende Ergebnisse, für die Standardproteingruppe 243,0 (198,3- 267,3) ng/ml und für die Hocheiweißgruppe 225,5 (202,0- 252,3) ng/ml. Die Messung der dritten Blutprobe ergab 228,0 (199,0- 260,5) ng/ml für die Standardproteingruppe und 241,0 (214,0- 254,5) ng/ml für die Hocheiweißgruppe. Auch für diesen Wachstumsfaktor zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Standardprotein- und der Hocheiweißgruppe ($p= 0,47$; $p= 0,50$; $p=0,56$).

Bezüglich des Anstiegs der IGF-II Konzentrationen zwischen der ersten und zweiten Blutentnahme konnte zwischen den Studiengruppen kein statistisch signifikanter Unterschied gefunden werden ($p= 0,18$). Ebenso für den Anstieg der Mittelwerte der IGF-II Konzentration zwischen der ersten und dritten Blutentnahme war kein signifikanter Unterschied festzustellen ($p= 0,59$). In der Standardproteingruppe lag der Anstieg zwischen der ersten und zweiten Blutentnahme bei 26 (-5- +50,5) ng/ml und bei der Hocheiweißgruppe zeigte

sich ein Unterschied von -2,0 (-23,0- +42,5) ng/ml. Der Anstieg der IGF-II Konzentration zwischen der ersten und dritten Blutentnahme lag in Standardweißgruppe bei 33,0 (11,0- 58,5) ng/ml und in Hocheiweißgruppe bei 28,0 (-23,5- +44,8) ng/ml. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied im Konzentrationsanstieg.

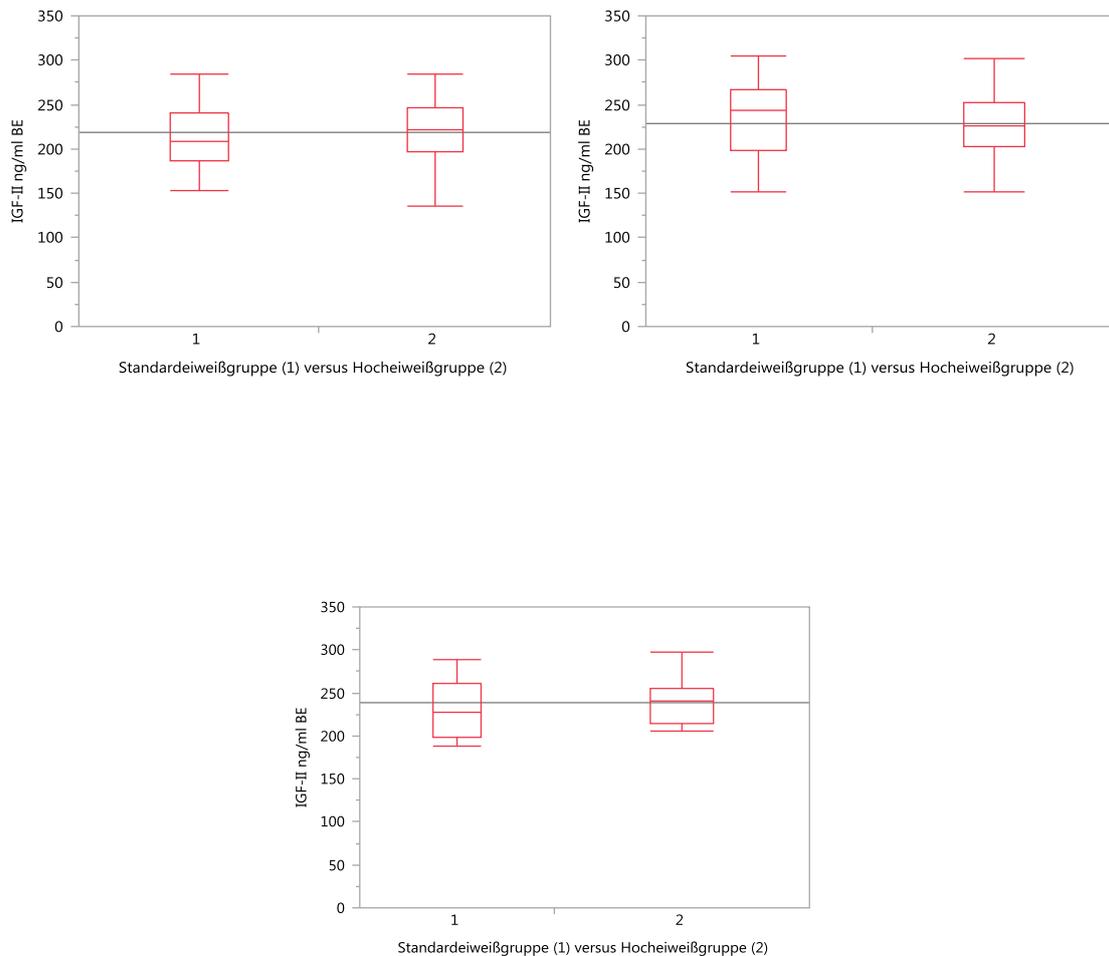


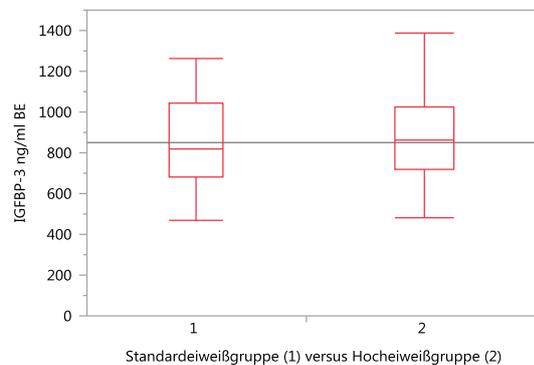
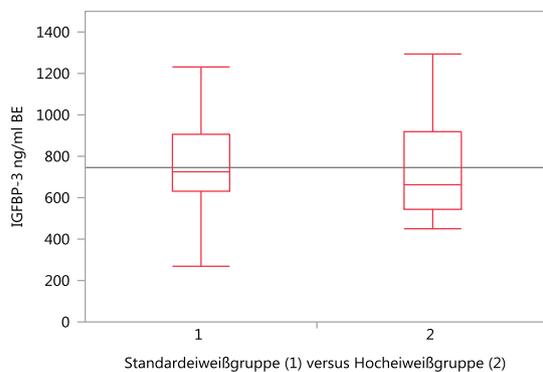
Abbildung 4: Vergleich IGF-II zwischen Standardweiß- versus Hocheiweißgruppe zum Zeitpunkt 1, 2 und 3.

3.5.3 IGFBP-3

Die erste Blutprobe der Standardweißgruppe ergab bei der Messung des IGFBP-3 Wertes 725 (634- 904) ng/ml, bei der Hocheiweißgruppe lag der Wert

bei 666 (547- 922) ng/ml. Für die zweite Blutprobe wurde bei der Standardweißgruppe ein Wert von 819 (684- 1042) ng/ml gemessen und bei der Hocheiweißgruppe von 865 (719- 1024) ng/ml. Aus dem Blutplasma der dritten Blutentnahme wurde für die Standardweißgruppe ein Wert von 860 (777- 1117) ng/ml gemessen. Bei der Hocheiweißgruppe lag das Ergebnis der Messung bei 932 (772- 1129) ng/ml. Für IGFBP-3 konnte ebenfalls zu allen drei Messzeitpunkten kein statistisch signifikanter Unterschied gefunden werden ($p=0,52$; $p=0,83$; $p=0,72$).

Der Anstieg der arithmetischen Mittelwerte der IGFBP-3 Konzentration zwischen der ersten und zweiten Blutentnahme lag in der Standardweißgruppe bei 160 ng/ml (-32- +270) ng/ml in der Hocheiweißgruppe bei 157 (-30- +249) ng/ml. Der Anstieg zwischen der ersten und der dritten Blutentnahme lag in der Standardweißgruppe bei 254 (169- 489) ng/ml und in der Hocheiweißgruppe bei 226 (41- 355) ng/ml. Sowohl für den Konzentrationsanstieg zwischen der ersten und zweiten ($p=0,89$), als auch zwischen der ersten und dritten Blutentnahme ($p=0,38$) ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ermitteln.



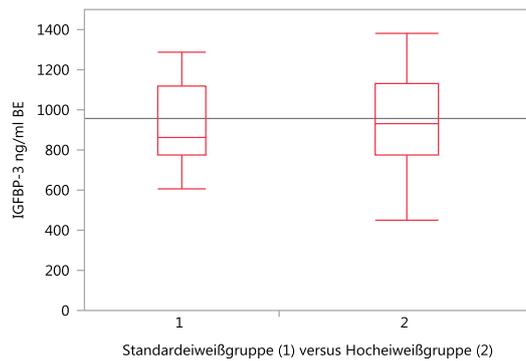


Abbildung 5: Vergleich IGFBP-3 zwischen Standardprotein- versus Hocheiweißgruppe zum Zeitpunkt 1, 2 und 3.

3.5.4 IGFBP-1

Bei der Bestimmung der IGFBP-1 Konzentration gab es bei einem Probanden eine Besonderheit. Dieser Probanden aus der Hocheiweißgruppe, genauer aus der Gruppe mit dem neuen eiweißreicheren Supplement, zeigte im Vergleich zu allen anderen Probanden besonders hohe IGFBP-1 Konzentrationen im Plasma. Die Werte lagen bei allen drei Messungen bei > 128 ng/ml. Da eine weitere Validierung der Werte aufgrund der zu geringen Plasamenge nicht möglich war, ging der Wert von 128 ng/ml in die Berechnung ein. Bei den anderen bestimmten Wachstumsfaktoren bei diesem Proband zeigten sich normale Werte, vergleichbar mit denen der anderen Probanden.

Bei der Standardproteingruppe lag der IGFBP-1 Wert bei der ersten Blutprobe bei 13,5 (10,3- 40,5) ng/ml, für die Hocheiweißgruppe lag der Wert bei 21,0 (9,0-36,0) ng/ml. Für die zweite Plasmprobe ergab sich für die Standardproteingruppe ein Wert von 11,5 (8,3- 16,8) ng/ml, bei der Hocheiweißgruppe lag das Ergebnis der zweiten Probe bei 10,0 (7,3- 32,2) ng/ml. Die Ergebnisse der dritten Blutprobe lagen für die Standardproteingruppe bei 17,0 (5,0- 40,0) ng/ml und für die Hocheiweißgruppe bei 21,0 (10,3- 37,3) ng/ml. Zu allen drei Zeitpunkten konnte kein signifikanter Unterschied für den

Wachstumsfaktor IGFBP-1 zwischen den Interventionsgruppen gefunden werden ($p = 0,72$; $p = 0,85$; $p = 0,55$).

Vergleicht man den Anstieg der IGFBP-1 Konzentration zwischen den Gruppen zeigte sich in der Standardweißgruppe zwischen der ersten und der zweiten Blutentnahme ein Unterschied von $-12,0$ ($-48,3$ - $+0,3$) ng/ml in der Hocheiweißgruppe von $-8,0$ ($-19,5$ - $+1,5$) ng/ml. Zwischen der ersten und dritten Blutentnahme zeigte sich ein Unterschied der IGFBP-1 Konzentration in der Standardweißgruppe bei $-14,0$ ($-56,0$ - $-2,0$) ng/ml und in der Hocheiweißgruppe von $-8,5$ ($-34,3$ - $+17,3$) ng/ml. Es war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Studiengruppen zwischen der ersten und zweiten Blutentnahme festzustellen ($p = 0,39$). Ebenso für den Anstieg zwischen der ersten und dritten Blutentnahme ($p = 0,18$)

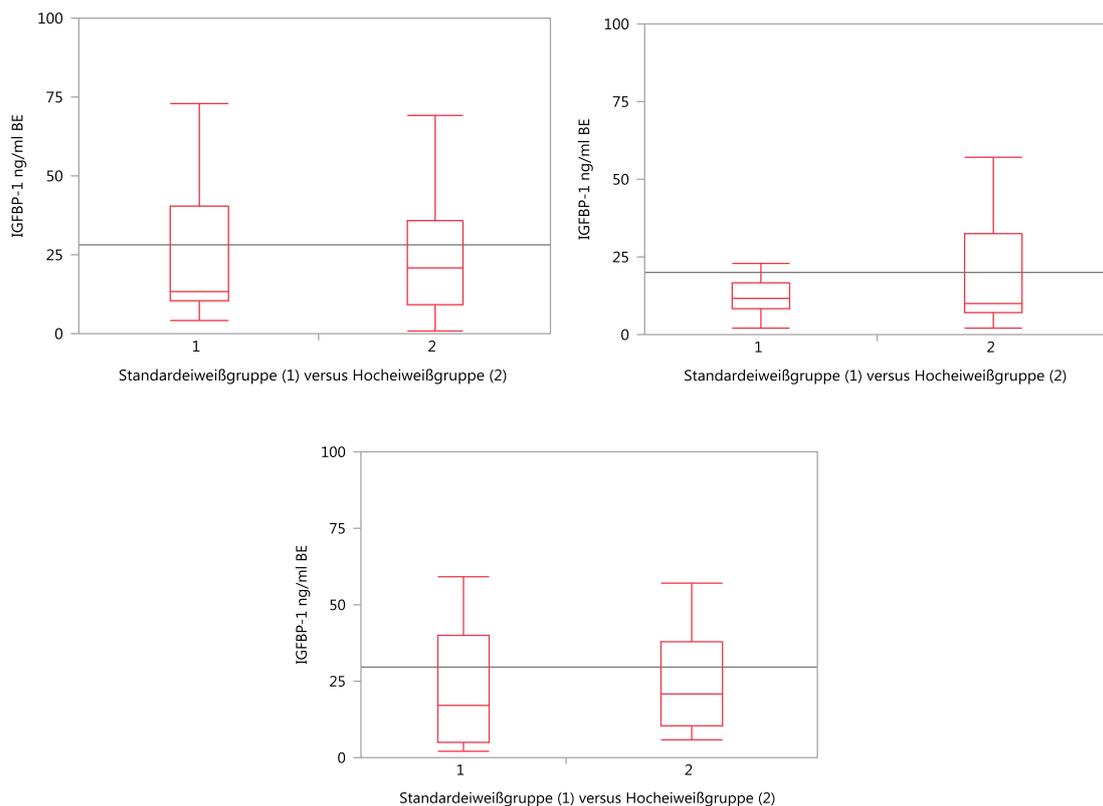
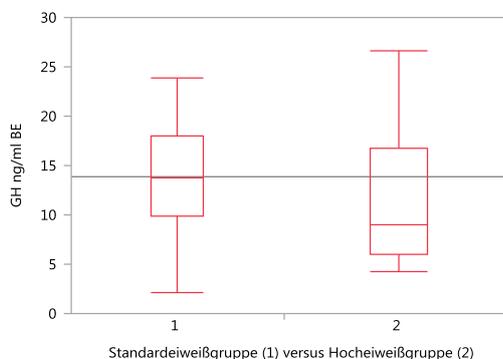
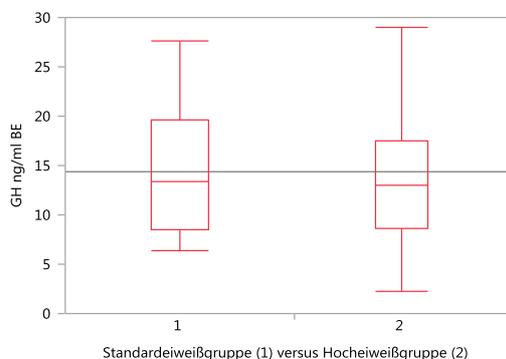


Abbildung 6: Vergleich IGFBP-1 zwischen Standardweiß- versus Hocheiweißgruppe zum Zeitpunkt 1, 2 und 3.

