

Aus der
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Direktor: Prof. Dr. Rolf Felix Maier
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



Entwicklung des circadianen und ultradianen Biorhythmus bei Frühgeborenen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Franziska Dorn
aus Leipzig

Marburg/Lahn, 2017

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

Am 13.06.2017

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. med. R. F. Maier

1. Korreferent: Prof. Dr. med. M. Kühnert

Im Rhythmus des Lebens

Für

meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
<hr/>	
1.1 Definition der Chronobiologie	1
1.1.1 Terminologie der Chronobiologie	4
1.2 Anatomische Strukturen	5
1.3 Physiologische Funktion des Hormons Cortisol	6
1.3.1 Der Einfluss von Cortisol prä- und postnatal	7
1.4 Frühgeborene	8
1.4.1 Inzidenz und Ursachen der Frühgeburt	8
1.5 Entwicklung des Tag-Nacht-Rhythmus bei Frühgeborenen	10
1.6 Zielsetzung und Fragestellungen der Arbeit	11
Patienten und Methodik	12
<hr/>	
2.1 Studiendesign	12
2.2 Patienten	12
2.2.1 Einschlusskriterien	12
2.2.2 Ausschlusskriterien	12
2.2.3 Abbruchkriterien	13
2.2.4 Randomisierungsverfahren	13
2.3 Studienaufbau	14
2.3.1 Beschreibung der teilnehmenden Stationen	14
2.3.2 Erfassung des Cortisol-Profiles und Aktivitäts-/Ruheverhaltens	14
2.4 Material und Methodik	15
2.4.1 Datenerfassungsbogen	15
2.4.2 Speichelprobenentnahme	15
2.4.3 Bestimmung der Cortisolkonzentration	17
2.4.4 Aktographie	19
2.4.5 Messung der Lichtverhältnisse	20
2.5 Statistische Analyse	21
2.5.1 Datenverarbeitung	21
2.5.2 Auswertung mit Hilfe des linearen gemischten Modells	21
2.5.3 Rhythmusanalyse der Parameter Cortisol und Aktivität	23
2.5.4 Analyse des Aktivitäts-/Ruheverhaltens	23
2.5.5 Interaktionseffekte	24

Ergebnisse	25
3.1 Das Patientenkollektiv	25
3.1.1 Deskriptive Charakteristika der Patienten	27
3.2 Lichtverhältnisse	28
3.3 Die Cortisolkonzentration im Speichel	29
3.3.1 Deskriptive Statistik	29
3.3.2 Rhythmusanalyse	30
3.3.3 Vergleich der Cortisolkonzentration im Speichel zwischen den Studientagen	31
3.3.4 Vergleich der Tag- und Nachtcortisolkonzentration im Speichel	33
3.3.5 Untersuchung von Interaktionseffekten	35
3.4 Das Aktivitäts-/Ruheverhalten	36
3.4.1 Rhythmusanalyse	36
3.4.2 Ergebnisse der Aktivitätsanalyse anhand des ActiLife Scores	39
3.4.3 Die Entwicklung des Schlafverhaltens	42
3.4.4 Untersuchung der Interaktionseffekte	43
Diskussion	44
4.1 Stand der Wissenschaft	44
4.2 Charakteristik des Patientenkollektivs	45
4.3 Diskussion der Methodik	46
4.3.1 Bestimmung der Cortisolkonzentration im Speichel	46
4.3.2 Erfassung des Aktivitäts-/Ruheverhaltens	48
4.4 Diskussion der Ergebnisse	49
4.4.1 Rhythmusanalyse des Hormons Cortisol	49
4.4.2 Die Tag-/Nachtcortisolkonzentration	50
4.4.3 Einflussfaktoren auf die Cortisolkonzentration	52
4.4.4 Rhythmusanalyse der Aktivität	53
4.4.5 Betrachtung des Aktivitäts-/Ruheverhaltens	55
4.5 Limitierende Faktoren der vorliegenden Studie	57
4.6 Stärken der vorliegenden Studie	57
4.7 Schlussfolgerungen	59
Zusammenfassung	60
Summary	62
Literaturverzeichnis	64

Abbildungsverzeichnis	72
Tabellenverzeichnis	73
Abkürzungsverzeichnis	74
Anhang	75
11.1 Formelle Bemerkung	75
11.2 Tabellarische Darstellung der Rhythmusanalyse	75
11.3 Aufklärungsbogen	79
11.4 Einverständniserklärung	81
11.5 Ehrenwörtliche Erklärung	82
11.6 Verzeichnis der akademischen Lehrer	83
11.7 Danksagung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Publikationen und Präsentationen	84

Einleitung

Der rhythmische Wechsel von Tag und Nacht, die saisonalen Licht- und Temperaturunterschiede, die Mondphasen und die Jahreszeiten beeinflussen viele Organismen dieser Erde in ihrer evolutiven Entwicklung. Das Leben auf dieser Erde wäre ohne eine Anpassung an diese zyklische und rhythmische Ordnung nicht denkbar. Biologische Rhythmen beschreiben regelmäßig sich wiederholende Muster und Veränderungen in Organismen, die von Prokaryonten bis hin zu komplexen Organismen des Pflanzen- und Tierreiches und des Menschen reichen. Auch beim Menschen unterliegen z.B. die Hormonsekretion, der Schlaf-Wach-Rhythmus oder die Körpertemperatur zyklischen Veränderungen. Die Bedeutung der biologischen Rhythmen in Bezug zur Humanmedizin stellte bereits Julien-Joseph Virey im Jahre 1814 in seiner Dissertationsarbeit dar (Virey, 1814). Virey beschrieb erstmals, dass Arzneimittel wie Hypnotika, Narkotika und Opiate je nach Applikationszeitpunkt innerhalb eines Tages in ihrer Wirkung variierten (Reinberg et al., 2001). Die Korrelation zwischen tagesperiodischen Schwankungen hormoneller und physiologischer Parameter und dem gesundheitlichen Befinden von Patienten gewann in den letzten Jahren immer mehr an Beachtung. Verschiedene Untersuchungen wiesen eine Beeinträchtigung oder Aufhebung physiologischer Rhythmen bei Patienten mit Diabetes, malignen Erkrankungen, Schlafstörungen oder intensivmedizinischer Behandlung nach (Hastings et al., 2003; Knutsson, 2003; Takahashi et al., 2008). Die biologischen Rhythmen wurden bei Erwachsenen in den letzten Jahren bereits eingehend studiert (Reinberg et al., 1971; Wever, 1979). Zur Reifung der circadianen Rhythmik bei Frühgeborenen liegen in der Literatur bisher nur wenige und teilweise unterschiedliche Ergebnisse vor (Weerth et al., 2003b).

1.1 Definition der Chronobiologie

Die Wissenschaft der biologischen Rhythmen wird als Chronobiologie (von griech. *Chronos* = *Zeit*) bezeichnet. Sie versucht mit wissenschaftlichen und molekularbiologischen Methoden die zeitliche Organisation physiologischer Abläufe in Organismen zu beobachten und zu analysieren. Biologische Rhythmen werden anhand der Periodendauer (τ) eingeteilt, welche das zeitliche Intervall bis zum Durchlaufen eines kompletten Zyklus beschreibt. Die Periodendauer einer endogenen Tagesrhythmik

wird nach einem Vorschlag von Halberg als *circadian* (lat.: circa (zeitl.) = etwa, ungefähr; dies = Tag) definiert (Halberg, 1963). Die Periodenlänge eines circadianen Rhythmus beträgt durchschnittlich 24 Stunden und kann zwischen 22 und 28 Stunden variieren. Die Wissenschaftler Aschoff, von Bünning und von Pittendrigh entdeckten, dass die circadiane Rhythmik von Menschen und Tieren durch endogene Oszillatoren (Schrittmacher) reguliert wird (Aschoff, 1967; von Pittendrigh, 1967). Oszillatoren stellen Moleküle, Zellen oder Gewebe dar, die einen Rhythmus generieren. Die Schrittmacher steuern wie eine Zentrale die Rhythmik vieler peripherer Prozesse. Durch externe „Zeitgeber“ der Umwelt wie Licht und Dunkelheit, Körpertemperatur, Nahrungsaufnahme, körperliche Aktivität und soziale Kontakte lassen sich die biologischen Rhythmen mit der Außenwelt synchronisieren (Aschoff, 1967; Pittendrigh, 1967). Dennoch bleibt auch bei Abwesenheit der externen Zeitgeber ein endogener Rhythmus bestehen (Aschoff, 1994). Unter konstant gehaltenen Bedingungen der Umwelt, durch Isolationsexperimente in Bunkern und Höhlen, konnte bei Menschen und Tieren ein „freilaufender Rhythmus“ mit einer graduellen Verschiebung der Periodenlänge in Richtung 25 Stunden beobachtet werden (Aschoff, 1994) (Abbildung 2).

Durch die circadiane Tag-Nacht-Rhythmik wird beim Menschen am Abend durch eine abfallende Körpertemperatur und eine zunehmende Sekretion des Hormons Melatonin der Schlafzyklus eingeleitet. Während des Schlafes werden Wachstumshormone und Prolactin ausgeschüttet und regenerative und anabole Prozesse in den Körperzellen aktiviert. Der Anstieg des Hormons Cortisol am Morgen wirkt mobilisierend auf Körperzellen und Organe. Das Peptidhormon Gastrin und das Sexualhormon Testosteron erreichen am Nachmittag ihre maximale Konzentration (Hastings, 1991; Koukkari & Sothorn, 2006).

Neben dem circadianen Rhythmus existieren biologische Rhythmen mit einer kürzeren Periodendauer (< 20 Stunden), *ultradianer Rhythmus*, und mit einer längeren Periodendauer (> 28 Stunden), *infradianer Rhythmus* (Koukkari & Sothorn, 2006). Ultradiane Rhythmen bestehen aus einer Frequenz, die von Millisekunden (z.B. neuronale Entladungen), über Sekunden (z.B. Herzfrequenz, Wellen der elektrischen Aktivität des Gehirns), über Minuten (z.B. Atemfrequenz), bis zu Stunden (z.B. pulsatile Hormonfreisetzung) reichen (Lemmer, 2012). Infradiane Rhythmen werden

unter anderem beim Menstruationszyklus (circamensueller Rhythmus) oder beim saisonalen Fellwechsel von Tieren oder dem jährlichen Wachstum von Pflanzen (circaannuale Rhythmen) beobachtet (Lemmer, 2012) (Abbildung 1).