3.5.5 Wachstumshormon (GH)

Bei der ersten Blutprobe ergab sich in der Standardweißgruppe ein Wert von 13,4 (8,6- 19,7) ng/ml. Für die Hocheiweißgruppe lag das Ergebnis der Analyse der ersten Plasmaprobe bei 13,0 (8,6- 17,5) ng/ml. Bei der zweiten Plasmaprobe ergab die Messung 13,7 (9,9- 18,0) ng/ml für die Standardweißgruppe und 9,0 (6,0- 16,8) ng/ml für die Hocheiweißgruppe. Bei der Messung der dritten Proben lag das Ergebnis der Standardweißgruppe bei 10,3 (7,6- 13,0) ng/ml und das der Hocheiweißgruppe bei 9,6 (6,1- 13,9) ng/ml. Hier zeigte sich an allen drei Messzeitpunkten ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied ($p= 0,35$; $p=0,12$; $p= 0,87$).

Zwischen der ersten und zweiten Blutentnahme zeigte sich ein Unterschied von -2,8 (-9,5 - +3,1) ng/ml in der Standardweißgruppe. In der Hocheiweißgruppe von -0,9 (-7,8- -6,3) ng/ml. Zwischen der ersten und dritten Blutentnahme lag der Unterschied des Wachstumshormons in der Standardweißgruppe bei -8,9 (-14,3- +0,9) ng/ml und in der Hocheiweißgruppe bei -2,5 (-3,8- +4,2) ng/ml. Vergleicht man den Anstieg der Wachstumshormonkonzentration, zeigte sich zwischen den Gruppen sowohl zwischen der ersten und zweiten Blutentnahme ($p=0,41$) als auch zwischen der ersten und dritten Blutentnahme ($p= 0,08$) kein statistisch signifikanter Unterschied.



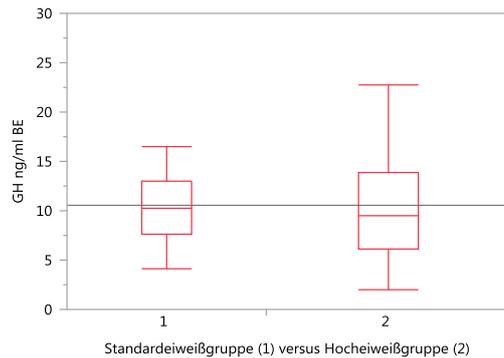


Abbildung 7: Vergleich GH zwischen Standardprotein- versus Hoheprotein zum Zeitpunkt 1, 2 und 3.

3.6 Korrelationsanalysen zwischen der Eiweißzufuhr und dem jeweiligen Wachstumsfaktor

3.6.1 IGF-I

Bei der Korrelationsanalyse zwischen der mittleren täglichen Eiweißzufuhr fünf Tage vor der Blutentnahme und der IGF-I Konzentration im Blut der Frühgeborenen zeigte sich bei der ersten Blutentnahme kein statistisch signifikanter Zusammenhang ($r_p = 0,093$; $p = 0,479$) (im folgenden wird die Pearson-Korrelation mit r_p und die Spearman-Korrelation mit r_s angegeben), für die zweite Blutentnahme zeigte sich ebenfalls kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der durchschnittlichen Eiweißzufuhr fünf Tage vor der Blutentnahme und der IGF-I Konzentration. ($r_p = -0,008$; $p = 0,954$) Bei der dritten Blutentnahme ließ sich ebenfalls kein bedeutsamer Zusammenhang finden. ($r_s = -0,062$; $p = 0,792$).

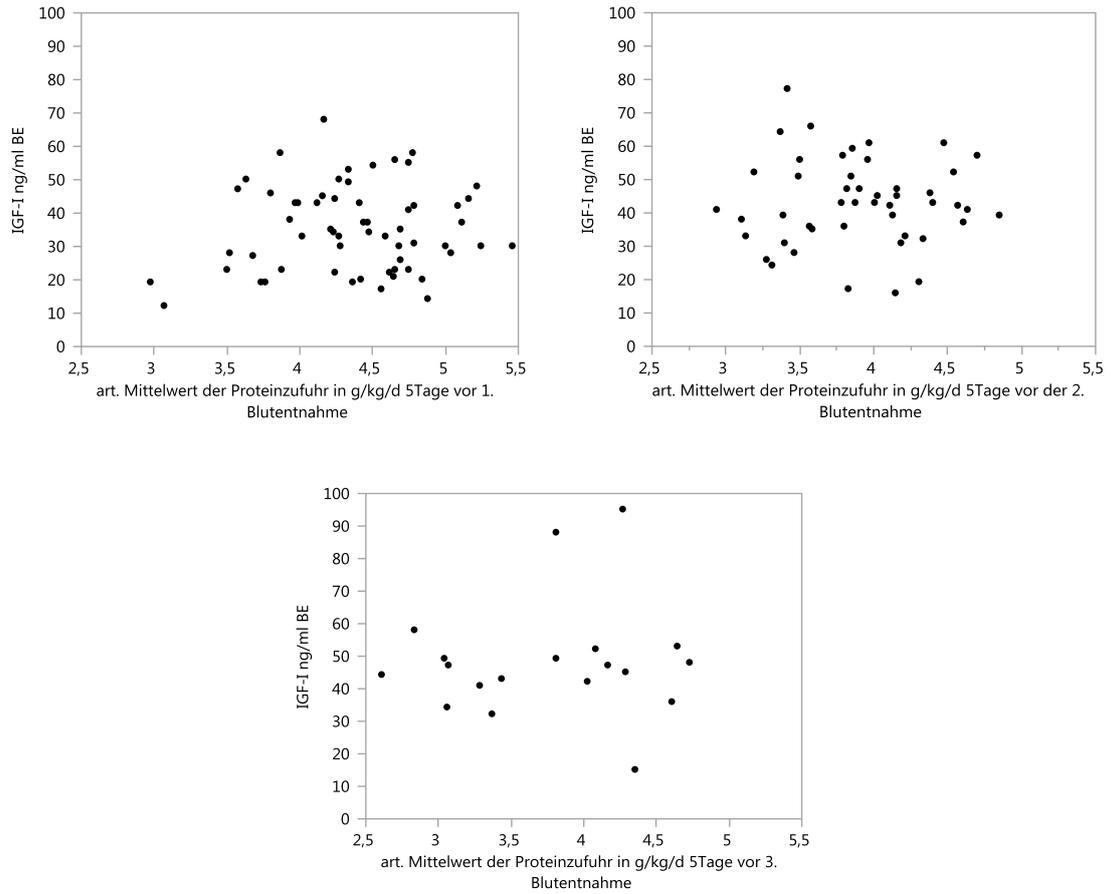


Abbildung 8: Korrelationsanalyse zwischen IGF- I und der Proteinzufuhr 5 Tage vor der Blutentnahme zum Zeitpunkt 1, 2 und 3.

3.6.2 IGF-II

Die Korrelationsanalysen der IGF-II Werte mit der mittleren täglichen Eiweißzufuhr fünf Tage vor der jeweiligen Blutentnahme ergaben an allen drei Messzeitpunkten keinen statistisch signifikanten Zusammenhang. ($r_p = 0,159$; $p=0,226$), ($r_p = -0,081$; $p= 0,590$), ($r_s = - 0,087$; $p= 0,7143$).

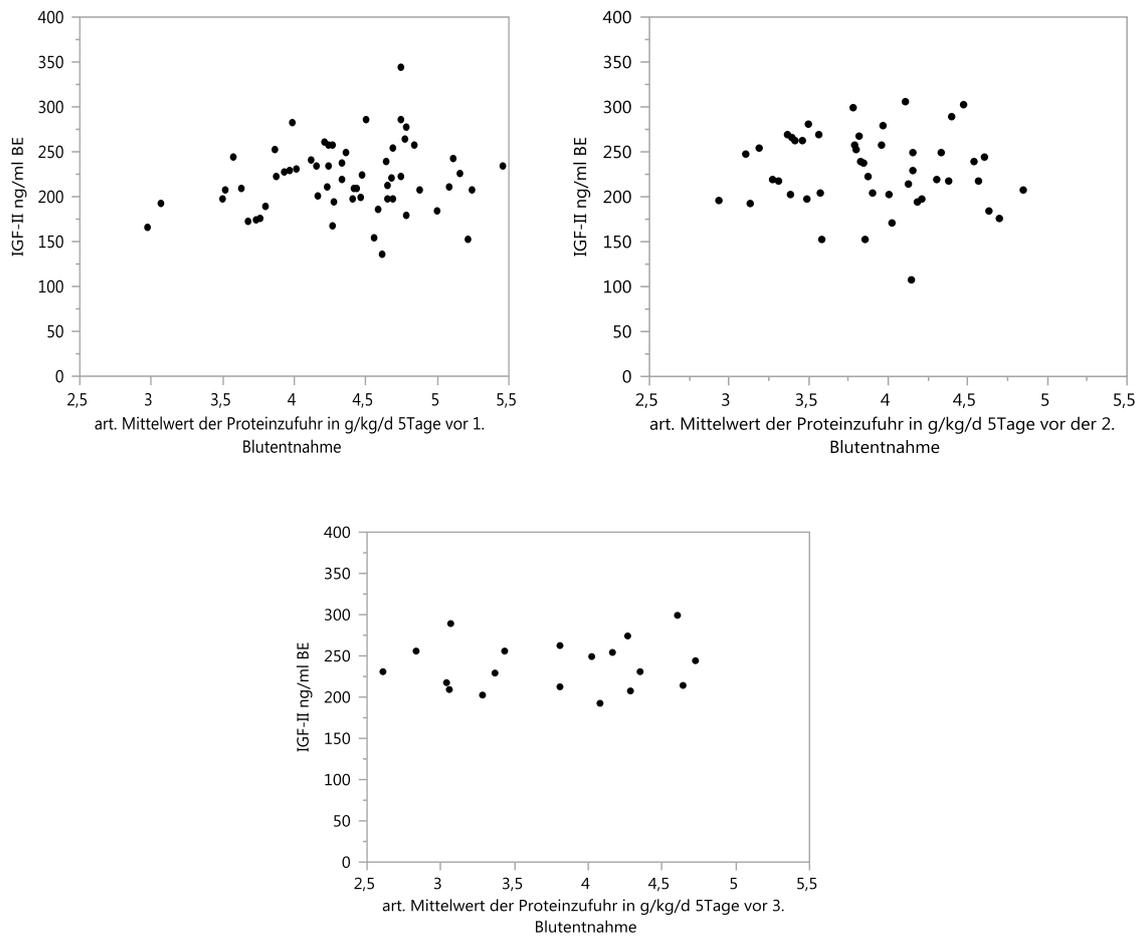


Abbildung 9: Korrelationsanalyse zwischen IGF- II und der Proteinzufuhr 5 Tage vor der Blutentnahme zum Zeitpunkt 1, 2 und 3.

3.6.3 IGFBP-3

Bei der Korrelationsanalyse der IGFBP-3 Konzentrationen mit der Eiweißzufuhr in den fünf Tagen vor der jeweiligen Blutentnahme ergab sich für alle Blutentnahmen kein statistisch signifikanten Zusammenhang ($r_p = 0,047$; $p = 0,721$), ($r_p = -0,258$; $p = 0,259$), ($r_p = -0,158$; $p = 0,505$).

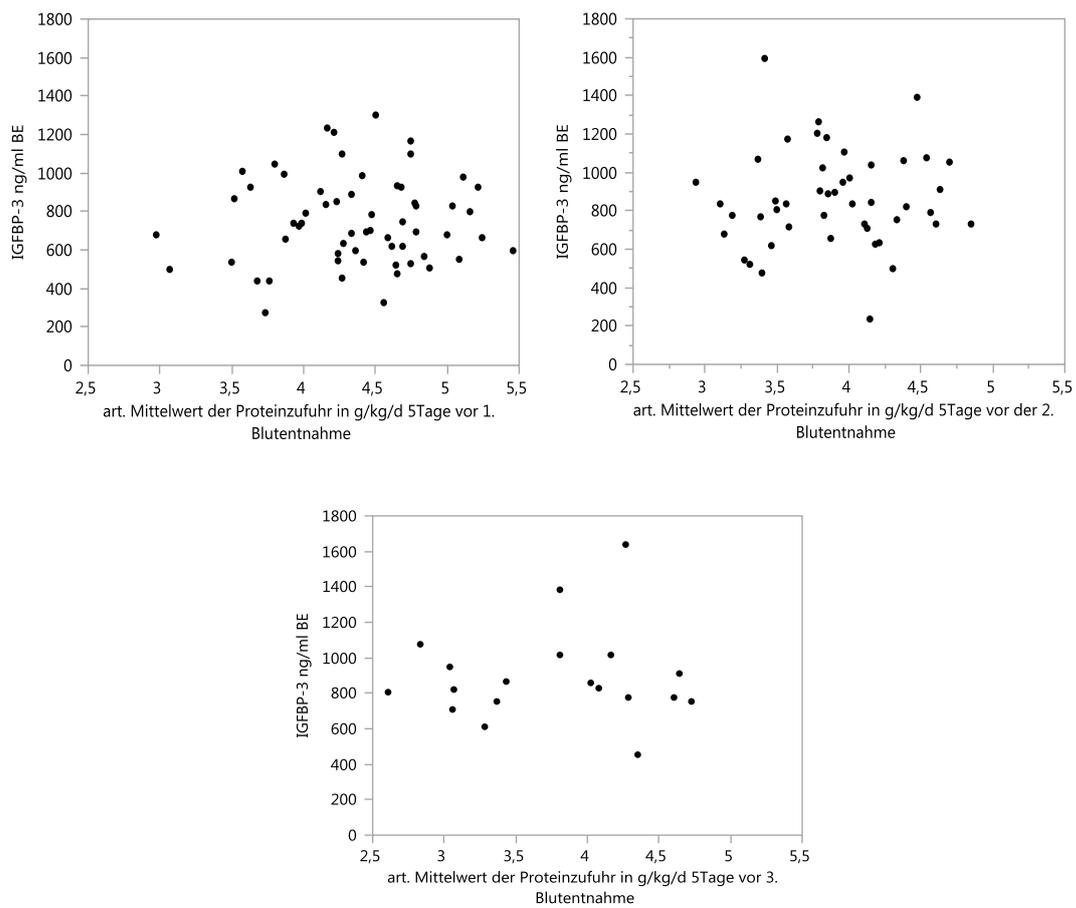


Abbildung 10: Korrelationsanalyse zwischen IGFBP- 3 und der Proteinzufuhr 5 Tage vor der Blutentnahme zum Zeitpunkt 1, 2 und 3.

3.6.4 IGFBP-1

Die Korrelationsanalyse für die IGFBP-1 Konzentration im Blut der Frühgeborenen mit der Eiweißzufuhr jeweils fünf Tage vor der Blutentnahme ergab für alle drei Zeitpunkte keinen Zusammenhang ($r_s = -0,083$; $p = 0,546$), ($r_s = -0,162$; $p = 0,283$), ($r_s = 0,105$; $p = 0,669$).

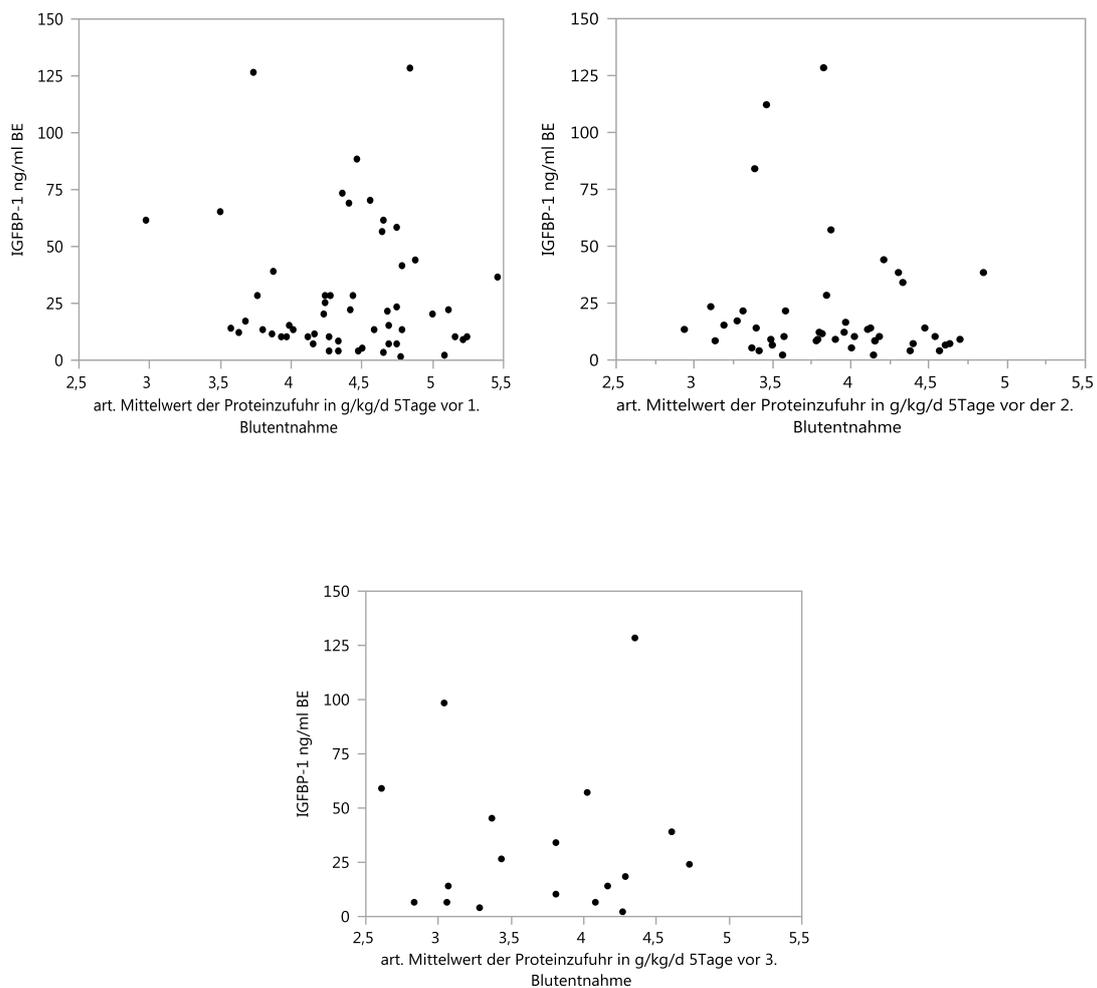


Abbildung 11: Korrelationsanalyse zwischen IGFBP- 1 und der Proteinzufuhr 5 Tage vor der Blutentnahme zum Zeitpunkt 1, 2 und 3.

3.6.5 Wachstumshormon (GH)

Die Korrelation zwischen der Eiweißzufuhr und der Konzentration an Wachstumshormon im Blut der Probanden ergab für die erste Blutentnahme keinen statistisch signifikanten Zusammenhang ($r_s = -0,046$; $p = 0,737$). Bei der zweiten Blutentnahme ($r_s = -0,304$; $p = 0,038$) zeigte sich ein schwacher statistisch signifikanter Zusammenhang allerdings ohne Bedeutung. Die Korrelationsanalyse der dritten Blutentnahme zeigte keinen statistisch signifikanten Zusammenhang ($r_p = 0,209$; $p = 0,389$).

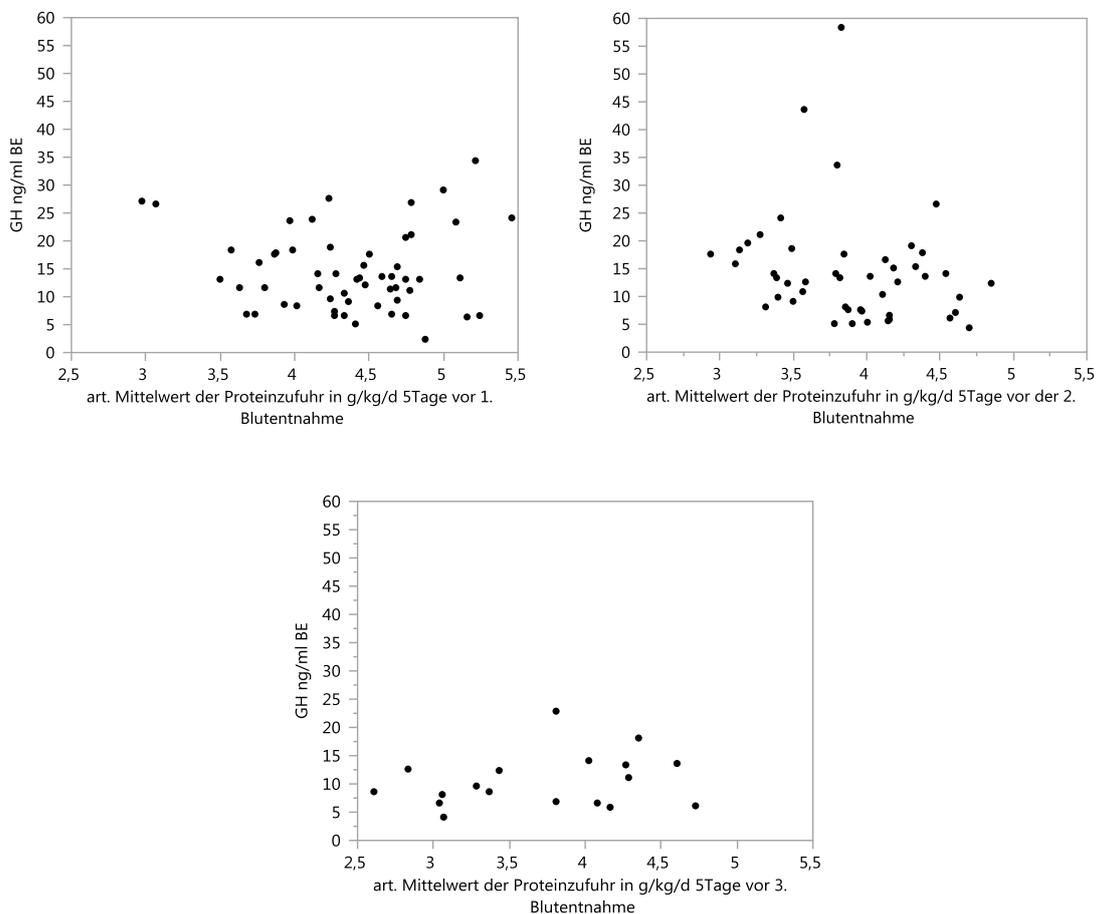


Abbildung 12: Korrelationsanalyse zwischen GH und der Proteinzufuhr 5 Tage vor der Blutentnahme zum Zeitpunkt 1, 2 und 3.

3.7 Korrelation der mittleren Gewichtszunahme mit dem jeweiligen Wachstumsfaktor

Die folgenden Daten beschreiben die Korrelationsanalyse zwischen den verschiedenen Wachstumsfaktoren zu den drei Blutentnahmezeitpunkten und der mittleren Gewichtszunahme zwischen der Geburt und dem Interventionsende.

3.7.1 IGF-I

Tabelle 8: Korrelationsanalyse zwischen IGF-I und der mittleren Gewichtszunahme

Wachstumsfaktor und Zeitpunkt	$r_p = \text{Pearson}, r_s = \text{Spearman}$	p-Wert
IGF-I bei der 1. Blutentnahme (BE)	$r_p = 0,035$	$p = 0,790$
IGF-I bei der 2. BE	$r_p = -0,206$	$p = 0,152$
IGF-I bei der 3. BE	$r_s = -0,338$	$p = 0,068$

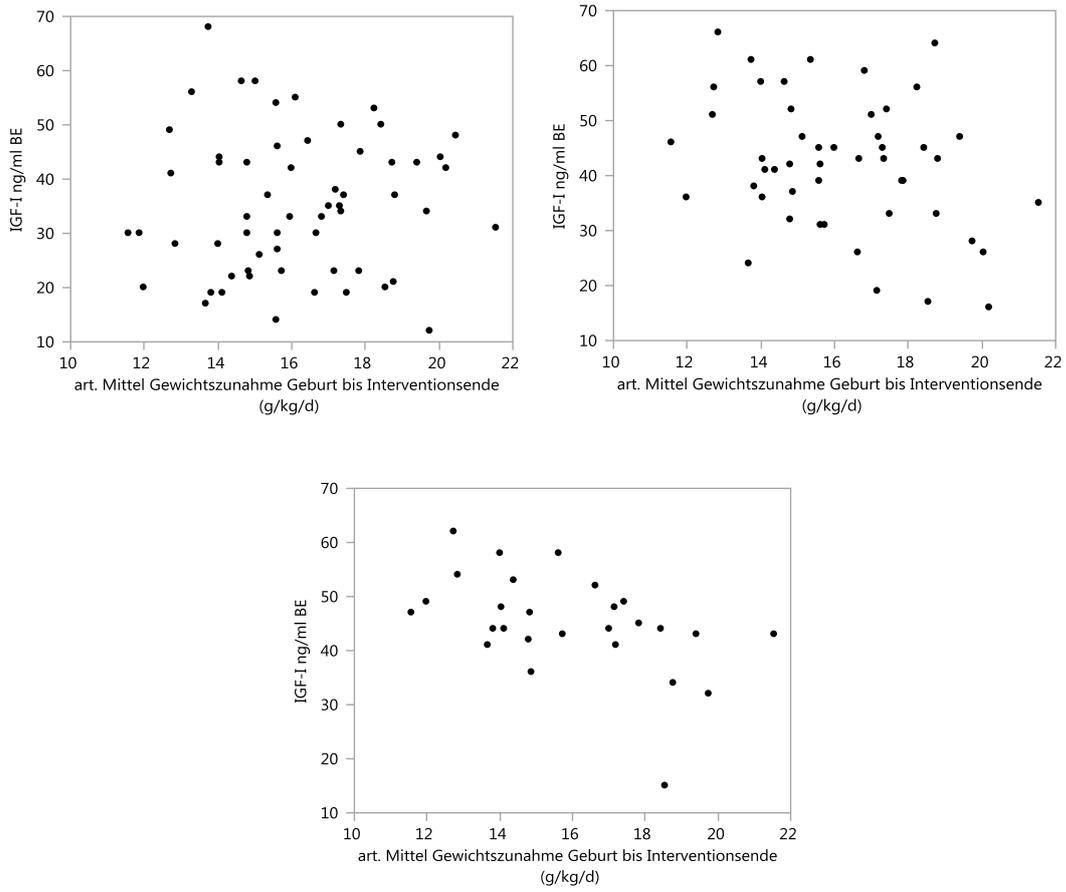


Abbildung 13: Korrelationsanalyse zwischen IGF-I zum Zeitpunkt 1, 2 und 3 der Blutentnahme und der Gewichtszunahme im art. Mittel zwischen Geburt und Interventionsende.