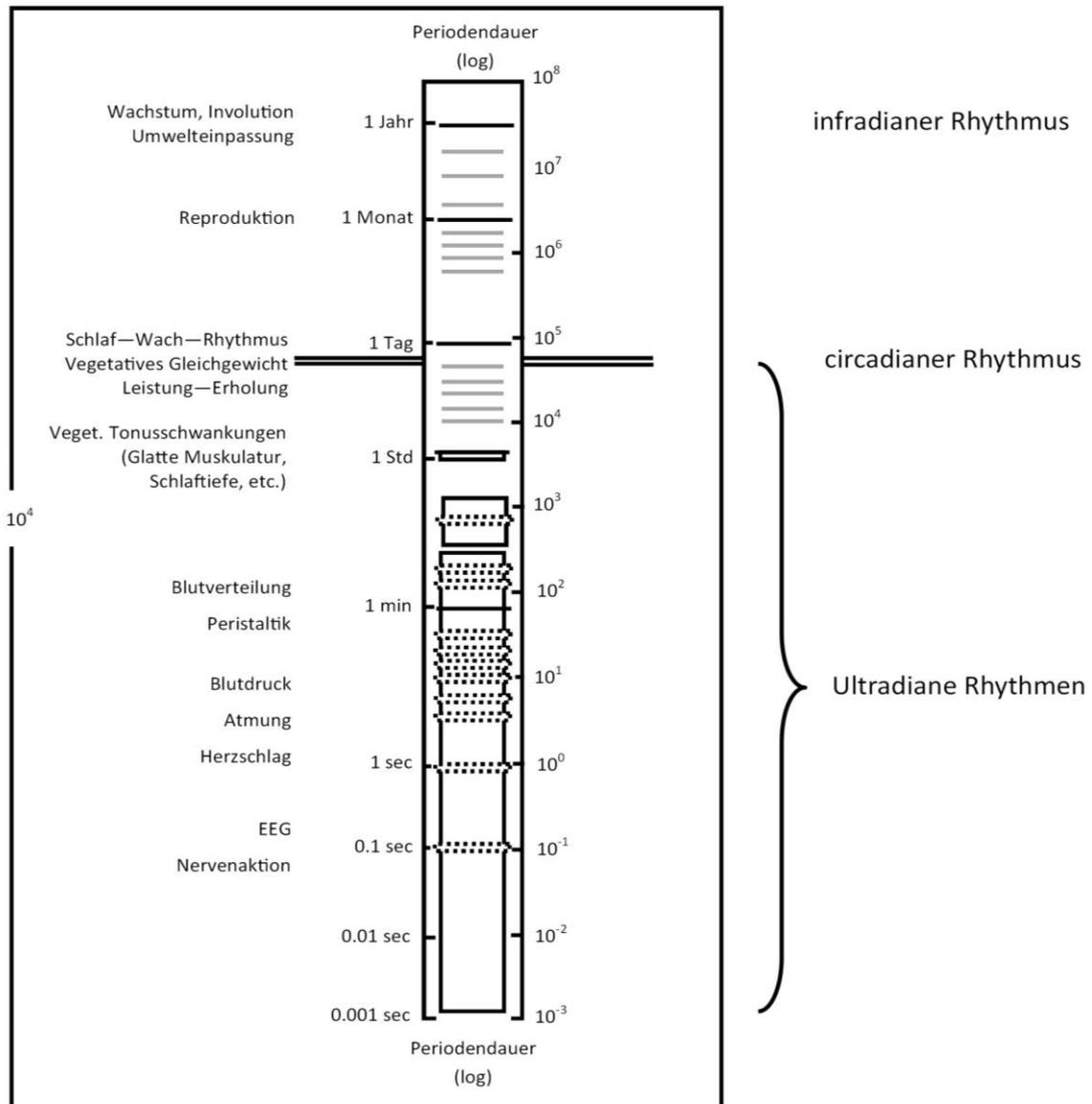


Abbildung 1: Biologische Rhythmen

Darstellung ultradianer Rhythmen (< 20 h), circadianer Rhythmen (ca. 24 h) und infradianer Rhythmen (> 28 h) in biologischen Systemen (nach Lemmer, 2012).

1.1.1 Terminologie der Chronobiologie

Biologische Rhythmen werden mathematisch durch die Periodendauer (τ), die Amplitude, den Mesor und die Phase beschrieben (Abbildung 2). Die Amplitude stellt die Differenz zwischen der maximalen oder minimalen Auslenkung z.B. einer Cosinusfunktion bis zum Mittelwert der Funktion dar. Unter dem Mesor wird der geschätzte Mittelwert des Rhythmus verstanden. Die Phase bezeichnet die zeitliche Lage eines beliebigen Punktes auf der Rhythmuskurve (z.B. Peak = Maximum). Viele biologische Rhythmen besitzen keine reine Cosinusfunktion, weshalb häufig mehrere Oberschwingungen an die Daten angepasst werden müssen (Lemmer, 2012).

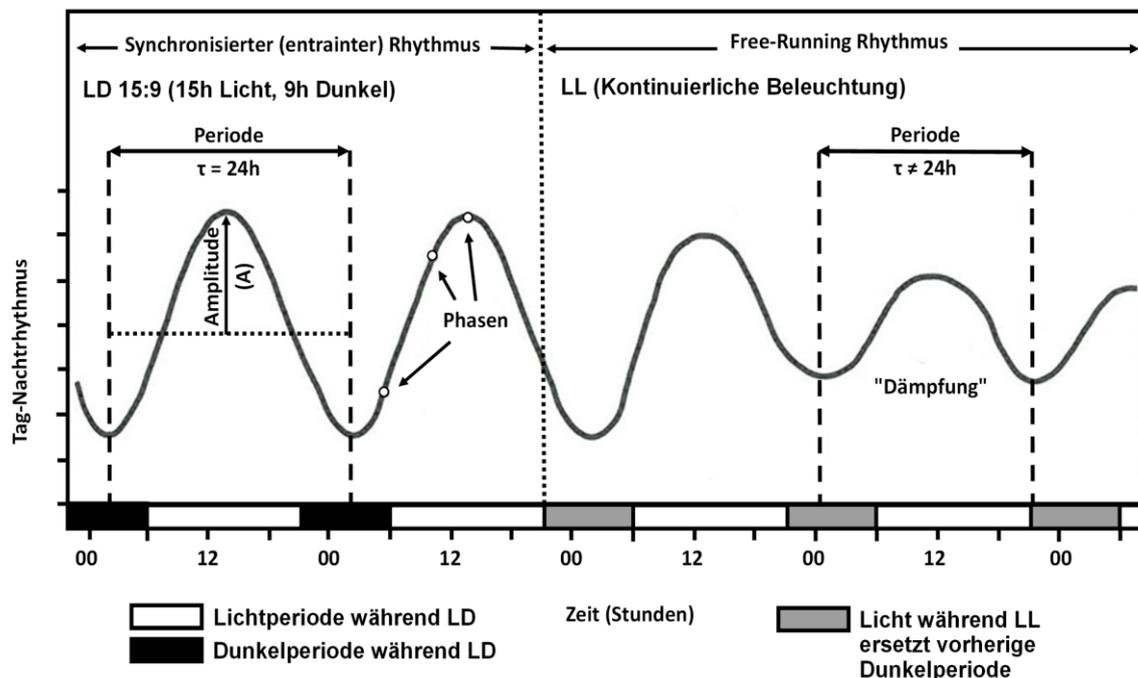


Abbildung 2: Terminologie der Chronobiologie

Die Periodendauer (τ), Amplitude und Phase werden anhand einer Rhythmuskurve dargestellt. Circadianer Rhythmus unter Hell-Dunkel Bedingungen (LD = Licht-Dunkel) und freilaufender Rhythmus mit Verlust der 24 Stunden-Periodik unter konstanter Beleuchtung (LL = kontinuierliche Beleuchtung) (nach Koukkari & Sothorn, 2006).

1.2 Anatomische Strukturen

Bei Einzellern wie Prokaryonten und Cyanobakterien reguliert jede Zelle unabhängig von anderen Zellen ihren an die Umwelt angepassten biologischen Rhythmus. Bei Säugetieren dagegen werden die tageszeitlichen Rhythmen (z.B. Cortisolsekretion, Körpertemperatur) von einem übergeordneten Impulsgeber koordiniert. Dieser sogenannte Hauptschrittmacher besteht aus etwa 20000 Neuronen im zentralen Nervensystem, unterhalb des dritten Ventrikels im vorderen Hypothalamus, dem *Nucleus suprachiasmaticus (SCN)*. Die suprachiasmatischen Nuclei sind paarig links und rechts des dritten Ventrikels angelegt und liegen oberhalb der Kreuzung der beiden Sehnerven (*Chiasma opticum*) (Weaver, 1998) (Abbildung 3).