3.7.2 IGF-II

Tabelle 9: Korrelationsanalyse zwischen IGF-II und der mittleren Gewichtszunahme

Wachstumsfaktor und Zeitpunkt	r_p = Pearson, r_s = Spearman	p-Wert
IGF-II bei der 1. BE	$r_p = -0,105$	$p = 0,427$
IGF-II bei der 2. BE	$r_p = -0,256$	$p = 0,073$
IGF-II bei der 3. BE	$r_s = -0,399$	$p = 0,029$

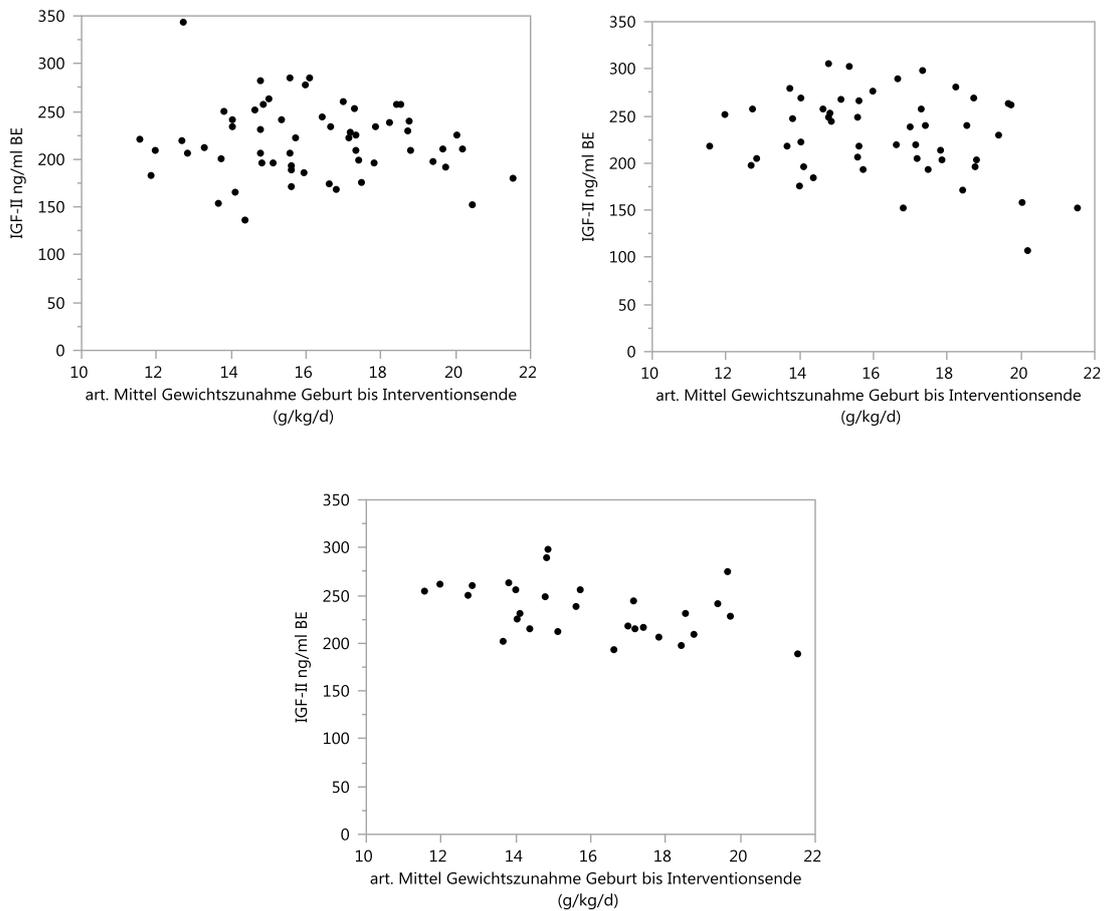


Abbildung 14: Korrelationsanalyse zwischen IGF-II zum Zeitpunkt 1, 2 und 3 der Blutentnahme und der Gewichtszunahme im art. Mittel zwischen Geburt und Interventionsende.

3.7.3 IGFBP-3

Tabelle 10: Korrelationsanalyse zwischen IGFBP-3 und der mittleren Gewichtszunahme

Wachstumsfaktor und Zeitpunkt	$r_p =$ Pearson, $r_s =$ Spearman	p-Wert
IGFBP-3 bei der 1. BE	$r_p = -0,104$	$p = 0,431$
IGFBP-3 bei der 2. BE	$r_p = -0,208$	$p = 0,146$
IGFBP-3 bei der 3. BE	$r_p = -0,122$	$p = 0,520$

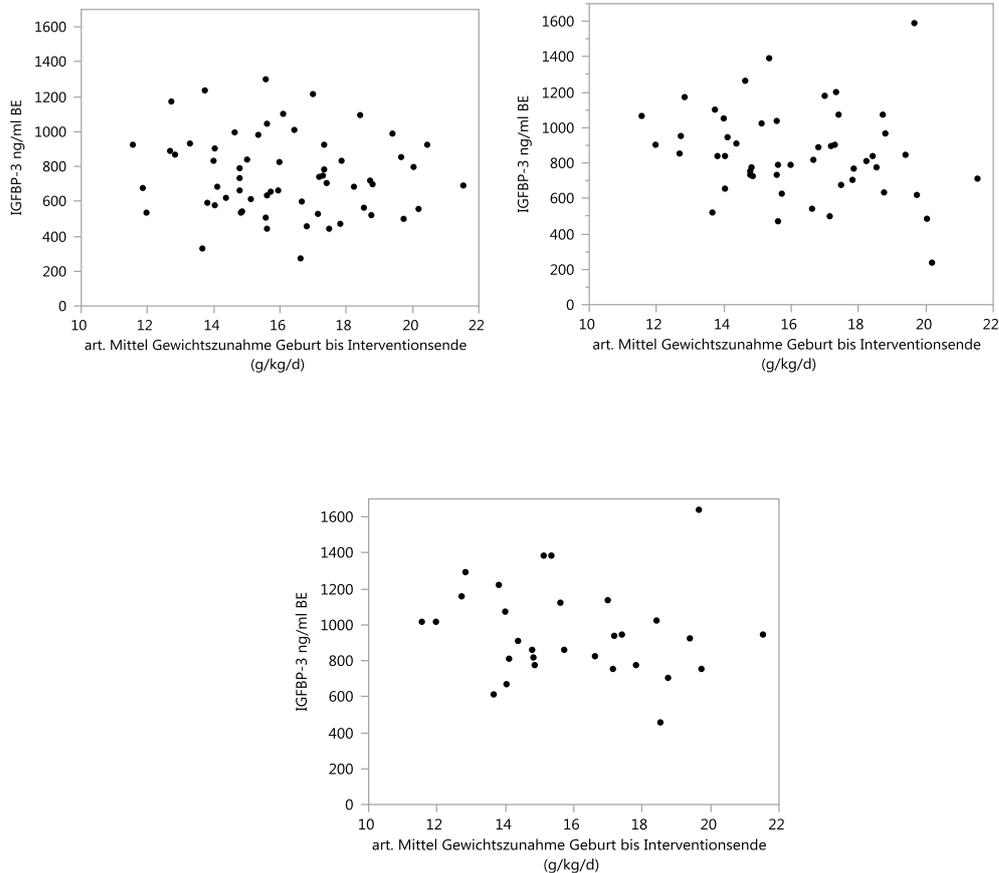


Abbildung 15: Korrelationsanalyse zwischen IGFBP-3 zum Zeitpunkt 1, 2 und 3 der Blutentnahme und der Gewichtszunahme im art. Mittel zwischen Geburt und Interventionsende.

3.7.4 IGFBP-1

Tabelle 11: Korrelationsanalyse zwischen IGFBP-1 und der mittleren Gewichtszunahme

Wachstumsfaktor und Zeitpunkt	r_p = Pearson, r_s = Spearman	p-Wert
IGFBP-1 bei der 1. BE	$r_s = -0,028$	$p = 0,849$
IGFBP-1 bei der 2. BE	$r_s = -0,038$	$p = 0,797$
IGFBP-1 bei der 3. BE	$r_s = 0,352$	$p = 0,0613$

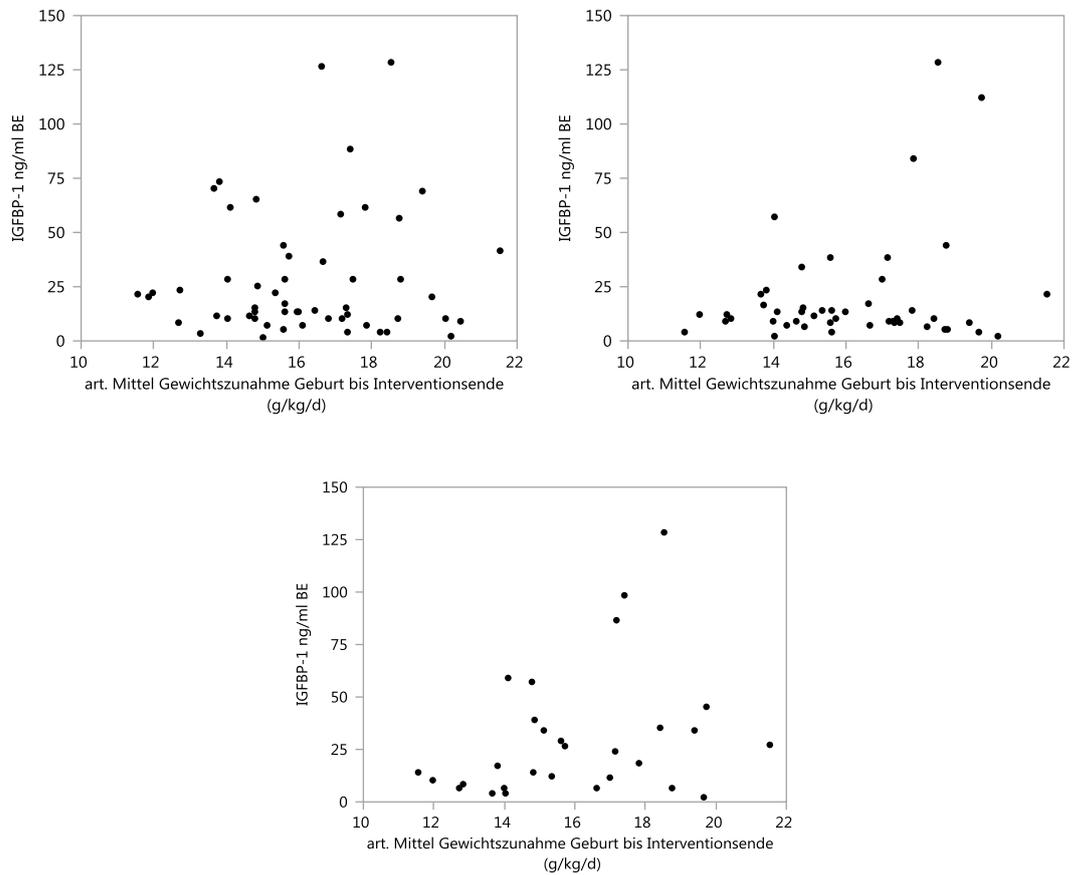


Abbildung 16: Korrelationsanalyse zwischen IGFBP-1 zum Zeitpunkt 1, 2 und 3 der Blutentnahme und der Gewichtszunahme im art. Mittel zwischen Geburt und Interventionsende.

3.7.5 Wachstumshormon (GH)

Tabelle 12: Korrelationsanalyse zwischen GH und der mittleren Gewichtszunahme

Wachstumsfaktor und Zeitpunkt	r_p = Pearson, r_s = Spearman	p-Wert
GH bei der 1. BE	$r_s = 0,181$	$p = 0,182$
GH bei der 2. BE	$r_s = -0,156$	$p = 0,280$
GH bei der 3. BE	$r_p = -0,063$	$p = 0,744$

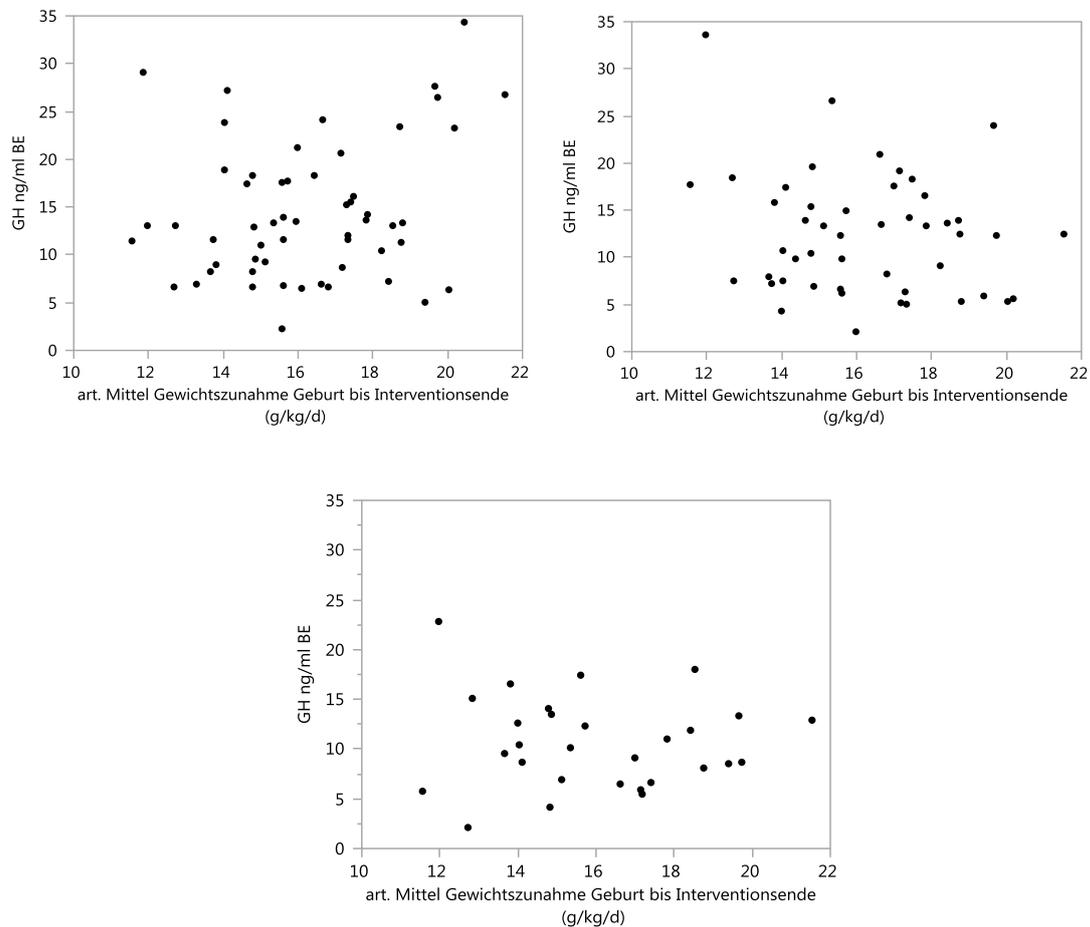


Abbildung 17: Korrelationsanalyse zwischen GH zum Zeitpunkt 1, 2 und 3 der Blutentnahme und der Gewichtszunahme im art. Mittel zwischen Geburt und Interventionsende.

3.8 Wachstumsfaktoren: Vergleich der beiden Hocheiweißgruppen miteinander, Individuelle Supplementierung (2a) verglichen mit Supplementierung mit dem eiweißreicheren neuen Frauenmilchsupplement (2b).