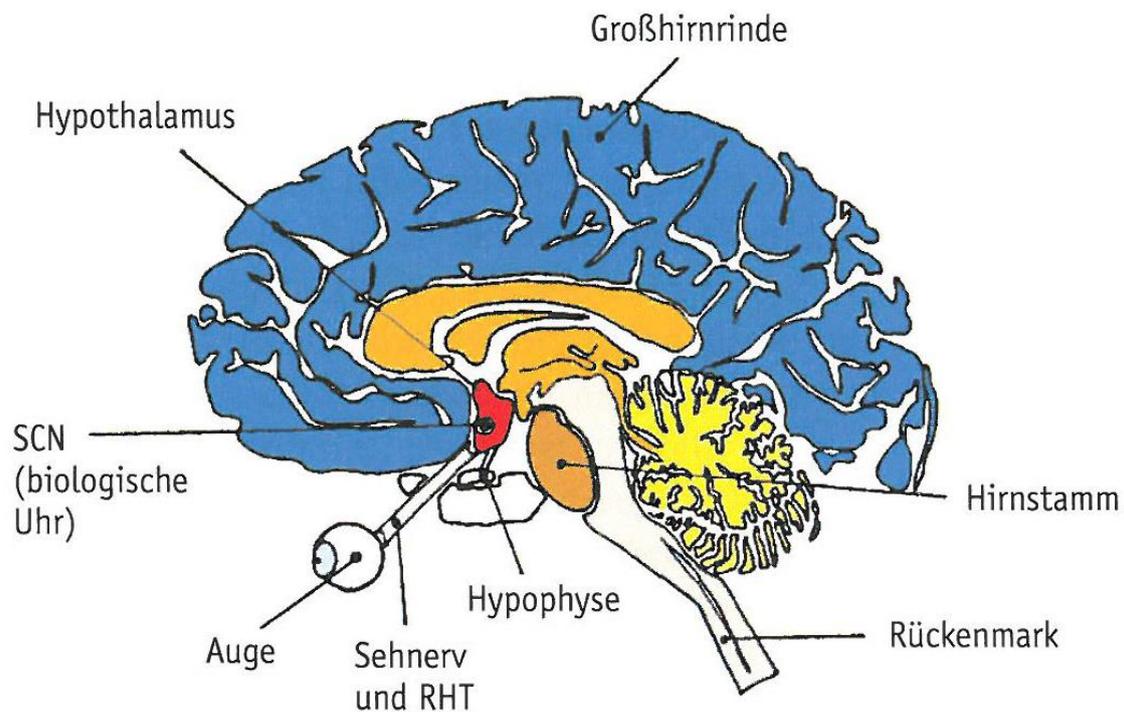


Abbildung 3: Lokalisation des suprachiasmatischen Nucleus (SCN)

Der suprachiasmatische Nucleus (SCN) ist im Hypothalamus am Boden des dritten Ventrikels lokalisiert. Er erhält Signale von der Retina über den retinohypothalamischen Trakt (RHT) (nach Lemmer, 2012).

Experimentelle Untersuchungen an Mäusen veranschaulichten, dass der circadiane Aktivitäts-Schlaf-Rhythmus (Stephan & Zucker, 1972) und der Cortisolrhythmus nach einer Entfernung des SCN verloren gingen (Moore & Eichler, 1972). Untersuchungen an der Taufliege, *Drosophila melanogaster*, demonstrierten erstmals die molekulargenetische Funktionsweise der circadianen Uhr (Konopka & Benzer, 1971). Die periodische Expression einzelner Gene und Transkriptionsfaktoren reguliert die rhythmischen Veränderungen der elektrischen Aktivität der SCN-Neurone (Weaver, 1998). Um die Aktivität der SCN-Neurone an die täglichen Tag-Nacht-Schwankungen anzupassen, empfangen die suprachiasmatischen Kerne Lichtsignale über den retinohypothalamischen Trakt. Diese neuronalen Verbindungen führen von der Retina (Netzhaut des Auges) bis zum SCN (Welsh et al., 2010). Einer der wirksamsten Zeitgeber ist somit das Licht, welches den Tag-Nacht-Rhythmus entscheidend beeinflusst. Durch den SCN werden wiederum die Organe des Hormonsystems Hypothalamus, Hypophyse, Schilddrüse und Nebennierenrinde in der Aktivität ihrer Hormonproduktion und -sekretion gesteuert. Viele periphere Organe und Zellen besitzen aber auch die Fähigkeit einem eigenständigen endogenen Rhythmus zu folgen und weichen bis zu vier Stunden vom Rhythmus des SCN ab (Balsalobre, 2002).

1.3 Physiologische Funktion des Hormons Cortisol

Das Hormon Cortisol ist ein Steroidhormon und leitet sich, wie alle Steroidhormone (Glucocorticoide, Mineralocorticoide, Androgene, Östrogene, Gestagene), von der Ausgangssubstanz Cholesterin ab. Cortisol gehört zu der Klasse der Glucocorticoide und besteht aus einem Kohlenstoff-Gerüst von 21 C-Atomen (Rassow, 2012). Die Biosynthese der Glucocorticoide wird über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse reguliert. Der Hypothalamus aktiviert über das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) und das Antidiuretische Hormon (ADH) die Ausschüttung des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH) aus der Hypophyse. ACTH bewirkt wiederum die Synthese und Produktion des Hormons Cortisol in der *Zona fasciculata* der Nebennierenrinde. Das Hormon Cortisol kann durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus seine eigene Biosynthese über die Hemmung des Hypothalamus und der Hypophyse regulieren (Rassow, 2012). Die Cortisolkonzentration im Plasma unterliegt einer circadianen Rhythmik. Die höchste

Konzentration des Cortisols lässt sich beim Erwachsenen unter stressfreien Bedingungen am Morgen nachweisen und reduziert sich zum Abend hin. In Stresssituationen und den Körper belastenden Situationen kann die Ausschüttung von Cortisol bis auf das Zehnfache vermehrt werden, wodurch auch die circadiane Rhythmik maskiert werden kann (Reincke et al., 1995).

Die primäre Stoffwechselwirkung von Cortisol bezieht sich auf die Mobilisierung von Energiereserven durch die Förderung der Gluconeogenese in der Leber und der Hemmung der Glucoseverwertung, welche zu einer Erhöhung des Blutzuckerspiegels im Blut führen. Cortisol fördert weiterhin die lipolytische Freisetzung freier Fettsäuren aus dem Fettgewebe und den Proteinabbau (McMahon et al., 1988). In höheren Konzentrationen führt Cortisol zur Unterdrückung immunologischer und entzündlicher Vorgänge und aktiviert durch eine verstärkende Wirkung auf Katecholamine das Herz-Kreis-Lauf-System (Herzfrequenz, Blutdruck) (Behrends et al., 2012). Der therapeutische Einsatz synthetischer Cortisolderivate nutzt unter anderem diese antiinflammatorische Wirkung, um überschießende Entzündungsreaktionen des Organismus zu regulieren (Behrends et al., 2012).

1.3.1 Der Einfluss von Cortisol prä- und postnatal

In der Fetalperiode fördert Cortisol die Reifung der Organe (z.B. Lunge und Niere), die Reifung des Herz-Kreislaufsystems und des Immunsystems (Liggins, 1994). Eine besondere Rolle kommt Cortisol bei der Aktivierung von Surfactant in der fetalen Lunge im letzten Schwangerschaftstrimenon zu. Diese körpereigene Substanz verhindert durch eine Reduzierung der Oberflächenspannung in den Alveolen, dass die Lungenbläschen am Ende der Ausatmung kollabieren. Bis 34 Schwangerschaftswochen (SSW) weist die fetale Lunge noch keine ausreichende Menge an Surfactant auf, um eine ausreichende Belüftung der Lunge nach der Geburt zu gewährleisten (Gross, 1990). Auch das Hormon Cortisol konnte im Blutserum bei Feten bis zum letzten Schwangerschaftstrimenon nur in niedrigen Konzentrationen nachgewiesen werden (Ng, 2000). Vor der Geburt eines reifen Kindes erhöht sich die Cortisolkonzentration, um die Surfactant-Bildung zu stimulieren und die fetalen Organe auf das extrauterine Leben vorzubereiten (Ng, 2000). Schwangere Frauen mit drohender Frühgeburt erhalten pränatal Glucocorticoide, um die Lungenreifung beim Feten zu beschleunigen und so

die Ausbildung eines Atemnotsyndroms bei Frühgeborenen zu verhindern (Bolt et al., 2001; Waffarn & Davis, 2012).

Bei Frühgeborenen variierten die Cortisolkonzentrationen im Blutserum nach der Geburt von 20–680 nmol/L (0,7–24,6 µg/dL) mit einem Mittelwert \pm SD von $125,4 \pm 107$ nmol/L ($4,5 \pm 3,9$ µg/dl) (Greaves et al., 2015; Al Saedi et al., 1995).

1.4 Frühgeborene

Das Gestationsalter eines Fetus wird vom 1. Tag der letzten Menstruationsblutung bis zur Geburt bestimmt. Die rechnerische Genauigkeit dieses Berechnungsverfahrens beträgt \pm 2 Wochen (Maier & Obladen, 2011). Nach der 1986 revidierten WHO-Klassifikation (World Health Organization) werden Kinder als Frühgeborene bezeichnet, wenn sie vor der Vollendung von 37 Schwangerschaftswochen (SSW) post menstruationem (p.m.), d.h. weniger als 259 Tagen p.m. geboren werden. Kommt ein Kind nach vollendeten 37 und vor vollendeten 42 SSW (259-293 Tage) zur Welt, wird es als reifes Neugeborenes und ab 42+0 SSW (>293 Tage) als übertragendes Neugeborenes bezeichnet (Maier & Obladen, 2011).

Neben der Reife wird bei Neugeborenen außerdem nach dem Geburtsgewicht unterschieden. Untergewichtige Neugeborene („low birth weight infants“, LBW) sind Kinder mit einem Geburtsgewicht <2500g. Abhängig von Region und Ethnie sind 5-15% der Lebendgeborenen betroffen. Als sehr untergewichtige Neugeborene („very low birth weight infants“, VLBW) werden Neugeborene mit einem Geburtsgewicht <1500g (0,8–5% der Lebendgeborenen) bezeichnet. Extrem untergewichtige Neugeborene („extremely low birth weight infants“, ELBW) wiegen <1000g und machen 0,3–0,6% der Lebendgeborenen aus (Maier & Obladen, 2011). Liegt das Geburtsgewicht unterhalb der 10. Perzentile bezogen auf das Gestationsalter, spricht man von hypotrophen Neugeborenen oder Small-for-Gestational-Age-Infants (SGA-Kinder). Neugeborene mit einem Gewicht über der 90. Perzentile werden als makrosome oder Large-for-Gestational-Age-Infants (LGA-Kinder) bezeichnet (Maier & Obladen, 2011).

1.4.1 Inzidenz und Ursachen der Frühgeburt

In einer internationalen Datenerfassung aus 184 Ländern konnte eine weltweite Frühgeburtenrate von 11,1% (Streuung: 9,1-13,4%) für 2010 berechnet werden, welches einer Anzahl von 14,9 Millionen (Streuung: 12,3-18,1 Millionen) Frühgeborenen 2010

entsprach (Blencowe et al., 2012). Die Frühgeburtenrate variierte stark zwischen den einzelnen Ländern, so wiesen die nordeuropäischen Länder mit 5% die niedrigste Frühgeburtenrate auf. Die höchste Rate an Frühgeburten befand sich in Südostasien (13,5%), Südasien (13,3%) und in den subsaharischen Ländern Afrikas (12,3%) (Blencowe et al., 2012). Die Rate an Frühgeburten ist in allen erfassten Ländern bis auf in drei Ländern (Kroatien, Ecuador, Estland) in den letzten 20 Jahren gestiegen oder stabil geblieben. Der Anstieg der Frühgeburtenrate kann in einigen Ländern möglicherweise auf eine präzisere Datenerfassung in den letzten 20 Jahren zurückzuführen sein (Blencowe et al., 2012; Howson et al., 2012). In den Industrieländern konnte ein Zusammenhang zwischen der angestiegenen Frühgeburtenrate und dem höheren Alter der Frauen bei Erstschwangerschaft gefunden werden. Studien belegten eine lineare Korrelation zwischen zunehmendem Alter der Mutter (> 35 Jahre) und dem Risiko einer Frühgeburt (Shapiro-Mendoza & Lackritz, 2012). In den letzten Jahren konnte zudem durch die Zunahme der Fruchtbarkeitsbehandlungen in den Industrieländern eine steigende Anzahl der Mehrlingsschwangerschaften beobachtet werden. Etwa 10% aller Frühgeburten gingen aus Mehrlingsschwangerschaften hervor (Blondel & Kaminski, 2002; Euro-Peristat Project, 2015). Ungünstige sozioökonomische Lebensbedingungen oder ein schlechter Gesundheitszustand (z.B. Bluthochdruck, Diabetes, Über- oder Untergewicht) stellen weitere Risikofaktoren für eine Frühgeburt dar (Mortensen, 2013; Heaman et al., 2013). Im Rahmen des *European Perinatal Health Report* konnte in den letzten Jahren ein Rückgang der Sterblichkeit von frühgeborenen Kindern ermittelt werden. Unter anderem wurde dies durch die technischen und qualitativen Fortschritte in der Versorgung von frühgeborenen Kindern erreicht (Euro-Peristat Project, 2015). Dennoch sind Frühgeborene im Vergleich zu reifgeborenen Kindern sowohl kurz- als auch langfristig einem erhöhten Risiko für gesundheitliche Komplikationen ausgesetzt. Frühgeborene mit einem Gestationsalter ≤ 32 SSW besitzen deswegen immer noch ein 10-fach höheres Risiko an perinatalen Komplikationen zu versterben als reifgeborene Kinder (Schleußner, 2013).

1.5 Entwicklung des Tag-Nacht-Rhythmus bei Frühgeborenen

Die Entwicklung circadianer Muster der physiologischen und hormonellen Parameter (Hormonsekretion, Körpertemperatur, Herzfrequenz) sowie des Schlaf-Wach-Rhythmus sind für die körperliche und gesundheitliche Reifung frühgeborener wie reifgeborener Kinder von großer Bedeutung (Rivkees, 2003; Street et al., 2012). Circadiane Rhythmen der physiologischen und hormonellen Parameter lassen sich bereits bei Feten beobachten (Mirmiran & Kok, 1991). Bei reifgeborenen und frühgeborenen Kindern werden diese rhythmischen Schwankungen mit der Geburt zunächst aufgehoben (Weerth et al., 2003b). Im Hinblick auf das Aktivitäts- und Ruheverhalten weisen Neugeborene anfangs sehr kurze Phasen von Aktivität und Ruhe zu unregelmäßigen Tages- und Nachtzeiten auf (*polyphasisches Muster*) (Korte et al., 2001). In den darauffolgenden Monaten verändern sich die Aktivitäts- und Ruhephasen, in dem sich die Dauer der aktiven Zeit am Tag und die Ruhephasen in der Nacht verlängern (*monophasisches Muster*) (Korte et al., 2001). Die Anpassung an tagesperiodische Schwankungen wird sowohl durch endogene als auch umweltbedingte Zeitgeber beeinflusst (Korte et al., 2001; Rietveld, 1990).

Zur Reifung der circadianen Rhythmik bei Frühgeborenen liegen bisher nur wenige Studien mit sehr widersprüchlichen Resultaten vor. In einer älteren Arbeit wurden circadiane Schwankungen der Cortisolkonzentration und des Aktivitäts-Ruhe-Verhaltens ab dem dritten Lebensmonat beobachtet (Vermees et al., 1980), während aktuellere Studien das Auftreten circadianer Rhythmen bereits ab der zweiten bis achten Lebenswoche nachweisen konnten (Antonini et al., 2000; Herrington et al., 2004; Kidd et al., 2005; Korte et al., 2001). Andere Autoren konnten einen engen Zusammenhang zwischen der Reifung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHN-Achse) und der Entwicklung der circadianen Rhythmik beobachten (Davis et al., 2004; Korte et al., 1996). In den Untersuchungen zeigte sich, dass Frühgeborene im Vergleich zu reifgeborenen Kindern nach einem Stressreiz eine geringere Menge an CRH und ACTH sezernierten. Dies könnte auf eine Unreife der HHN-Achse hinweisen (Davis et al., 2004; Korte et al., 1996).

Auch die Tag-Nacht-Lichtverhältnisse haben einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung der circadianen Rhythmik bei Frühgeborenen (Antonucci et al., 2009; Tsai et al., 2012). Rivkees et al. (2004) konnten feststellen, dass Frühgeborene unter

circadianen Licht-Dunkel-Verhältnissen am Tag aktiver waren als in der Nacht. Andererseits konnte unter konstanten Lichtverhältnissen kein Unterschied der Aktivität am Tag und in der Nacht aufgezeigt werden (Rivkees et al., 2004).

1.6 Zielsetzung und Fragestellungen der Arbeit

Die Hauptaufgabe dieser Dissertation bestand darin, die Entwicklung des circadianen und ultradianen Biorhythmus bei frühgeborenen Kindern mit einem Gestationsalter von 30<37 vollendeten SSW anhand von Cortisolkonzentration und Aktivitäts-Ruhe-Verhalten zu untersuchen.

Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

- a) Welche circadianen und ultradianen Zeitmuster lassen sich bei frühgeborenen Kindern mit 30<37 SSW in den ersten vier Lebenswochen hinsichtlich der Cortisolkonzentration und des Aktivitäts-Ruhe-Verhaltens erfassen?
- b) Wie verändert sich die Cortisolkonzentration bei Frühgeborenen in einem Beobachtungszeitraum von zwei Wochen während der ersten vier Lebenswochen?
- c) Wie verändern sich das Aktivitäts-Ruhe-Verhalten und das Schlafverhalten bei Frühgeborenen in einem Beobachtungszeitraum von zwei Wochen während der ersten vier Lebenswochen?
- d) Stellen Geschlecht, Gestationsalter, postnatales Alter bei Studienbeginn und eine pränatale Steroidgabe relevante Einflussgrößen in Bezug auf die Cortisolkonzentration und das Aktivitätsverhalten dar?

Patienten und Methodik

Die vorliegende Studie ist Teil eines Projektes zum Thema „Biorhythmus und auditive Stimulation bei Frühgeborenen“, an dem zwei Doktorandinnen mitgearbeitet haben. Die vorliegende Dissertationsschrift konzentriert sich auf die Entwicklung des Biorhythmus bei Frühgeborenen und geht nicht auf die auditive Stimulation ein.

2.1 Studiendesign

Es handelt sich um eine Längsschnittstudie. Der primäre Endpunkt der Studie hat hypothesen-generierenden Charakter für prospektive randomisierte Interventionsstudien.

Der Ethikantrag zur Durchführung der vorliegenden Studie wurde von der zuständigen Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Philipps-Universität Marburg am 10. Februar 2012 bewilligt. Die Eltern wurden vor der Teilnahme ihres Kindes an der Studie durch die/den zuständige(n) approbierte(n) Ärztin/Arzt mit einer Informationsbroschüre und in einem Gespräch aufgeklärt. Die Zustimmung der Eltern erfolgte schriftlich. Nach dem Vorliegen der Einwilligungserklärung und der Prüfung der Ein- bzw. Ausschlusskriterien wurden die Studienkinder in die Studie eingeschlossen.

2.2 Patienten

Studienteilnehmer waren stabile Frühgeborene mit einem Gestationalalter von 30<37 Schwangerschaftswochen (SSW), die zwischen dem 01.03.2012 und dem 21.01.2013 an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Marburg stationär aufgenommen wurden und die folgenden Kriterien erfüllten.

2.2.1 Einschlusskriterien

- a. Stabile Frühgeborene mit einem Gestationalalter von 30<37 vollendeten Wochen
- b. Postnatales Alter <10 Tage
- c. Schriftliche Einverständniserklärung der Sorgeberechtigten

2.2.2 Ausschlusskriterien

- a. Fehlende Einverständniserklärung der Sorgeberechtigten
- b. Schwere Fehlbildungen

- c. Künstliche invasive Beatmung
- d. Erkrankungen des Herzens (angeborene Herzfehler, Herzrhythmusstörungen)
- e. Einsatz von herzwirksamen Medikamenten (z.B. Katecholamine, Beta-Blocker)
- f. Hörstörung
- g. Absehbare Entlassung oder Verlegung des Kindes in den kommenden 2 Wochen

Die Ausschlusskriterien d.-f. wurden wegen des anderen Teils des Gesamtprojektes, der Studie zur auditiven Stimulation, definiert.