3.8.1 IGF-I

Bei der individuell supplementierten Gruppe ergab sich bei der Analyse der ersten Plasmaprobe ein IGF-I Wert von 35,0 (26,0- 44,0) ng/ml, bei der Gruppe, die FM neu erhielt, wurde ein Wert von 30,0 (23,0- 37,0) ng/ml gemessen. Die Analyse der zweiten Plasmaprobe ergab 45,0 (39,8- 48,0) ng/ml für die individuell supplementierte Gruppe und 39,0 (22,0- 45,0) ng/ml für die andere Gruppe. Die Ergebnisse der dritten Blutproben bei der individuell supplementierten Gruppe lagen bei 46,5 (41,5- 59,8) ng/ml und bei der Gruppe, die FM neu erhielt, bei 47,0 (39,0- 58,0) ng/ml. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied gefunden werden ($p= 0,16$; $p= 0,12$; $p= 0,88$)

3.8.2 IGF-II

Der IGF-II Wert bei der individuell supplementierten Gruppe in der ersten Blutprobe war 225,0 (197,0- 253,0) ng/ml bei der Gruppe, die FM neu erhielt, war der Wert 215,0 (195,3- 244,8) ng/ml. Die Ergebnisse der zweiten Plasmaproben ergaben 233,0 (193,0- 256,3) ng/ml für die individuell supplementierte Gruppe und 218,0 (207,8- 246,8) ng/ml für die Gruppe, die FM neu erhielt. Die Analyse der dritten Blutprobe ergab für die individuell supplementierte Gruppe 215,5 (212,5- 247,0) ng/ml und für die andere Gruppe 248,0 (234,0- 276,0) ng/ml. Für IGF-II besteht bei allen drei Blutproben kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p= 0,53$; $p= 0,79$; $p= 0,14$).

3.8.3 IGFBP-3

Die Analyse der ersten Blutprobe ergab eine Konzentration von 745 (575-985) ng/ml für die individuell supplementierte Gruppe und 630 (537-838) ng/ml für die Gruppe, die FM neu erhielt. Eine Konzentration von 903 (793-1024) ng/ml IGFBP-3 war das Ergebnis der Analyse der zweiten Blutprobe für die individuell supplementierte Gruppe und 763 (708-992) ng/ml für die Gruppe, die FM neu erhielt. Die Analyse der dritten Plasmaprobe ergab folgendes Ergebnis, für die individuell supplementierte Gruppe 972 (913- 1152) ng/ml und für die andere Gruppe 858 (761-1097) ng/ml. Es bestand zu allen drei Messzeitpunkten kein statistisch signifikanter Unterschied ($p= 0,28$; $p= 0,23$; $p=0,41$).

3.8.4 IGFBP-1

Die Ergebnisse der IGFBP-1 Messung ergaben bei der individuell supplementierten Gruppe bei der Analyse der ersten Blutprobe 10,0 (6,0- 25,5) ng/ml, für die Gruppe, die FM neu erhielt, 23,5 (9,8- 47,5) ng/ml. Der IGFBP-1 Wert bei der Messung der zweiten Probe lag für die individuell supplementierte Gruppe bei 10,0 (8,0- 24,0) ng/ml, für die andere Gruppe bei 11,5 (4,5- 37,0) ng/ml. Das Ergebnis der dritten Blutprobe lag für die individuell supplementierte Gruppe bei 6,0 (6,0- 10,0) ng/ml und für die Gruppe die FM neu erhielt bei 13,0 (6,0- 24,0) ng/ml. Es wurde auch für IGFBP-1 kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Interventionsgruppen festgestellt ($p= 0,28$; $p= 0,72$; $p=0,39$)

3.8.5 Wachstumshormon (GH)

Die GH-Konzentration in der ersten Blutprobe lag für die individuell supplementierte Gruppe bei 11,2 (6,7- 14,1) ng/ml, für die Gruppe, die das FM neu erhielt bei 13,4 (10,6- 23,4) ng/ml. Bei der Messung der zweiten Blutprobe ergaben sich folgende Ergebnisse, für die individuell supplementierte Gruppe 7,5 (5,7- 12,6) ng/ml und für die andere Gruppe 14,4 (6,3- 18,8) ng/ml. Die Ergebnisse der Analyse der dritten Blutprobe ergaben für die individuell supplementierte Gruppe 8,0 (5,4- 9,1) ng/ml und 12,6 (8,0- 15,7) ng/ml für die Gruppe die FM neu erhielt. Es wurde kein statistisch signifikanter Unterschied für die GH- Konzentration zwischen den Gruppen gefunden ($p= 0,09$; $p=0,16$; $p= 0,13$).

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht von <1500 g die Effekte verschiedener Eiweißsupplementierungen, gängiger Eiweißsupplementierung (3,5- 4,0 g/kg/d) verglichen mit einer Hocheiweiß-Supplementierung (4,5 g/kg/d) auf die Plasmakonzentration verschiedener Wachstumsfaktoren und ihre Bindungsproteine zu untersuchen. Die höhere Proteindosis wurde zum einen über eine individualisierte Supplementierung entsprechend dem individuellen erhobenen Proteingehalt der Frauenmilch und zum anderen durch die Verwendung eines neuen Frauenmilchsupplements mit höherem Proteinanteil erreicht.

Wir konnten in dieser Studie zeigen, dass eine im Mittel tatsächlich um 0,6 g/kg/d höhere Proteinzufuhr in der Hocheiweißgruppe, verglichen mit der Standard eiweißgruppe über die Interventionsdauer von im Mittel 42 Tagen, keinen relevanten Einfluss auf die Plasmakonzentration der untersuchten Wachstumsfaktoren zu haben scheint.

4.1 Wachstumsfaktoren: Standard eiweißgruppe (1) verglichen mit Hocheiweißgruppe (2) sowie Korrelationsanalyse zwischen der verabreichten Proteinmenge fünf Tage vor der Blutentnahme und dem jeweiligen Wachstumsfaktor

4.1.1 IGF-I

Die IGF-I Konzentrationen im Blut der Frühgeborenen sind in beiden Gruppen im Laufe der Interventionsperiode angestiegen. Es konnte zu keinem der drei Blutentnahmezeitpunkte ein signifikanter Unterschied zwischen der Hocheiweiß- und der Standard eiweißgruppe in Bezug auf die IGF -I

Konzentration nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu einigen bisher veröffentlichten Studien, die einen positiven Zusammenhang zwischen Proteinzufuhr und IGF-I Konzentration festgestellt haben. [43], [39], [44] Price et al. untersuchten ebenfalls den Zusammenhang von Proteinzufuhr und IGF-Konzentration bei Frühgeborenen mit und ohne BPD. Vergleichbar mit unserer Studie untersuchten sie den Einfluss der Proteinzufuhr in den Tagen vor der Blutentnahme. Allerdings mit einem anderen Ergebnis, sie konnten einen Zusammenhang zwischen dem IGF-I Spiegel und der Proteinzufuhr bei Frühgeborenen feststellen. In diese Studie wurden Frühgeborene eingeschlossen die zwischen der 27. und 31. SSW geboren wurden. Die Bestimmung von IGF-I erfolgte aus Restblut von klinischen Blutentnahmen, dann wurde die Protein- und Kalorienzufuhr 2, 3, 4 und 7 Tage vor der Blutentnahme berechnet. Aufgrund der Verwendung von Restblutproben, ist davon auszugehen, dass die Bestimmung zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfand, was einen Vergleich mit unserer Studie diesbezüglich schwierig macht. Die Proteinzufuhr in der Gruppe der Kinder ohne BPD lag im Mittel bei 3,3 g/kg/d in der Gruppe mit BPD bei 2,9 g/kg/d. Die Gruppe mit der höheren Proteinzufuhr erhielt immer noch weniger Proteine als unsere Standardprotein-Gruppe. Leider wurden in dem veröffentlichten Artikel über die Studie nicht die absoluten IGF-Konzentrationen in den jeweiligen Gruppen angegeben. Ein Vergleich wäre allerdings auch schwierig, da es bei den zur Bestimmung verwendeten Radioimmunoassays keine internationalen Standards gibt. [45] Van de Lagemaat et al. wiederum konnten in ihrer Studie wie auch wir keinen Zusammenhang zwischen der IGF-I Konzentration und der Nährstoffzufuhr herstellen. Sie untersuchten Frühgeborene mit ähnlichen Einschlusskriterien wie in unserer Studie (<1500g Geburtsgewicht und <32 SSW), allerdings erstreckte sich der Beobachtungszeitraum bis 6 Monate postpartal. Es wurden 152 Probanden in die Studie eingeschlossen. Zwischen der Geburt und dem errechneten Entbindungstermin wurden die Probanden mit Frühgeborenen Formula oder supplementierter Muttermilch ernährt. Nach dem errechneten Entbindungstermin bis 6 Monate postpartal erhielten die Probanden Folgemilch oder supplementierte Muttermilch. Die Messung der

IGF-I Konzentration erfolgte am errechneten Entbindungstermin und mit 3 und 6 Monaten. Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem IGF-I Spiegel und der mittleren Zufuhr an Energie, Eiweiß, Fett und Kohlehydraten zu keinem der drei Beobachtungszeitpunkte gefunden werden. [25] Auch in Bezug auf den Anstieg der IGF-I Spiegel im Blut konnten wir zwischen der ersten und zweiten Blutentnahme und zwischen der ersten und dritten Blutentnahme keinen Unterschied zwischen den Studiengruppen finden. Eine erhöhte Proteinzufuhr führt somit auch nicht zu einem verstärkten Anstieg des IGF-I Spiegels. Darüber hinaus zeigten die Scatterplots keinen Zusammenhang zwischen der Proteinzufuhr fünf Tage vor der Blutentnahme und der IGF-I- Konzentration im Blut der Frühgeborenen. Dies konnte für alle drei Beobachtungszeitpunkte gezeigt werden.

4.1.2 IGF-II

Die Auswirkung von verschiedenen Proteindosierungen auf die IGF-II Konzentrationen im Blut von Frühgeborenen ist bisher wenig untersucht. Es gibt einige Studien die den Zusammenhang zwischen dem Geburtsgewicht und IGF-II Konzentrationen im Blut, bei am Termin geborenen Kindern, untersucht haben. Hier zeigte sich, dass Kinder die zu klein für ihr Alter (SGA) und Kinder die zu groß für ihr Alter (LGA) waren, höhere IGF-II-Spiegel aufwiesen als normal große Kinder. [46] Eine weitere Studiengruppe hat einen Zusammenhang zwischen der IGF-II Konzentration und der Gewichtszunahme bei Frühgeborenen im Alter von 8 Wochen feststellen können. [36] Ob ein Zusammenhang mit der Ernährung besteht, wurde in beiden Studien nicht untersucht. Bei unseren frühgeborenen Probanden zeigte sich in der Standard eiweißgruppe zunächst ein Anstieg der IGF-II- Konzentration von der ersten zur zweiten Blutentnahme und dann ein Abfall von der zweiten zur dritten Blutentnahme. In der Hocheiweißgruppe stiegen die IGF-II Konzentrationen von der erste zur zweiten und von der zweiten zur dritten Blutentnahme an. Es

konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Interventionsgruppen gefunden werden. Ebenso konnte für den Anstieg der IGF-II-Konzentrationen zwischen erster und zweiter und auch zwischen der ersten und dritten Blutentnahme kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Die Korrelationsanalyse zwischen den IGF-II-Konzentrationen an den drei Beobachtungszeitpunkten und der Proteinzufuhr jeweils fünf Tage zuvor hat keinen Zusammenhang gezeigt.

Die Tatsache, dass IGF-II hauptsächlich ein Wachstumshormon der fetalen Phase ist und unter intrauterinen konstanten Bedingungen im Fetus synthetisiert wird, [47] könnte erklären warum es durch Ernährungsregime mit unterschiedlichen Dosierungen an Proteinen nicht zu beeinflussen ist.

4.1.3 IGFBP-3

Der Einfluss der Proteinzufuhr auf dieses Bindungshormon wurde beispielsweise durch Socha et al. untersucht. In dieser multizentrischen Studie mit über 1000 termingerecht geborenen Säuglingen wurde ebenfalls eine Hochprotein- (2,9 und 4,4 g Protein/ 100 kcal) und eine Niedrigprotein- (1,7 und 2,2 g Protein/ 100 kcal) Gruppe verglichen. Zunächst erhielten die Probanden Neugeborenenmilch und später Folgemilch. Für die IGFBP-3-Konzentration im Alter von 6 Monaten ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. [39] Mit dem Unterschied, dass in der vorliegenden Protein for Premies- Studie deutlich weniger Probanden teilnahmen, diese alle vor der 32. SSW zur Welt kamen, der Unterschied der Proteindosis geringer war und die Blutentnahme noch vor dem errechneten Entbindungstermin stattfand, konnten auch wir keinen signifikanten Unterschied bei der IGFBP-3 Konzentration zwischen der Hocheiweiß- und der Standardeiweißgruppe finden. [39] In unserer Studie stiegen die IGFBP-3 Konzentrationen beider Gruppen von Blutentnahme zu Blutentnahme an. Auch im Bezug auf den Anstieg der IGFBP-

3 Konzentration von Blutentnahme zu Blutentnahme unterschieden sich die Gruppen nicht signifikant.

Smith et al. untersuchten in einer älteren Studie aus dem Jahr 1997 die Eignung unter anderem von IGFBP-3 zum Monitoring einer adäquaten Ernährung von Frühgeborenen. Sie konnten einen Zusammenhang zwischen dem Anstieg der Kalorienzahl und dem Anstieg von IGFBP-3 feststellen, nicht jedoch eine Verbindung zwischen Proteinzufuhr und IGFBP-3 Konzentration im Blut der Frühgeborenen. Da die Kinder in der PfP-Studie in beiden Interventionsgruppen eine ähnliche Energiezufuhr erhielten, wäre kein Unterschied zu erwarten gewesen.

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen und den beschriebenen Studien konnten Diaz-Gomez et al. eine Korrelation zwischen Kalorien- und Proteinzufuhr und IGFBP-3- Konzentration im Serum finden. Sie untersuchten Frühgeborene, die vor der 33. SSW geboren waren, und Frühgeborenen die zwischen der 33. und 37. SSW geboren waren, aber auch am Termin geborene Kinder. Im Alter von 1 Woche und 3 Woche postpartal wurde die Serumkonzentration von IGFBP-3 gemessen, darüber hinaus wurde die tägliche Energie- und Nährstoffzufuhr bestimmt. [48] Eine weitere Studie unterstützt diese Ergebnisse: auch Engstrom et al. konnten eine Verbindung zwischen enteraler Proteinzufuhr und IGFBP-3 Konzentration herstellen. [43] In unserer Studie lässt sich an allen drei Beobachtungszeitpunkten kein Zusammenhang zwischen der Proteinzufuhr vor der Blutentnahme und dem Serumspiegel feststellen.