2.2.3 Abbruchkriterien

- a. Rücknahme der Einverständniserklärung der Sorgeberechtigten
- b. Künstliche invasive Beatmung
- c. Einsatz von herzwirksamen Medikamenten (z.B. Katecholamine, Beta-Blocker)
- d. Hörstörung
- e. Schwerwiegende Komplikationen, die nach Einschätzungen der behandelnden Ärzte eine weitere Teilnahme an der Studie nicht erlaubten.
- f. Entlassung nach Hause oder Verlegung in eine andere Klinik

2.2.4 Randomisierungsverfahren

Für den anderen Teil des Gesamtprojektes, welcher die auditive Stimulation bei Frühgeborenen untersuchte, erfolgte eine Randomisierung der Studienteilnehmer zu einer von drei Studiengruppen. Die beiden Interventionsgruppen bestanden aus einer Gruppe, die mit Wiegenliedern, und einer anderen Gruppe, die mit der Mutterstimme, stimuliert wurde. Die Kontrollgruppe erhielt keine standardisierte auditive Stimulation. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden alle Kinder unabhängig von ihrer Gruppenzuordnung hinsichtlich der Entwicklung des Biorhythmus untersucht.

2.3 Studienaufbau

2.3.1 Beschreibung der teilnehmenden Stationen

Die Studiendurchführung fand sowohl auf der neonatologischen Intensivstation als auch auf der neonatologischen Spezialstation der Kinderklinik Marburg statt. Auf der neonatologischen Intensivstation (I7) werden Frühgeborene mit schweren Erkrankungen (z.B. Atemnotsyndrom, nekrotisierende Enterokolitis, intrazerebrale Blutungen) sowie Neugeborene mit intensivmedizinisch zu versorgenden Erkrankungen (z.B. Fehlbildungen, schwere Infektionen) intensivmedizinisch behandelt. Auf der neonatologischen Spezialstation (042) werden Frühgeborene in stabilem Allgemeinzustand und Neugeborene mit allgemeinen Erkrankungen versorgt.

2.3.2 Erfassung des Cortisol-Profiles und Aktivitäts-/Ruheverhaltens

An den Tagen eins, sieben und vierzehn wurden bei den Frühgeborenen jeweils sieben Speichelproben im vier- bis fünfstündigen Intervall zur Erstellung des Cortisol-Profiles entnommen. Zudem wurde bei den Kindern an den Tagen eins, sieben und vierzehn jeweils über 24 Stunden die Aktivität mit Hilfe eines Aktometers aufgezeichnet (Abbildung 4).

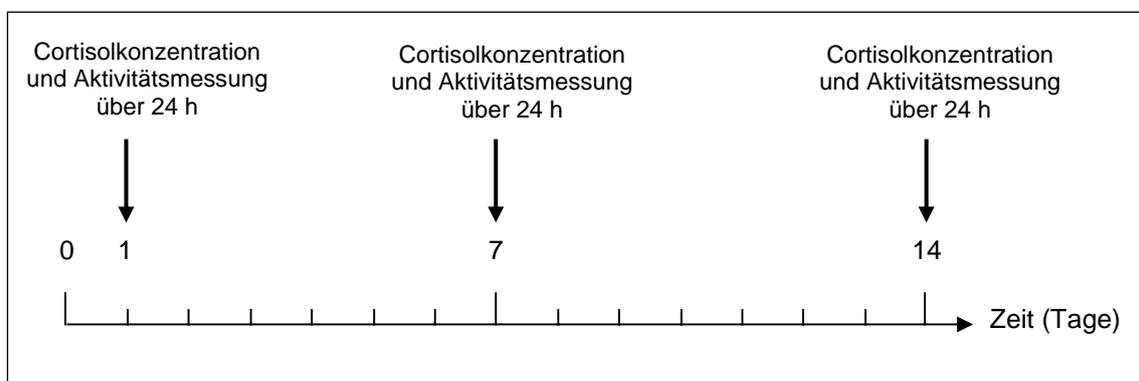


Abbildung 4: Studienaufbau

2.4 Material und Methodik

2.4.1 Datenerfassungsbogen

Bei Eintritt in die Studie wurden die Charakteristika der Frühgeborenen (Geschlecht, errechneter Geburtstermin, Geburtsgewicht, Gestationsalter, Apgar-Score, Mehrling ja/nein, postnatales Alter bei Studienbeginn) pseudonymisiert erfasst. Während der Studienperiode wurden nasale CPAP-Atemhilfe, Phototherapie oder interkurrente Erkrankungen dokumentiert. Bei einem vorzeitigen Abbruch der Studie wurde dies mit dem jeweiligen Grund verzeichnet. Daten zur Mutter, wie die Art der Entbindung, pränatale Gabe von Steroiden, Anzahl der Schwangerschaften, Geburten und demographische Merkmale wurden ebenfalls pseudonymisiert aufgezeichnet.

An den Studientagen eins, sieben und vierzehn wurde die Aktometermessung mit Anfangs- bzw. Endzeitpunkt und eventuelle Unterbrechungen sowie der Zeitpunkt der Speichelentnahmen protokolliert.

Bei der Entlassung oder Verlegung der Studienkinder wurden abschließend das Entlassungsgewicht, das postnatale Lebensalter bei Entlassung und die Dauer des Klinikaufenthaltes festgehalten. Frühgeborene, die wegen der o.g. Ausschlusskriterien nicht in die Studie einbezogen werden konnten, wurden pseudonymisiert mit dem Grund ihrer Nichtteilnahme notiert.

Alle erhobenen patientenbezogenen Daten wurden folgendermaßen pseudonymisiert: jedes Studienkind erhielt eine fortlaufende Nummer als Studiencode, unter welcher es in der Auswertung und Datenerhebung erfasst wurde. Der Code wurde verschlossen verwahrt und nach Studienende vernichtet.

2.4.2 Speichelprobenentnahme

Material:

Wattestäbchen (10-11 mm)	NOBA Verbandmittel Danz GmbH u. Co; Wetter, D
Cellstar ® Tubes (15 ml)	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen, D
Pipetten (0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl)	Fisher Scientific GmbH; Schwerte, D
Pipettenspitzen	Starlab GmbH; Hamburg, D
Reaktionsgefäß (1,5 ml) ohne Deckel	Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht, D

Reaktionsgefäß (1,5 ml) mit Deckel

Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen, D

Kühlzentrifuge (Centrifuge 5810R)

Eppendorf; Wesseling-Berzdorf, D

Durchführung:

Das Hormon Cortisol wurde im Speichel der Kinder gemessen. Mit Hilfe eines steril verpackten Wattestäbchens wurde Speichel aus der Wangentasche der Frühgeborenen gewonnen. Das Wattestäbchen wurde 5-10 Minuten in der Wangentasche der Kinder belassen. Anschließend wurde es in ein Cellstar-Röhrchen (15 ml) mit luftdichtem Deckel gegeben und im Kühlschrank bei 4°C für 2 bis 5 Tage gelagert. Die gesammelten Proben wurden in regelmäßigen Abständen im Forschungslabor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin in Marburg aufgearbeitet. Zur Extraktion des Speichels wurden die Wattestäbchen in kleine Reaktionsgefäße (RG) (1,5 ml) gegeben. Die spitzen Enden der RG wurden vorher abgeschnitten. Danach wurde jedes bestückte RG zurück in das zugehörige Cellstar-Röhrchen eingelegt (Abbildung 5). Die verschlossenen Röhrchen wurden im Anschluss in der Kühlzentrifuge bei 4000 Umdrehungen 30 Minuten zentrifugiert. Danach folgte das Pipettieren des Sediments in ein weiteres RG. Das entnommene Speichelvolumen wurde beim Pipettieren bestimmt und dokumentiert. Die Proben wurden mit einem Code fortlaufend nummeriert und bis zur Durchführung des nächsten ELISA bei -20°C tiefgefroren.

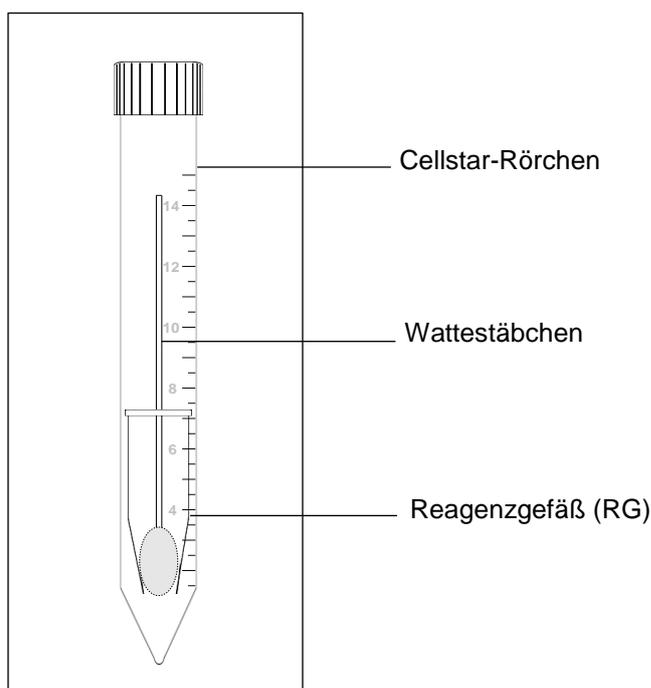


Abbildung 5: Verfahren zur Speichelgewinnung

Intervallfrequenz der Speichelprobenentnahme:

Folgende Zeitpunkte wurden im vier- bis fünfstündigen Rhythmus zur Erstellung eines circadianen Cortisol-Profiles gewählt:

20:00 Uhr

21:00 Uhr

01:00 Uhr

05:00 Uhr (vor der morgendlichen Pflegerunde)

08:00 Uhr (nach der morgendlichen Pflegerunde)

13:00 Uhr

17:00 Uhr

Die Wahl des kurzen Intervalls der Speichelprobenentnahme 20:00 und 21:00 Uhr erfolgte aufgrund des anderen Teils des Gesamtprojektes, der Studie zur auditiven Stimulation. Hinsichtlich des Entnahmezeitpunktes wurde berücksichtigt, dass die letzte Mahlzeit minimal zwei Stunden zurücklag, ebenso wie die letzte stressreiche invasive Maßnahme. Dies wurde im Datenerfassungsbogen protokolliert. Die Tag- und Nachtcortisolkonzentrationen wurden gegenübergestellt, indem die gemessene Cortisolkonzentration der Erhebungszeitpunkte 20:00, 21:00, 01:00 und 05:00 Uhr als Variable „Nacht“ gruppiert und die Konzentrationen der Zeitpunkte 08:00, 13:00 und 17:00 Uhr als Variable „Tag“ zusammengefasst wurden.