4.1.4 IGFBP-1

Neben IGF-II gehört auch IGFBP-1 zu den Wachstumsfaktoren der IGF-Achse, die in der Fachliteratur seltener vertreten sind. Eine Forschungsgruppe aus Spanien untersuchte IGFBP-1 bei Frühgeborenen verglichen mit zeitgerecht

geborenen Kindern. Bei frühgeborenen Kinder wurden zwei Untergruppen ausgewertet, die Probanden die nach der 32. SSW zur Welt kamen, hatten niedrigere IGFBP-1-Spiegel im Blut, als die Kinder die vor der 32. SSW geboren wurden. Ein Zusammenhang der IGFBP-1 Spiegel mit der Ernährung oder genauer der Proteinzufuhr wurde in dieser Studie nicht untersucht. [49] In der vorliegenden Studie konnte in beiden Gruppen beobachtet werden, dass die IGFBP-1 Konzentrationen zunächst von der ersten zur zweiten Blutentnahme abfielen und von der zweiten zur dritten Blutentnahme wieder anstiegen. Zwischen der Hocheiweiß- und der Standard eiweißgruppe konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Auch für dieses Bindungsprotein kann an allen drei Beobachtungszeitpunkten keine Korrelation im Scatterplot zwischen Proteinzufuhr fünf Tage vor der Blutentnahme und der IGFBP-1 Konzentration im Blut gefunden werden. Die Auswirkungen verschiedener Proteindosen im Rahmen der Ernährung von Frühgeborenen auf die IGFBP-1 Konzentration im Blut wurden nach aktuellem Wissen bisher in keiner anderen Studie untersucht.

4.1.5 Wachstumshormon (GH)

Die GH-Konzentration in der Standard eiweißgruppe zeigte im Verlauf der ersten beiden Blutentnahmen zunächst einen gleichbleibenden Wert, bei der 3. Blutentnahme fiel die Konzentration ab. In der Hocheiweißgruppe fiel der GH-Spiegel von der ersten zur zweiten Blutentnahme ab und stieg bei der dritten Blutentnahme wieder an.

In einer Studie wurde der Verlauf der GH-Konzentration im Serum von Frühgeborenen gemessen, die klein für ihr Gestationsalter (SGA) waren und verglichen mit Kindern die normal (AGA) und groß (LGA) für ihr Gestationsalter waren. Bei der zuerst genannten Gruppe zeigten sich in der ersten postnatalen Woche höhere GH-Konzentrationen verglichen mit den anderen Gruppen. Im Verlauf sank die GH-Konzentration ab, so dass in der dritten und fünften

postnatalen Woche kein Unterschied mehr zwischen den Gruppen bestand. [50] In dieser Studie wurde leider nicht der Zusammenhang zwischen Proteinzufuhr und GH-Konzentration untersucht. In der vorliegenden Studie zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Hocheiweiß- und der Standard eiweißgruppe. Auch bezüglich des Anstiegs der GH-Konzentrationen gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Interventionsgruppen. Für das Wachstumshormon ließ sich kein Zusammenhang zwischen der Proteinzufuhr fünf Tage vor der Blutentnahme und der GH-Konzentration im Blut der Frühgeborenen finden. Nur für den zweiten Blutentnahmezeitpunkt wurde ein schwacher signifikanter Zusammenhang gezeigt, dieser ist aber ohne Bedeutung. Eine vergleichbare Studie die ebenfalls die Auswirkungen der Proteinzufuhr auf die GH-Konzentration im Blut der Frühgeborenen untersuchte, konnte in der Fachliteratur nicht gefunden werden. In der vorliegenden Studie wurden die GH-Ausschüttung inhibierende Hormone wie beispielsweise das im Pankreas gebildete Somatostatin nicht untersucht. Diese Ergebnisse wären interessant gewesen um die gefundenen Ergebnisse besser zu interpretieren. Ähnliches betrifft das Releasinghormon Dopamin, welches zumindest bei Gesunden die GH-Ausschüttung fördert.

4.2 Korrelation zwischen der mittleren Gewichtszunahme und dem jeweiligen Wachstumsfaktor

Abschließend wurde der Zusammenhang zwischen der mittleren Gewichtszunahme und dem jeweiligen Wachstumsfaktor untersucht. Für keinen der untersuchten Wachstumsfaktoren konnte ein Zusammenhang mit der mittleren Gewichtszunahme gefunden werden. Lediglich für IGF-II zum Beobachtungszeitpunkt 3 konnte ein schwacher signifikanter Zusammenhang gefunden werden, dieser ist aber ohne Bedeutung. Vergleichbare Untersuchungen findet man vor allem für IGF-I, alle anderen Wachstumsfaktoren wurden in bisherigen Studien in Bezug auf ihre Verbindung

mit der Gewichtszunahme nicht untersucht. Hansen-Pupp et al. haben in einer prospektiven Studie mit 64 Frühgeborenen gezeigt, dass IGF-I eine positiv modifizierende Wirkung auf die Gewichtsänderung hatte. Die Blutproben zur Bestimmung der IGF-I-Spiegel wurden wie auch in der vorliegenden Studie präprandial gewonnen. Die Probeentnahme erfolgte im Alter von 72 Stunden, mit 7 Tagen und anschließend wöchentlich. Eine Proteinzufuhr von 3,5 g/kg/d wurde angestrebt. Diese Bedingungen sind mit der Standardweißgruppe in unserer Studie vergleichbar. Die Nährstoffzufuhr hatte in dieser Studie einen positiven Effekt auf das Gewicht. In dieser Studie wurde analog zu IGF-I auch IGFBP-3 bestimmt, aber leider nicht ausgewertet. [30] Trotz vergleichbarer Bedingungen unterscheidet sich das Ergebnis beider Untersuchungen. In unserer Studie konnte weder ein Zusammenhang zwischen der Proteinzufuhr und den gemessenen IGF-I-Spiegeln gefunden werden, noch konnte in der Arbeit von Michaela Mathes ein Zusammenhang zwischen der Proteinzufuhr und der Gewichtszunahme gefunden werden. Engström et al. fanden eine Assoziation zwischen dem Gewicht und dem IGF-I Spiegel und zwischen der Proteinzufuhr und dem IGF-I Spiegel. Auch in dieser Studie war es das Ziel die frühgeborenen Kinder mit 3,5 g/kg/d Protein zu ernähren. Allerdings bildete bei allen untersuchten Probanden Muttermilch die Grundlage der Ernährung, Frauenmilchanalysen wurden nicht durchgeführt, was bedeuten kann, dass die tatsächliche Proteinzufuhr aufgrund der Variabilität der Nährstoffe in der Muttermilch unbekannt war. Auch in dieser Studie wurde IGFBP-3 untersucht, allerdings nur in der Verbindung mit dem postmenstruellen Alter. Hier wurde eine Assoziation beobachtet. [43]

4.3 Prüfung der Hypothese B: Vergleich der beiden Hocheiweißgruppen (Gruppe 2a/2b)

Vergleicht man die individuell supplementierte Hocheiweißgruppe mit der Hocheiweißgruppe, die das neuartige Frauenmilchsupplement erhielt, in Bezug

auf die Proteinzufuhr fünf Tage vor der Blutentnahme, konnten für die erste und zweite Blutentnahme statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden. Die Proteinzufuhr der Gruppe, die das neue eiweißreichere Supplement erhielt, war vor allen Blutentnahmen höher als die Proteinzufuhr der individuell supplementierten Gruppe. Die Proteinzufuhr vor der dritten Blutentnahme zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Hocheiweißgruppen. Die Ursache dafür könnte in der sehr kleinen Stichprobe liegen, in der individuell supplementierten Gruppe wurden zum Zeitpunkt der dritten Blutentnahme nur vier Probanden untersucht.

Für die untersuchten Wachstumsfaktoren und ihre Bindungsproteine ließ sich bei dem Vergleich der beiden Hocheiweißgruppen kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen feststellen. Dies konnte für IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-3 und GH zu allen drei Beobachtungszeitpunkten gezeigt werden. Hierbei ist zu beachten, dass in beiden Gruppen jeweils nur 15 Probanden zugeteilt waren, von denen vor allem am Beobachtungszeitpunkt drei, schon einige nach Hause entlassen waren. Das heißt: auch hier kann die Ursache dafür, dass kein Unterschied nachweisbar war in der kleinen Anzahl der ausgewerteten Proben liegen. Allerdings unterschieden sich die Gruppenmittelwerte kaum, so dass vielleicht auch bei wesentlich höherer Fallzahl kein Unterschied nachweisbar gewesen wäre. Darüber hinaus war nach den Ergebnissen aus dem Vergleich der Standard eiweißgruppe mit der Hocheiweißgruppe, die keine statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen zeigte auch kein Unterschied zwischen den beiden Hocheiweißgruppen zu erwarten, da die Differenz der Proteinzufuhr noch geringer war.

4.4 Zusammenfassende Betrachtung des fehlenden Zusammenhangs zwischen der Proteinzufuhr und den bestimmten Wachstumsfaktoren

Die Tatsache, dass bei allen bestimmten Wachstumsfaktoren kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zu finden war, trotz einer im Mittel um 0,6 g/kg/d unterschiedlichen Proteinzufuhr, könnte dadurch bedingt sein, dass schon in der Standardproteingruppe ausreichend Protein verabreicht wurde um eine adäquate Synthese der Wachstumsfaktoren zu gewährleisten. Eventuell liegt eine Art Sättigungseffekt vor. Was auch erklären würde, dass andere Studien wie beispielsweise Price et al. bei niedrigeren Proteinzufuhren ein Zusammenhang zwischen Proteinzufuhr und Wachstumsfaktoren finden konnten. Darüber hinaus handelt es sich bei dem System der Insulin like growth Faktoren und ihrer Bindungsproteine um ein hochkomplexes System, in dem viele weitere Faktoren eine wichtige Rolle spielen, die in dieser Studie nicht untersucht wurden. Wie beispielsweise Leptin, das bei der Körperzusammensetzung aber auch bei der Stimulation der Hormonachse über TRH und GnRH eine wichtige Aufgabe übernimmt. [36], [40] Andere Forschungsgruppen, die ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen Proteinzufuhr und IGF's finden konnten, vermuten genetische Faktoren, die bei der Regulation des Systems von Bedeutung sind. [25] Bei der Betrachtung der Auswirkungen der Proteinzufuhr auf die Wachstumsfaktoren und ihre Bindungsproteine sowie GH sollte man auch den Proteinmetabolismus der Frühgeborenen beachten. Die Verarbeitung der zugeführten Proteine ist aufgrund der Unreife vieler Organe nicht mit dem eines am Termin geborenen Kindes zu vergleichen. Eine Studie zeigte, dass sehr unreife Frühgeborene, entweder wegen der Unreife oder wegen der Morbidität, hohe Raten an Proteinumsatz und Proteinabbau aufweisen. Die hohen Raten an Proteolyse sind nicht durch den physiologischen Nährstoffumsatz zu erklären. Interventionsstrategien zur Förderung der besseren Proteinverwertung, wie die Therapie mit Insulin, GH oder Glutamin konnten bisher nicht zu einer erhöhten Proteinaufnahme oder zu erhöhtem Wachstum führen. [51]

Die Auswertung der primären Fragestellung der vorliegenden Studie hat neben der Proteinzufuhr auch die Kalorienzufuhr untersucht, hier gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Auswertung Michaela Mathes). Das bedeutet, die Hocheiweißgruppe hatte nicht mehr Energie zur Verfügung als die Standard eiweißgruppe, daher sollte man bedenken, dass die zusätzliche Zufuhr an Proteinen möglicherweise über die Gluconeogenese als Energieträger genutzt wurde und somit der Proteinsynthese gar nicht zur Verfügung stand. Beides eine mangelnde Energiezufuhr im Verhältnis zur Eiweißzufuhr als auch ein erhöhter Proteinumsatz könnten den nicht vorhandenen Unterschied über alle bestimmten Wachstumsfaktoren hinweg erklären. Auch könnte die Energiezufuhr der relevante Regulator der Wachstumsfaktorensynthese sein. Um diese Vermutung ausschließen zu können, müsste man genau untersuchen welcher Anteil der verabreichten Proteine tatsächlich für die Proteinsynthese zur Verfügung steht. Die Untersuchung der Aminosäureprofile im Blut wurde im Rahmen der Studie mittels einer Metabolomanalyse durchgeführt und wird aktuell ausgewertet.

Darüber hinaus ist zu bedenken, dass die Ausschüttung von Wachstumshormon und in dessen Folge auch der Wachstumsfaktoren wie beispielsweise IGF-I, tageszeitabhängig stattfindet. GH bindet dafür an spezifische Rezeptoren in der Leber oder an Rezeptoren in den Zielorganen (Knochen-, Knorpel- und Muskelgewebe) selbst und stimuliert die Sekretion von IGF-I. Da die Blutabnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten, immer koordiniert mit einer klinisch indizierten Blutentnahme stattgefunden haben, könnte die Variabilität der individuellen Messwerte erhöht sein und einen tatsächlich vorhandenen, jedoch kleinen Unterschied zwischen den Gruppen verdeckt haben.

4.5 Methodenkritik

4.5.1 Charakteristika der Probanden

Die Charakteristika der Studiengruppen und die Morbidität der Probanden zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Studiengruppen. (Tabelle 7) Die Ähnlichkeit der Gruppe belegt, dass die randomisierte Zuteilung der Patienten zu den Behandlungsgruppen erfolgreich zu einer ähnlichen Ausprägung relevanter Confounder führte. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Gruppen in nicht untersuchten Parametern trotzdem voneinander unterscheiden.

4.5.2 Blutentnahmen

Die Blutentnahmen zur Bestimmung der Wachstumsfaktoren und ihrer Bindungsproteine erfolgten in beiden Interventionsgruppen in ähnlichem postnatalem Alter. Auch für diesen Parameter, der in früheren Studien einen erheblichen Einfluss auf die Höhe der Wachstumshormonspiegel hatte [50], konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Standardweiß- und der Hocheiweißgruppe gefunden werden.

Die Anzahl der gewonnenen Blutproben je Studiengruppe unterschied sich nicht signifikant. Allerdings lagen für die dritte Blutentnahme deutlich weniger Proben (25) vor, verglichen mit der ersten (60) und zweiten (50) Blutentnahme. Die Tatsache, dass es keine Unterschiede zwischen den Gruppen gab belegt erneute, dass die Ergebnisse nicht durch eine ungleiche Verteilung relevanter Confounder beeinflusst werden. Allerdings bleibt zu bedenken, dass die Anzahl der teilnehmenden Probanden und die Zahl der untersuchten Proben eher klein

waren und dass deshalb sehr kleine Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen eventuell nicht erkannt werden konnten.