2.4.3 Bestimmung der Cortisolkonzentration**Material:**

Cortisol ELISA-Kit	RE 52611, IBL International GmbH; Hamburg, D
Pipette n (0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl)	Fisher Scientific GmbH; Schwerte, D
Pipettenspitzen	Starlab GmbH; Hamburg, D
Mehrkanalpipette	Thermo Electron Corporation GmbH; Langenselbold, D
Pipettenspitzen ELISA (200 µl)	Yellow Bevelled Tip, Starlab GmbH; Hamburg, D

Zentrifuge	Centrifuge 5417R, Eppendorf; Wesseling-Berzdorf, D
Schüttler	Mixer Uzusio VTX-3000L, Lab Logistic Group GmbH; Meckenheim, D
Rüttler	Edmund Bühler GmbH; Hechingen, D
Mehrkanal-Washer	ASYS Hitech GmbH; Eugendorf, A
ELISA-Reader	ASYS Hitech GmbH; Eugendorf, A
Reader-Software	MikroWin 2000 Connect, Mikrotek; Overath, D

Die Messung der Cortisolkonzentration aus dem Speichel der Frühgeborenen wurde mit Hilfe eines *sandwich ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay)* durchgeführt. Dieses Verfahren besteht aus der Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen und einer daran gekoppelten enzymatischen Farbreaktion. Die Signalstärke der enzymatischen Farbreaktion kann quantifiziert werden, indem die Probe mit einer definierten Wellenlänge durchleuchtet und ihre Absorption von einem Photometer detektiert wird. Für quantitative Nachweise wird eine Reihe bekannter Antigenkonzentrationen gemessen und aus dieser Standardreihe eine Kalibrierungskurve erstellt. Mit dieser definierten Kalibrierungskurve kann aus der ermittelten Absorption der Proben die Cortisolkonzentration berechnet werden.

Durchführung:

Zur Aufbereitung des Probenmaterials wurden die eingefrorenen Speichelproben zur Entfernung von Luftblasen nach dem Auftauen 5 Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert. Die Standards, Kontrollen und Proben wurden in eine 96-Well-Mikrotiterplatte des ELISA-Kits aufgetragen, die mit einem primären Cortisol-Antikörper beschichtet vorlag. Zur Durchführung des Cortisol-ELISA war eine Probenmenge von 50 µl pro Vertiefung erforderlich. Alle Proben mit nicht ausreichender Materialmenge wurden mit einem Puffer (0,1% BSA, 0,1% ProClin) auf das benötigte Volumen von 50 µl aufgefüllt. Der verwendete Puffer bindet laut Angaben des Herstellers nicht zwischen Antikörpern und den Bestandteilen der zu

messenden Probe (IBL International GmbH, Hamburg). Anschließend wurde das Enzymkonjugat (100 µl pro Vertiefung) hinzu pipettiert. Dieses bestand aus dem Zweitantikörper, konjugiert mit dem Enzym Horseradish Peroxidase (HRP). Es folgte eine zweistündige Inkubation der Proben bei Raumtemperatur auf einem Rüttler bei 350 U/min. Zur Entfernung ungebundener Enzyme erfolgten vier Waschvorgänge mit einem 1:10 verdünnten Waschlösungspuffer (Phosphatpuffer mit Tween). Nach diesem Waschvorgang wurden 100 µl des Substrats Tetramethylbenzidin in jede Vertiefung hinzugefügt. Das Substrat reagiert mit dem Enzymkonjugat HRP unter Bildung eines blauen Farbkomplexes. Dieser Farbstoff bildet sich nur, wenn eine immunchemische Reaktion stattgefunden hat. Nach der Inkubation wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von Schwefelsäure (100 µl pro Vertiefung) abgestoppt. Die Reaktion des Substrates mit der Schwefelsäure bildet einen stabilen gelben Farbkomplex. Nach dem Farbumschlag wurde die optische Dichte mit einem Photometer (ELISA-Reader) bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm innerhalb von 15 min gemessen. Die Konzentrationen der Speichelproben wurden anhand der aufgetragenen Standardkurve mit Hilfe der ELISA-Reader-Software mittels eines standardisierten Algorithmus berechnet.

2.4.4 Aktographie

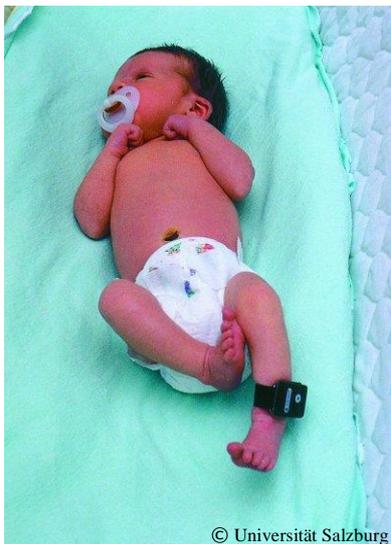
Material:

Aktometer	ActiSleep-BT, ActiGraph™; Pensacola, (FL), USA
ActiLife6 Software	Version 6.10.0.0 Lite Edition, ActiGraph™; Pensacola, (FL), USA
Elastisches Verbandmaterial	NOBA Verbandmittel Danz GmbH u. Co; Wetter, D

Durchführung:

Die Datenerfassung des Aktivitäts- und Ruheverhaltens erfolgte mit Hilfe eines Aktometers. Das armbanduhnrähnliche Gerät (Gewicht: 19 g, Maße: 46 mm x 33 mm x 15 mm) zeichnet die Bewegungen und die Bewegungsbeschleunigung anhand eines internen Sensors mit 30 Hz/min auf (Abbildung 6). Die Bewegungsrichtungen stellt das Gerät anhand einer vertikalen, horizontalen und perpendikularen Achse dar. Die Bewegungsbeschleunigung wird erst ab 0,1 g gemessen. Dadurch kann eine Aufzeichnung passiver Bewegungen (z.B. Bewegung des Inkubators) ausgefiltert

werden. Das Aktometer wurde am Unterschenkel des Frühgeborenen befestigt und mit elastischem Verbandsmaterial gepolstert und fixiert. Vor jeder Messeinheit wurde mit Hilfe des ActiLife6-Software-Programms der jeweilige Code des Patienten, Start- und Endzeitpunkt der Messung, die Position des Gerätes sowie das Gewicht und die Größe des Kindes eingestellt und programmiert. Die Aufzeichnung der kindlichen Bewegungs- und Aktivitätsmuster erfolgte über 24 Stunden an den genannten Studientagen von ca. 19:00 bis ca. 21:00 Uhr am folgenden Abend. Auf dem Datenerfassungsbogen wurde dokumentiert, wenn das Aktometer wegen Pflegemaßnahmen, Fototherapie, technischen Problemen etc. entfernt werden musste. Die Daten wurden mittels USB-Verbindung auf einen Computer transferiert und weiter bearbeitet. Das Aktometer wurde nach jeder Anwendung gereinigt und desinfiziert (mikrozid®, Schülke Mayr GmbH, Norderstedt).



© Universität Salzburg

Abbildung 6: Aktometer

2.4.5 Messung der Lichtverhältnisse

Material:

Beleuchtungsmessgerät

Mavolux 5032 C, Gossen Foto- und
Lichtmesstechnik GmbH; Nürnberg, D

Die Beleuchtungsstärke im Raum wurde einmalig über 24 Stunden anhand des Beleuchtungsmessgeräts von Mavolux (5032C) auf den beiden oben beschriebenen Stationen I7 und 042 erhoben.

2.5 Statistische Analyse

2.5.1 Datenverarbeitung

Für die Datenverarbeitung und statistische Berechnung wurden die Programme Microsoft® Excel® 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), IBM® SPSS® Statistics (Version 21.0.0.0, International Business Machines Corp., Armonk, NY, USA) und die Statistiksoftware R 2.15.0 (R Development Core Team, 2008) verwendet. Die abhängigen Variablen wurden deskriptiv dargestellt (Mittelwert, Standardabweichung (SD), Median, Varianz). Für normal verteilte Parameter wurden der Mittelwert und die Standardabweichung angegeben, nachdem diese anhand des Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft wurden. Bei nichtnormal verteilten Werten wurden die Gruppenunterschiede mit einem Kruskal-Wallis-Test erfasst sowie der Median und die Streuung aufgeführt. Die dargestellten Boxplots mit Whiskers zeigen den Median, die Quartilen und die Streuung. Im Hinblick auf die Stichprobengröße und die zu erwartenden Effekte wurde ein α -Fehler $< 0,05$ als signifikant erachtet.

Bei einer Rücknahme der Einverständniserklärung wurden die bis dahin erhobenen Daten in der Auswertung nicht berücksichtigt. Wenn die Datenerhebung aufgrund einer Entlassung oder Verlegung vorzeitig beendet werden musste, wurden die bis dahin erfassten Daten für die Studiauswertung verwendet.

Herr Prof. em. Dr. Dr. h.c. B. Lemmer und Herr Dr. S. Gorbey vom Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät Mannheim der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg sowie Frau Prof. Dr. N. Timmesfeld vom Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Philipps-Universität Marburg berieten und unterstützten die statistische Auswertung der Datenerhebungen.

2.5.2 Auswertung mit Hilfe des linearen gemischten Modells

Die Anwendung eines linearen gemischten Modells ist bei abhängigen Daten sinnvoll, die longitudinal über einen gewissen Zeitraum von den gleichen Individuen erhoben werden (Ng et al., 2011). In einem linearen klassischen Modell (einfache Varianzanalyse) werden nur feste Effekte untersucht, die eine bekannte Anzahl möglicher Ausprägungen besitzen. Das lineare gemischte Modell berücksichtigt

außerdem zufällige Effekte, bei denen es sich um Faktoren handelt, die unendlich viele Ausprägungen besitzen und deren realisierte Faktorstufen lediglich eine Zufallsauswahl darstellen (Albert & Hunsberger, 2005). Mit dem linearen gemischten Modell können somit Beziehungen innerhalb einer Zeitspanne dargestellt und fehlende Datenpunkte besser ausbalanciert werden (Albert & Hunsberger, 2005). Die Umsetzung des Modells basiert auf folgender mathematischer Formel (Snijders et al., 2012):

$$Y_i = X_i x \beta + z_i x b + \varepsilon_i$$

Die Formel setzt sich zusammen aus Y_i , welches die Zielvariable des i -ten Individuums darstellt. In unserem Studiendesign bezieht sich diese Zielvariable auf die beiden Parameter Cortisol und Aktivität. X_i beschreibt die erklärende Variable und β den Regressionskoeffizienten, der für alle Individuen gleich ist. Zusammen bilden $X_i x \beta$ den festen Effekt und $z_i x b$ den zufälligen Effekt. Der feste Effekt wird in der vorliegenden Arbeit durch die Faktoren „Studientag“ (Tag 1, 7, 14) oder „Erhebungszeitpunkt“ pro Studientag definiert. Die Auswahl der Studienkinder und die ausgewählten Beobachtungstage werden durch den zufälligen Effekt („random effects“) berücksichtigt. ε_i beinhaltet den zufälligen Fehler, der die unerklärbare Variabilität der Zielvariablen berücksichtigt, z.B. entstanden durch den Messprozess (Snijders et al., 2012).

Die Analyse der Cortisol- und Aktivitätsdaten wurde anhand des linearen gemischten Modells in R 2.15.0 mit dem Paket „lme4“ und „nlme“ durchgeführt (Bates et al., 2014; Pinheiro et al., 2014; Snow, 2006). Jede Auswertung erfolgte durch eine individuelle Modellanpassung, indem die zu analysierenden Variablen, Faktoren und zufälligen Effekte ermittelt wurden. Zuerst wurden alle erklärenden Faktoren und zufälligen Effekte in das Modell eingeschlossen. Schrittweise wurden die einzelnen Faktoren und „random effects“ herausgenommen und nach jedem Schritt der AIC-Wert (Akaike information criterion Wert) ermittelt. Der AIC-Wert bildet sich aus dem Logarithmus der Likelihood-Funktion und der Anzahl der Variablen im Modell. Je kleiner der AIC-Wert ausfällt, desto genauer ist die Anpassung des Modells (Bates et al., 2014). Dieses schrittweise Vorgehen ermöglicht, das am besten zu den Daten passende Modell zu finden. Anschließend wird das ausgewählte Modell auf Homogenitätsvarianz und Normalverteilung überprüft, indem die Residuen des Modells aufgezeichnet werden.

Die Residuen stellen die durch die Formel nicht erklärbaren Einflussfaktoren dar. In einem Streudiagramm werden die Residuen gegen die theoretischen Werte der Zielvariablen abgebildet. Dabei sollte eine möglichst homogene Streuung der Residuen erreicht werden. Falls keine balancierte Homogenitätsvarianz und Normalverteilung vorlag, wurde eine logarithmische Transformation der Daten durchgeführt.

2.5.3 Rhythmusanalyse der Parameter Cortisol und Aktivität

Die circadiane Rhythmik des Hormons Cortisol und der Aktivität wurde mit dem Programm Chronos-Fit Version 1.06 (Mannheim, D) analysiert. Die Rhythmusuntersuchung erfolgte mit der Lomb-Scargle-Methode (Least Squares Spectral Analysis (LSSA)). Die Lomb-Scargle-Methode passt eine Cosinus Funktion an die Daten an und ist im Gegensatz zu klassischen Regressionsmethoden (z.B. Fast-Fourier-Transformation) robust gegenüber unregelmäßigen Zeitabständen. Das Signifikanzniveau der Periodenlänge wird anhand eines F-Test geprüft. Die berechneten Rhythmusparameter Periodenlänge (τ), Mesor, Peak, Tagesmittelwert und Nachtmittelwert wurden miteinander verglichen, um Unterschiede zwischen den drei Studiengruppen und den drei Studientagen (Tag 1, 7 und 14) aufzuzeigen. Eine Gruppierung der Daten hinsichtlich des Faktors Tag- und Nachtcortisolkonzentration ermöglichte es, bei einer kleinen Stichprobengröße eine bessere Charakterisierung und höhere Präzision der Daten zu erreichen. Der statistische Vergleich lief über eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen und dem Tukey-HSD-Test (Honestly Significant Difference) anhand des linearen gemischten Modells. Der Tukey HSD-Test vergleicht die Mittelwertdifferenzen der Stichproben paarweise miteinander und gewährleistet, dass bei jedem Vergleich das α -Signifikanzniveau eingehalten wird.

2.5.4 Analyse des Aktivitäts-/Ruheverhaltens

Das über 24 Stunden registrierte Aktivitäts- und Schlafverhalten der Frühgeborenen wurde mit Hilfe des ActiLife-Programms Version 6 anhand des ActiLife Scores ausgewertet. Zur Auswertung verwendete das Programm den sogenannten Vektor Magnitude Wert, welcher sich aus drei Achsen zusammensetzt. Die drei Achsen beinhalteten die vertikale (Axis 1), horizontale (Axis 2) und perpendikuläre Achse (Axis 3).

Der Vektor Magnitude Wert berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Vektor Magnitude} = \text{VM} = \sqrt{(\text{Axis 1})^2 + (\text{Axis 2})^2 + (\text{Axis 3})^2}$$

Der Vektor Magnitude Wert wurde weiterhin mit Hilfe eines Algorithmus von So et al. (So et al., 2005), entwickelt für Neugeborene in einem Alter von zwei bis vier Wochen, analysiert. Laut Literaturangaben liegt derzeit kein angepasster Algorithmus für Frühgeborene vor. Die Intensität der Aktivität wurde demnach in drei Stufen eingeteilt, je nach Gewichtung der Frequenzausschläge. Das niedrigste Aktivitätsniveau bezeichnet die Ruhephase der Frühgeborenen und umfasst alle Frequenzausschläge < 37 counts/min. Das mittlere Aktivitätsniveau befindet sich zwischen 38-419 counts/min und die höchste Aktivitätsstufe wird ab 420 counts/min definiert.

Die erfasste Schlafdauer der Frühgeborenen wurde im Bezug zur Gesamtdauer der Aktivitätsaufzeichnung prozentual für jedes Studienkind berechnet. Der statistische Vergleich der Aktivitätsstufen und Schlafdauer hinsichtlich des beeinflussenden Faktors Studientag erfolgte anhand eines generalisierten linearen gemischten Modells (GLMM). Die Anwendung eines GLMM zur Analyse der Aktivitätsfrequenzen ist für die Auswertung diskreter Daten (diskontinuierlicher Daten) besser geeignet als ein klassisches lineares Modell. Anhand des GLMM wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen angewendet und anschließend bei gegebener Signifikanz ein Tukey-HSD-Test ausgeführt.

2.5.5 Interaktionseffekte

Laut Literaturangaben stellen Gestationsalter (GA), postnatales Alter (PNA) und Geschlecht der Frühgeborenen sowie pränatale Steroidgaben mögliche Störfaktoren bezüglich der Cortisolkonzentration und des Aktivitätsverhaltens dar (Davis et al., 2006; Neu et al., 2007; Schaffer et al., 2009). Um signifikante Interaktionen dieser Nebeneffekte zu ermitteln, wurden die univariaten Zusammenhänge geprüft. Dies kann in R über eine ANOVA (analysis of variance) mit Messwiederholungen moduliert werden.

Ergebnisse

3.1 Das Patientenkollektiv

Die Datenerhebung erfolgte an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Marburg in dem Zeitraum vom 1. März 2012 bis 21. Januar 2013. Aus einem Patientenpool von 108 Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von 30<37 vollendeten Wochen, konnten in diesem Zeitraum zur Erhebung der Cortisol- und Aktivitätsdaten 62 Frühgeborene nach den o.g. Einschlusskriterien in die Studie eingeschlossen werden. 46 Frühgeborene konnten nicht an der Studie teilnehmen. Die Gründe dafür sind in Abbildung 7 aufgeführt.

Bei 10 der 62 eingeschlossenen Frühgeborenen (16%) wurde die Datenerhebung aufgrund der u.g. Gründe vorzeitig beendet (Abbildung 7). Weitere Einschränkungen der Stichprobengröße durch technische Defekte werden in den jeweiligen Kapiteln aufgezeigt (vgl. Tabelle 2)

Das Gesamtkollektiv der 62 eingeschlossenen Frühgeborenen wurde im Rahmen des Gesamtprojektes durch Randomisierung in drei unterschiedliche Studiengruppen (Mutterstimme N=20, Musik N=20, Kontrollgruppe N=22) aufgeteilt.

Das Aktivitätsverhalten wurde bei allen Studienkindern untersucht. Die Analysen des Cortisol-Profils beziehen sich nur auf die Kinder der Kontrollgruppe. In dieser Gruppe erfolgte bei einem Kind nur eine partielle Datenerhebung, da die Entlassung bereits vor Studienende stattfand. Zwei Sorgeberechtigte nahmen ihre Einwilligung zur Studienteilnahme zurück, so dass eine vollständige Cortisolbestimmung bei insgesamt 19 Studienkindern durchgeführt werden konnte.