4.5.3 Proteinzufuhr jeweils fünf Tage vor den einzelnen Blutentnahmen

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten einen tatsächlichen Unterschied zwischen den Gruppen in Bezug auf die Proteinzufuhr über die gesamte Interventionsdauer von 0,6 g/kg/d, dieses Ergebnis ergab die Untersuchung der primären Fragestellung durch Michaela Mathes. Die tatsächliche Proteinzufuhr, jeweils fünf Tage vor der ersten und der zweiten Blutentnahme unterschied sich ebenfalls statistisch signifikant zwischen der Hocheiweißgruppe und der Standardeiweißgruppe um etwa den gleichen Betrag. Für die Eiweißzufuhr vor der dritten Blutentnahme ließ sich zwischen den Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied mehr nachweisen. Möglicherweise war zu diesem Zeitpunkt die Anzahl der Probanden zu niedrig, um einen statistisch signifikanten Unterschied zu erkennen, da ein wesentlicher Teil der Probanden zu diesem Zeitpunkt bereits nach Hause entlassen werden konnte.

Für die Berechnung der Proteinzufuhr wurden die Ergebnisse der Muttermilchanalyse mit den Proteinmengen im jeweiligen Supplement addiert. Die Muttermilanalysen wurden allerdings nur zweimal wöchentlich durchgeführt, für die dazwischen liegenden Tage wurden die Werte interpoliert. Dies birgt eine gewisse Ungenauigkeit in der Berechnung der tatsächlichen Proteinzufuhr. Eine tägliche Frauenmilchanalyse hätte exaktere Werte gebracht, wäre in der Praxis allerdings schwierig umzusetzen gewesen. Darüber hinaus wurden die Proben für die Muttermilchanalyse aus einer einzelnen abgepumpten Milchprobe gewonnen und nicht etwa aus der gepoolten Gesamtmenge eines Tages. Studien haben gezeigt, dass die

Inhaltsstoffe der Muttermilch auch tageszeitlichen Schwankungen unterworfen sind. [52]

4.6 Schlussfolgerung

Die in dieser Studie untersuchte höhere Proteinzufuhr, die mittels individueller Supplementierung durch Frauenmilchanalyse oder durch Supplementierung mit einem proteinreicheren neuartigen Supplement erreicht wurde, hatte zu keinem der drei Beobachtungszeitpunkte einen signifikanten Einfluss auf die Konzentrationen der Wachstumsfaktoren und ihrer Bindungsproteine im Blut der Frühgeborenen. Es konnte für alle fünf untersuchten Wachstumsfaktoren zu keinem der drei Zeitpunkte, an denen die Blutentnahmen erfolgten, eine Korrelation mit der Proteinmenge, die die Probanden in den fünf Tagen zuvor erhielten, gefunden werden. Auch bei dem Vergleich der beiden Hocheiweißgruppen untereinander konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in Bezug auf die fünf untersuchten Wachstumsfaktoren im Blut der Frühgeborenen gefunden werden. Die Proteinzufuhr hat in der vorliegenden Studie keinen Einfluss auf die Serum-Wachstumsfaktoren und ihre Bindungsproteine.

5. Zusammenfassung

5.1 Einleitung

Die Ernährung von Frühgeborenen hat einen besonders hohen Stellenwert, da die Folgen einer inadäquaten Nährstoffzufuhr das Frühgeborene nicht nur in der postnatalen Phase beeinflussen, sondern sich die Defizite bis in die Kindheit auswirken. [4] Nicht allein die Menge der Nahrung ist dabei von Bedeutung, auch die Nährstoffzusammensetzung ist entscheidend für ein physiologisches Wachstum. [6] Insbesondere die Körperzusammensetzung und die neurologische Entwicklung sind eng mit der Ernährung verknüpft. [53] Einen hohen Stellenwert in der Frühgeborenenernährung nehmen die Proteine ein. [54] Neben der Nährstoffzufuhr wird das Wachstum der Frühgeborenen auch durch die Wachstumsfaktoren und ihre Bindungsproteine beeinflusst. Diese Wachstumsfaktoren sind Polypeptide, das heißt für ihre Synthese werden Aminosäuren benötigt. Daher stellte sich die Frage: Hat eine höhere Eiweißzufuhr einen Einfluss auf Serum-Wachstumsfaktoren und ihre Bindungsproteine bei unreifen Frühgeborenen?

5.2 Probanden und Methoden

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine prospektive, monozentrische, randomisiert kontrollierte und partiell verblindete Studie, bei der eine Standardproteingruppe (3,5- 4 g/kg/d Protein) mit einer Hocheiweißgruppe (4,5 g/kg/d Protein) verglichen wurde. Einschlusskriterien waren die Geburt vor der 32. SSW und ein Geburtsgewicht unter 1500 g. Alle Frühgeborenen wurden hauptsächlich mit Muttermilch ernährt. Die Hocheiweißgruppe wurde nochmals unterteilt in eine individuell supplementierte Gruppe und eine Gruppe, die ein neues eiweißreicheres Supplement (1,8 g Protein/100 ml Muttermilch) erhielt. Während Probanden in der Standardproteingruppe Muttermilch mit dem Standardsupplement FM 85 (1 g Protein/100 ml Muttermilch) bekamen. Zweimal wöchentlich wurde eine Muttermilchanalyse durchgeführt. Zu drei Zeitpunkten während des stationären Aufenthaltes wurden Plasmaproben für die Bestimmung der

Wachstumsfaktoren gewonnen. Die Bestimmung von IGF-I, IGF-II, IGFBP-I, IGFBP-3 und GH erfolgte mittels Radioimmunassays bzw. ELISAs.

5.3. Ergebnisse

In die Studie wurden 60 Probanden eingeschlossen. Es wurden 139 Blutproben untersucht. Das mediane Alter der FG lag zum Zeitpunkt der drei Blutentnahmen bei 15, 35 und 54 Tagen. Zu den drei Zeitpunkten konnte für alle bestimmten Wachstumsfaktoren kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden, obwohl zumindest vor der ersten und zweiten Blutentnahme die Proteinzufuhr statistisch signifikant unterschiedlich war. Es konnte auch kein Zusammenhang zwischen dem jeweiligen Wachstumsfaktor und der tatsächlichen Proteinzufuhr fünf Tage vor der Blutentnahme gefunden werden. Darüber hinaus konnte auch kein Zusammenhang zwischen der mittleren Gewichtszunahme und den Wachstumsfaktoren gefunden werden.

5.4 Diskussion

Möglicherweise gibt es in Bezug auf die Proteinzufuhr eine Art Sättigungseffekt, sodass bereits in der Standardproteingruppe ausreichend Proteine zugeführt wurden, um eine adäquate Wachstumsfaktorensynthese zu gewährleisten. Viele Faktoren, wie stimulierende und inhibierende Mechanismen die auf das komplexe System der IGF-Achse einwirken, wurden nicht untersucht. Dies sollte bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Besonders in Bezug auf IGF-I und IGFBP-3 haben verschiedene Studien kontroverse Ergebnisse, bei der Untersuchung des Zusammenhanges von Proteinzufuhr und Wachstumsfaktoren, erzielt. [25, 39, 43]

5.5 Schlussfolgerung

Die, in dieser Studie untersuchte, höhere Eiweißzufuhr führte nicht zu einem signifikanten Anstieg der Wachstumsfaktoren im Blut der Frühgeborenen. Es konnte auch kein Zusammenhang zwischen der Proteinzufuhr vor der Blutentnahme und dem jeweiligen Serumspiegel festgestellt werden.

Literaturverzeichnis

- [1] AQUA-INSTITUT GMBH: *Qualitätsreport 2010* – Überprüfungsdatum 2016-07-12
- [2] HAY W.W. ; THUREEN, Patti: Protein for Preterm Infants: How Much is Needed? How Much is Enough? How Much is Too Much? In: *Pediatr Neonatol* (2010) , 51 (4), S. 198-207
- [3] FANAROFF, Avroy A. ; STOLL, Barbara J. ; WRIGHT, Linda L. ; CARLO, Waldemar A. ; EHRENKRANZ, Richard A. ; STARK, Ann R. ; BAUER, Charles R. ; DONOVAN, Edward F. ; KORONES, Sheldon B. ; LAPTOOK, Abbot R. ; LEMONS, James A. ; OH, William ; PAPILE, Lu-Ann ; SHANKARAN, Seetha ; STEVENSON, David K. ; TYSON, Jon E. ; POOLE, W. Kenneth: *Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants*. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 196 (2007), Nr. 2, S. 147.e1-8
- [4] FRANZ, Axel R. ; POHLANDT, Frank ; BODE, Harald ; MIHATSCH, Walter A. ; SANDER, Silvia ; KRON, Martina ; STEINMACHER, Jochen: *Intrauterine, early neonatal, and postdischarge growth and neurodevelopmental outcome at 5.4 years in extremely preterm infants after intensive neonatal nutritional support*. In: *PEDIATRICS* 123 (2009), Nr. 1, S. e101-9
- [5] LUCAS, A. ; MORLEY, R. ; ISAACS, E.: *Nutrition and mental development*. In: *Nutrition reviews* 59 (2001), 8 Pt 2, S. S24-32; discussion S32-3
- [6] HAY, Jr. William W.: *Strategies for Feeding the Preterm Infant*. In: *Neonatology* 94 (2008), Nr. 4, S. 245–254
- [7] WRIGHT, A. L. ; HOLBERG, C. J. ; MARTINEZ, F. D. ; MORGAN, W. J. ; TAUSSIG, L. M.: Breast feeding and lower respiratory tract illness in the first year of life. Group Health Medical Associates. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 299 (1989), Nr. 6705, S. 946–949
- [8] HYLANDER, M. A. ; STROBINO, D. M. ; DHANIREDDY, R.: *Human milk feedings and infection among very low birth weight infants*. In: *Pediatrics* 102 (1998), Nr. 3, S. E38
- [9] KRAMER, Michael S. ; ABOUD, Frances ; MIRONOVA, Elena ; VANILOVICH, Irina ; PLATT, Robert W. ; MATUSH, Lidia ; IGUMNOV, Sergei ; FOMBONNE, Eric ; BOGDANOVICH, Natalia ; DUCRUET, Thierry ; COLLET, Jean-Paul ; CHALMERS, Beverley ; HODNETT, Ellen ; DAVIDOVSKY, Sergei ; SKUGAREVSKY, Oleg ; TROFIMOVICH, Oleg ; KOZLOVA, Ludmila ; SHAPIRO, Stanley: *Breastfeeding and child cognitive development: new evidence from a large randomized trial*. In: *Archives of general psychiatry* 65 (2008), Nr. 5, S. 578–584
- [10] LUCAS, A. ; COLE, T. J.: *Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis*. In: *Lancet* 336 (1990), Nr. 8730, S. 1519–1523
- [11] LUCAS, A. ; MORLEY, R. ; COLE, T. J. ; GORE, S. M.: A randomised multicentre study of human milk versus formula and later development in preterm infants. In: *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition* 70 (1994), Nr. 2, S. F141-6

- [12] WEBER, A. ; LOUI, A. ; JOCHUM, F.: Breast milk from mothers of very low birthweight infants: variability in fat and protein content. In: *Acta Paediatr* (2001), Nr. 90 S. 772-775
- [13] NANCY F. BUTTE, Cutberto Garza Carmen A. Johnson E. O'Brian Smith and Buford L. Nichols: *Longitudinal changes in milk composition of mothers deliverin preterm and term infants*. In: *Early Human Development* 1984, Nr. 9, S. 153–162
- [14] JAMES A. LEMONS, Lemuel Moye Daniel Hall and Michael Simmons: Differences in the Composition of Preterm and Term Human Milk during Early Lactation. In: *Pediatric Research* 1982, Nr. 16, S. 113–117
- [15] BAUER, Jacqueline ; GERSS, Joachim: Longitudinal analysis of macronutrients and minerals in human milk produced by mothers of preterm infants. In: *Clinical Nutrition* 30 (2011), Nr. 2, S. 215–220
- [16] SLUSHER, Tina ; HAMPTON, Rebecca ; BODE-THOMAS, Fidelia ; PAM, Sunday ; AKOR, Francis ; MEIER, Paula: Promoting the exclusive feeding of own mother's milk through the use of hindmilk and increased maternal milk volume for hospitalized, low birth weight infants (< 1800 grams) in Nigeria: a feasibility study. In: *Journal of human lactation : official journal of International Lactation Consultant Association* 19 (2003), Nr. 2, S. 191–198
- [17] ZIEGLER, E. E.: Breast-milk fortification. In: *Acta paediatrica* (Oslo, Norway : 1992) 90 (2001), Nr. 7, S. 720–723
- [18] KUSCHEL CA, Harding J. E.: Multicomponent fortified human milk for promoting growth in preterm infants. In: *The Cochrane Collaboration* (2009), Nr. 1, S. 1-44
- [19] CORVAGLIA, Luigi ; ACETI, Arianna ; PAOLETTI, Vittoria ; MARIANI, Elisa ; PATRONO, Daniela ; ANCORA, Gina ; CAPRETTI, Maria Grazia ; FALDELLA, Giacomo: *Standard fortification of preterm human milk fails to meet recommended protein intake: Bedside evaluation by Near-Infrared-Reflectance-Analysis*. In: *Early Human Development* 86 (2010), Nr. 4, S. 237–240
- [20] GOLDMAN, H. I. ; GOLDMAN, J. ; KAUFMAN, I. ; LIEBMAN, O. B.: *Late effects of early dietary protein intake on low-birth-weight infants*. In: *The Journal of pediatrics* 85 (1974), Nr. 6, S. 764–769
- [21] MENJO, Aiko ; MIZUNO, Katsumi ; MURASE, Masahiko ; NISHIDA, Yoshiko ; TAKI, Motohiro ; ITABASHI, Kazuo ; SHIMONO, Tomohiro ; NAMBA, Kazuyoshi: *Bedside analysis of human milk for adjustable nutrition strategy*. In: *Acta Paediatr* 98 (2009), Nr. 2, S. 380–384
- [22] ARSLANOGLU, S. ; MORO, G. E. ; ZIEGLER, E. E.: Adjustable fortification of human milk fed to preterm infants: does it make a difference? In: *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association* 26 (2006), Nr. 10, S. 614–621
- [23] EHRENKRANZ, Richard A. ; DUSICK, Anna M. ; VOHR, Betty R. ; WRIGHT, Linda L. ; WRAGE, Lisa A. ; POOLE, W. Kenneth: Growth in the neonatal intensive care unit influences

neurodevelopmental and growth outcomes of extremely low birth weight infants. In: *Pediatrics* 117 (2006), Nr. 4, S. 1253–1261

[24] AGOSTONI ET AL.: Enteral Nutrient Supply for Preterm Infants: Commentary From the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Committee and Nutrition. In: *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2012, Nr. 50, S. 1–9

[25] VAN DE LAGEMAAT, Monique ; ROTTEVEEL, Joost ; HEIJBOER, Annemieke C. ; LAFEBER, Harrie N. ; VAN WEISSENBRUCH, Mirjam M.: *Growth in preterm infants until six months postterm: the role of insulin and IGF-I*. In: *Hormone research in paediatrics* 80 (2013), Nr. 2, S. 92–99

[26] GLUCKMAN, Peter D. ; PINAL, Catherine S.: *Regulation of fetal growth by the somatotrophic axis*. In: *The Journal of nutrition* 133 (2003), 5 Suppl 2, S. 1741–1746

[27] OLIVER, M. H. ; HARDING, J. E. ; BREIER, B. H. ; EVANS, P. C. ; GLUCKMAN, P. D.: Glucose but not a mixed amino acid infusion regulates plasma insulin-like growth factor-I concentrations in fetal sheep. In: *Pediatric Research* 34 (1993), Nr. 1, S. 62–65

[28] YE, Ping ; D'ERCOLE, A. Joseph: Insulin-like growth factor actions during development of neural stem cells and progenitors in the central nervous system. In: *Journal of neuroscience research* 83 (2006), Nr. 1, S. 1–6

[29] HANSEN-PUPP, Ingrid ; HOVEL, Holger ; HELLSTROM, Ann ; HELLSTROM-WESTAS, Lena ; LOFQVIST, Chatarina ; LARSSON, Elna-Marie ; LAZEYRAS, Francois ; FELLMAN, Vineta ; HUPPI, Petra S. ; LEY, David: *Postnatal decrease in circulating insulin-like growth factor-I and low brain volumes in very preterm infants*. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96 (2011), Nr. 4, S. 1129–1135

[30] HANSEN-PUPP, Ingrid ; LOFQVIST, Chatarina ; POLBERGER, Staffan ; NIKLASSON, Aimon ; FELLMAN, Vineta ; HELLSTROM, Ann ; LEY, David: *Influence of insulin-like growth factor I and nutrition during phases of postnatal growth in very preterm infants*. In: *Pediatric Research* 69 (2011), 5 Pt 1, S. 448–453

[31] HELLSTROM, Ann ; ENGSTROM, Eva ; HARD, Anna-Lena ; ALBERTSSON-WIKLAND, Kerstin ; CARLSSON, Bjorn ; NIKLASSON, Aimon ; LOFQVIST, Chatarina ; SVENSSON, Elisabeth ; HOLM, Sture ; EWALD, Uwe ; HOLMSTROM, Gerd ; SMITH, Lois E. H.: *Postnatal serum insulin-like growth factor I deficiency is associated with retinopathy of prematurity and other complications of premature birth*. In: *PEDIATRICS* 112 (2003), Nr. 5, S. 1016–1020

[32] LOFQVIST, Chatarina ; HELLGREN, Gunnel ; NIKLASSON, Aimon ; ENGSTROM, Eva ; LEY, David ; HANSEN-PUPP, Ingrid: *Low postnatal serum IGF-I levels are associated with bronchopulmonary dysplasia (BPD)*. In: *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)* 101 (2012), Nr. 12, S. 1211–1216

[33] HANSEN-PUPP, Ingrid ; HOVEL, Holger ; LOFQVIST, Chatarina ; HELLSTROM-WESTAS, Lena ; FELLMAN, Vineta ; HUPPI, Petra S. ; HELLSTROM, Ann ; LEY, David: *Circulatory insulin-like growth factor-I and brain volumes in relation to neurodevelopmental outcome in very preterm infants*. In: *Pediatric Research* 74 (2013), Nr. 5, S. 564–569

- [34] MARTOS-MORENO, Gabriel A. ; BARRIOS, Vicente ; SAENZ DE PIPAON, Miguel ; POZO, Jesus ; DORRONSORO, Izaskun ; MARTINEZ-BIARGE, Miriam ; QUERO, Jose ; ARGENTE, Jesus: *Influence of prematurity and growth restriction on the adipokine profile, IGF1, and ghrelin levels in cord blood: relationship with glucose metabolism*. In: *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 161 (2009), Nr. 3, S. 381–389
- [35] ONG, Ken K. ; LANGKAMP, Markus ; RANKE, Michael B. ; WHITEHEAD, Karen ; HUGHES, leuan A. ; ACERINI, Carlo L. ; DUNGER, David B.: *Insulin-like growth factor I concentrations in infancy predict differential gains in body length and adiposity: the Cambridge Baby Growth Study*. In: *The American Journal of Clinical Nutrition* 90 (2009), Nr. 1, S. 156–161
- [36] HERNANDEZ, Maria Isabel ; ROSSEL, Katherine ; PENA, Veronica ; CAVADA, Gabriel ; AVILA, Alejandra ; INIGUEZ, German ; MERICQ, Veronica: *Leptin and IGF-I/II during the first weeks of life determine body composition at 2 years in infants born with very low birth weight*. In: *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* 25 (2012), 9-10, S. 951–955
- [37] PARKINSON, James R. C. ; HYDE, Matthew J. ; GALE, Chris ; SANTHAKUMARAN, Shalini ; MODI, Neena: *Preterm birth and the metabolic syndrome in adult life: a systematic review and meta-analysis*. In: *PEDIATRICS* 131 (2013), Nr. 4, S. e1240-63
- [38] YEUNG, Melinda Y. ; SMYTH, John P.: *Nutritionally regulated hormonal factors in prolonged postnatal growth retardation and its associated adverse neurodevelopmental outcome in extreme prematurity*. In: *Biology of the neonate* 84 (2003), Nr. 1, S. 1–23
- [39] SOCHA, Piotr ; GROTE, Veit ; GRUSZFELD, Dariusz ; JANAS, Roman ; DEMMELMAIR, Hans ; CLOSA-MONASTEROLO, Ricardo ; SUBIAS, Joaquin Escribano ; SCAGLIONI, Silvia ; VERDUCI, Elvira ; DAIN, Elena ; LANGHENDRIES, Jean-Paul ; PERRIN, Emmanuel ; KOLETZKO, Berthold: *Milk protein intake, the metabolic-endocrine response, and growth in infancy: data from a randomized clinical trial*. In: *The American Journal of Clinical Nutrition* 94 (2011), 6 Suppl, S. 1776–1784
- [40] PATEL, Leena ; CAVAZZONI, Elena ; WHATMORE, Andrew J. ; CARNEY, Sally ; WALES, Jeremy K. ; CLAYTON, Peter E. ; GIBSON, Alan T.: *The contributions of plasma IGF-I, IGFBP-3 and leptin to growth in extremely premature infants during the first two years*. In: *Pediatric Research* 61 (2007), Nr. 1, S. 99–104
- [41] WOODS, K. A. ; CAMACHO-HUBNER, C. ; SAVAGE, M. O. ; CLARK, A. J.: *Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene*. In: *The New England journal of medicine* 335 (1996), Nr. 18, S. 1363–1367
- [42] JOBE, A. H. ; BANCALARI, E.: *Bronchopulmonary dysplasia*. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 163 (2001), Nr. 7, S. 1723–1729
- [43] ENGSTROM, Eva ; NIKLASSON, Aimon ; WIKLAND, Kerstin Albertsson ; EWALD, Uwe ; HELLSTROM, Ann: *The role of maternal factors, postnatal nutrition, weight gain, and gender in regulation of serum IGF-I among preterm infants*. In: *Pediatric Research* 57 (2005), Nr. 4, S. 605–610

- [44] SMITH, W. J. ; UNDERWOOD, L. E. ; KEYES, L. ; CLEMMONS, D. R.: Use of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein measurements to monitor feeding of premature infants. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82 (1997), Nr. 12, S. 3982–3988
- [45] PRICE, W. A. ; LEE, E. ; MAYNOR, A. ; STILES, A. D. ; CLEMMONS, D. R.: Relation between serum insulinlike growth factor-1, insulinlike growth factor binding protein-2, and insulinlike growth factor binding protein-3 and nutritional intake in premature infants with bronchopulmonary dysplasia. In: *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 32 (2001), Nr. 5, S. 542–549
- [46] ZHANG, Shulian ; ZHAI, Guanpeng ; WANG, Jin ; SHI, Wenjing ; ZHANG, Rong ; CHEN, Chao: *IGF-II expression and methylation in small for gestational age infants*. In: *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* 28 (2015), 5-6, S. 613–618
- [47] BUTLER, A. A. ; LEROITH, D.: Minireview: tissue-specific versus generalized gene targeting of the *igf1* and *igf1r* genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. In: *Endocrinology* 142 (2001), Nr. 5, S. 1685–1688
- [48] DIAZ-GOMEZ, N. M. ; DOMENECH, E. ; BARROSO, F.: Breast-feeding and growth factors in preterm newborn infants. In: *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 24 (1997), Nr. 3, S. 322–327
- [49] BARRIOS, V. ; ARGENTE, J. ; POZO, J. ; HERVAS, F. ; MUNOZ, M. T. ; SANCHEZ, J. I. ; HERNANDEZ, M.: Insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding proteins, and growth hormone binding protein in Spanish premature and full-term newborns. In: *Hormone research* 46 (1996), Nr. 3, S. 130–137
- [50] DIAZ-GOMEZ, N. M. ; DOMENECH MARTINEZ, E. ; BARROSO GUERRERO, F. ; CORTABARRIA BAYONA, C. ; RICO SEVILLANO, J.: *Influence of growth hormone (GH) and nutrition on neonatal growth*. In: *Anales espanoles de pediatria* 46 (1997), Nr. 1, S. 41–46
- [51] KALHAN, S. C. ; IBEN, S.: Protein metabolism in the extremely low-birth weight infant. In: *Clinics in perinatology* 27 (2000), Nr. 1, S. 23–56
- [52] WEBER A, A. LOUI F. JOCHUM C. BÜHRER AND M. OBLADEN: Breast milk from mothers of very low birthweight infants: variability in fat and protein content. In: *Acta Paediatrica* 2001, Nr. 90, S. 772–775
- [53] ISAACS, Elizabeth B. ; GADIAN, David G. ; SABATINI, Stuart ; CHONG, Wui K. ; QUINN, Brian T. ; FISCHL, Bruce R. ; LUCAS, Alan: *The effect of early human diet on caudate volumes and IQ*. In: *Pediatric research* 63 (2008), Nr. 3, S. 308–314
- [54] HAY, W. W.: Optimizing protein intake in preterm infants. In: *Journal of Perinatology* 29 (2009), Nr. 7, S. 465–466

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Universitätskinderklinik für Neonatologie unter Betreuung von Prof. Dr. Axel Franz durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. Axel Franz, Oberarzt und Dr. Christoph Maas, Facharzt.

Sämtliche Messungen (Muttermilchanalysen, Knemometrien, Messung der Länge im Stadiometer, Messung der Hautfältendicke, Messung vom Kopfumfang bei Entlassung, Versorgung der Blutproben, Berechnung der Gewichtsanalysen) wurden nach Einarbeitung durch Dr. Christoph Maas von mir in Zusammenarbeit mit Michaela Mathes und Julia Vek durchgeführt.

Die Verordnung der Supplementmenge erfolgte durch Dr. Christoph Maas, Prof. Dr. Franz oder Dr. Cornelia Wiechers.

Die tägliche Messung des Körpergewichts der Probanden erfolgte durch die Pflegekräfte der neonatologischen Stationen.

Die Radioimmunassays zur Bestimmung von IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-3 und des Wachstumshormons erfolgten im Hormonlabor der Kinderklinik Tübingen durch Karin Weber.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Dr. Christoph Maas durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Stuttgart, den 22.10.2016

Christine Bleeker

Danksagung

Prof. Dr. Axel Franz danke ich für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und für die Möglichkeit an einer spannenden Studie mitzuarbeiten und so das wissenschaftliche Arbeiten kennenzulernen.

Dr. Christoph Maas danke ich für die kontinuierliche und immer zielgerichtete Betreuung bei der Arbeit an der Studie. Seine wertvollen Anregungen und Ratschläge habe ich immer geschätzt.

Prof. Dr. Christian Poets danke ich für die Möglichkeit in seiner Abteilung für Neonatologie diese interessante Studie durchführen zu können.

Mein ganz besonderer Dank gilt Michaela Mathes und Julia Vek für die immer angenehme Atmosphäre und die produktive Zusammenarbeit im Rahmen unserer Studie.

Prof. Dr. Gerhard Binder und Karin Weber vom Hormonlabor der Kinderklinik Tübingen danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Bestimmung der Wachstumsfaktoren und ihrer Bindungsproteine.

Ich möchte mich von Herzen bei allen Pflegekräften auf den Stationen Neo 1, Neo 2 und Neo 3 bedanken, nur durch ihre großartigen Kooperation war es möglich die Messungen an unseren kleinen Probanden vorzunehmen. Durch die Verabreichung der Nahrung an die Frühgeborenen waren sie ein zentraler Teil unserer Studie.

Lebenslauf

Persönliche_Daten

Name:	Bleeker
Vorname:	Christine
Geburtsdatum, -ort:	06.11.1983 in Hannover
Familienstand:	Ledig, keine Kinder
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Bildung

22/05/2015	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
05/2014- 04/2015	Praktisches Jahr am Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart, in den Fächern: Gynäkologie, Chirurgie und Innere Medizin
10/04/2014	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
09/2011- heute	Promotion in der Neonatologie der Universitätskinderklinik Tübingen, Klinische Studie zum Thema: Einfluss einer höheren Eiweißzufuhr auf Serum-Wachstumsfaktoren und ihre Bindungsproteine bei unreifen Frühgeborenen
06/04/2011	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/2009- 05/2015	Studium der Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität Tübingen
10/2004- 10/2007	Ausbildung zur Gesundheits- und Kinderkrankenpflegerin am Olgahospital in Stuttgart
06/2003	Abitur am Käthe-Kollwitz Gymnasium in Hannover

Beruflicher Werdegang

Seit 08/2015	Tätigkeit als Assistenzärztin im Robert Bosch-Krankenhaus in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe
08/2009 -05/2014	Beschäftigung als Gesundheits- und Kinderkrankenpflegerin an der Universitätskinderklinik Tübingen in Teilzeit (30%) mit dem Schwerpunkt Kinderhämatologie/-onkologie
10/2007- 04/2009	Beschäftigung als Gesundheits- und Kinderkrankenpflegerin im Olgahospital Stuttgart in der Kinderchirurgisch- Orthopädischen Ambulanz
09/2003-09/2004	Au-pair –Aufenthalt in Edinburgh, Schottland

Stuttgart, den 22.10.2016