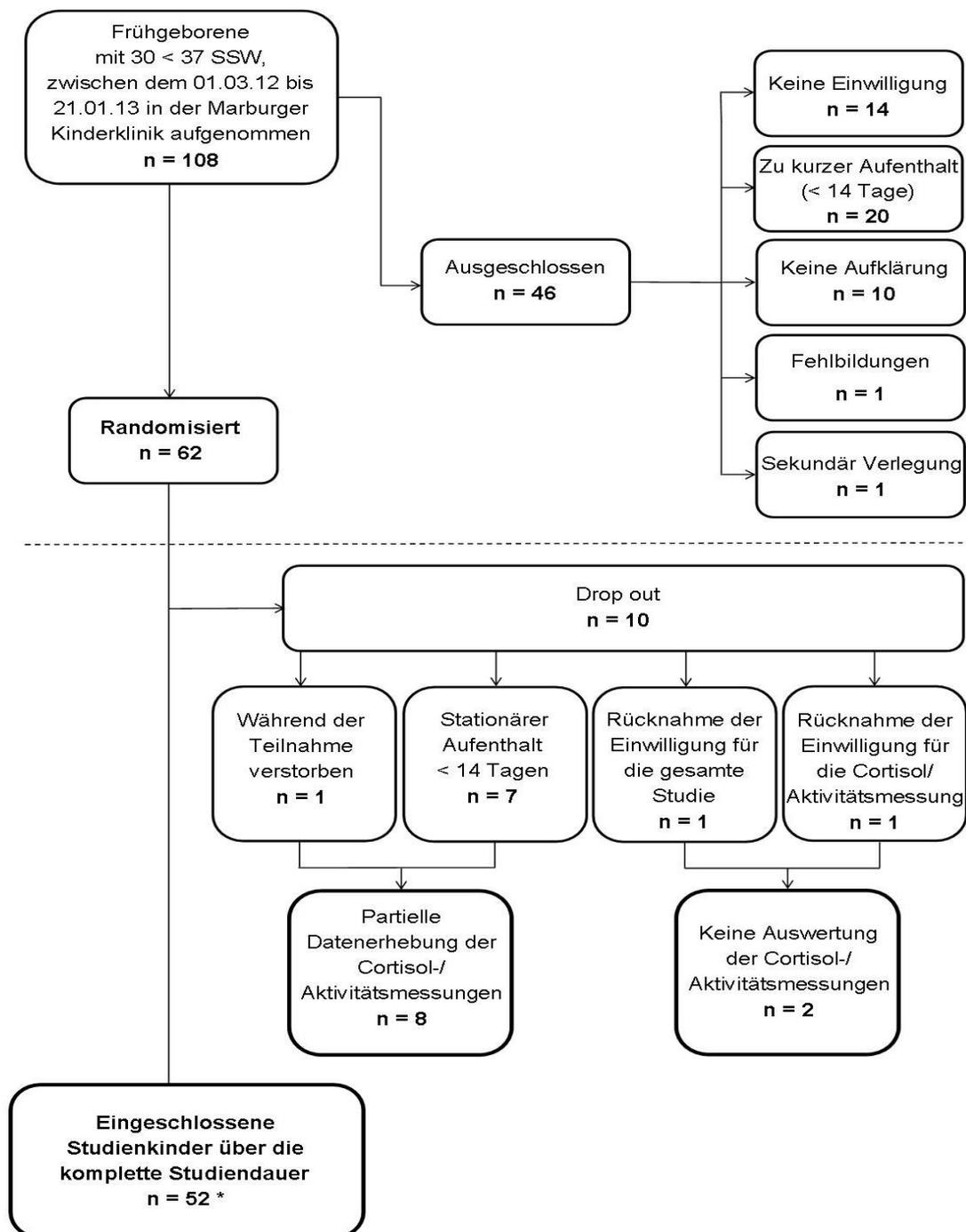


Abbildung 7: Darstellung des Patientenkollektivs

Der abgebildete Teil oberhalb der gestrichelten Linie bezieht sich auf das Gesamtprojekt (Biorhythmus und auditive Stimulation), der Teil unterhalb der gestrichelten Linie nur noch auf die vorliegende Studie (Biorhythmus).

* Die Messung des Aktivitätsverhaltens erfolgte bei allen Studienkindern (n=52); Die Cortisolmessungen wurden bei 19 von 52 Studienkindern durchgeführt. Diese Kinder stellten die Kontrollgruppe in der Studie zur auditiven Stimulation dar.

3.1.1 Deskriptive Charakteristika der Patienten

Die klinischen Daten des Patientenkollektivs sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Das mittlere Gestationsalter (GA) der Gesamtstichprobe (N=62) betrug 33+0 SSW, das mittlere Geburtsgewicht lag bei 1840 g (SD=520 g). Vier Frühgeborene wiesen bei Geburt ein Gewicht unter 1000 Gramm (ELBW) und 12 Studienkinder ein Geburtsgewicht unter 1500 Gramm (VLBW) auf. Bei 14 Studienkindern befand sich das Geburtsgewicht unterhalb der 10. Perzentile für das jeweilige Gestationsalter (SGA-Kinder). Insgesamt wurden 33 Knaben (53%) und 29 Mädchen (47%) in die Studie eingeschlossen. Zehn Zwillingspaare und ein Drillingstrio befanden sich unter den Studienteilnehmern. Der Median des Apgar-Score nach 5 Minuten (Apgar 5') betrug 8 Punkte (Streuung: 6–10). Die Mütter von 29 Studienkindern erhielten keine Steroide vor der Geburt ihres Kindes, 5 Mütter wurden mit einem unvollständigen Zyklus (1x12 mg Betamethason) und 27 Mütter mit einem kompletten Zyklus (2x12mg Betamethason) therapiert, während eine Mutter 3 mal 12 mg Betamethason erhielt. Schwere Erkrankungen oder Komplikationen traten während der Studie bei fünf Frühgeborenen auf (Tabelle 1). Von einer statistischen Untersuchung möglicher Interaktionseffekte zwischen erkrankten Studienkindern und den Zielparametern wurde abgesehen, da eine weitere Untergruppenbildung wegen der geringen Fallzahl nicht sinnvoll erschien.

Tabelle 1: Demographische und klinische Daten der Studienpopulation

Variable		Gesamt (N=62)	CG (N=22)
GA (Wochen+Tage)	Mittelwert (SD)	33+0 (10,8)	33+4 (7,2)
PNA (Tage)	Mittelwert (SD)	4,9 (2,2)	4,1 (2)
Geburtsgewicht (g)	Mittelwert (SD)	1840 (520)	1979 (417)
Apgar-Score (5 min)	Median (Streuung)	8 (6-10)	8 (6-10)
Geschlecht N (%)	Männlich	33 (53%)	10 (45%)
	Weiblich	29 (47%)	12 (55%)
SGA N (%)		14 (23)	4 (20)
CPAP N (%)		9 (15)	3 (15)
Interkurrente Erkrankungen N (%)		5 (8)	0 (0)
Pränatale Steroidgabe N (%)	Keine Gabe	29 (47)	12 (55)
	Vollständige Gabe (2x12mg)	27 (43)	9 (40)
	1x12mg Gabe	5 (8)	1 (5)
	3x12mg Gabe	1 (2)	0(0)

Gesamt: Gesamtgruppe für die Messung der Aktivität; CG: Cortisolgruppe für die Messung des Cortisol-Profils (Die Cortisolgruppe ist eine Teilpopulation der Gesamtgruppe und gleichzeitig auch die Kontrollgruppe der Studie zur auditiven Stimulation); N: Anzahl; SD: Standardabweichung; GA: Gestationsalter bei Geburt; PNA: Postnatales Alter bei Studienbeginn; Apgar: Apgar-Score nach 5 Minuten; SGA: Small for gestational age (< 10. Perzentile); CPAP: continuous positive airway pressure (Beatmungshilfe); Pränatale Steroidgabe: Betamethason; Interkurrente Erkrankungen: Nekrotisierende Enterokolitis, intrazerebrale Blutung, Infektion.

3.2 Lichtverhältnisse

Die aufgezeichneten Lichtverhältnisse am Tag wurden auf der neonatologischen Intensivstation (I7) im Durchschnitt mit 1133 ± 961 lx und auf der neonatologischen Spezialstation (042) mit 380 ± 26 lx gemessen. Die Nachtmittelwerte mit 5 ± 13 lx auf der Station I7 und 7 ± 12 lx auf der Station 042 zeigten eine deutliche Abnahme der Beleuchtungsstärke in der Nacht im Vergleich zu den Lichtverhältnissen am Tag.

3.3 Die Cortisolkonzentration im Speichel

3.3.1 Deskriptive Statistik

Zur Erfassung der tagesperiodischen Schwankungen der Cortisolkonzentration erfolgte die Speichelprobenentnahme bei den Frühgeborenen (N = 22) im vier- bis fünfstündigen Rhythmus. Aus dem sich ergebenden Gesamtpool von 422 Speichelproben konnten 274 Proben (65%) zur Analyse verwendet werden. 148 Proben (35%) konnten wegen eines zu geringen Speichelvolumens, aus technischen und organisatorischen Gründen (medizinische Interventionen) nicht erfasst werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Stichprobengröße zur Erstellung des Cortisol-Profiles

Probenmenge	CG
Frühgeborene (N)	22
Proben (N)	422
Verwertbare Proben	274 (65%)
Nicht verwertbare Proben	148 (35%)
<i>Speichelmenge zu gering (<10µl)</i>	107 (25%)
<i>Fehlversuch ELISA</i>	18 (4%)
<i>Organisatorische Gründe</i>	23 (6%)

N: Anzahl der Proben; CG: Cortisolgruppe

Die gemessene Cortisolkonzentration war am ersten Studientag im Durchschnitt höher als an den Tagen 7 und 14. Die Messwerte zeigten eine größere Streuung am ersten Tag im Vergleich zu den folgenden Studientagen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Deskriptive Statistik der Cortisolkonzentration im Speichel (nmol/L)

Zeit	Tag 1			Tag 7			Tag 14		
	Median	Range	N	Median	Range	N	Median	Range	N
20:00	19,4	[9,5-50,5]	15	9,8	[4,9-27,0]	15	10,1	[4,9-31,4]	12
21:00	16,7	[4,1-45,0]	14	8,1	[3,2-65,8]	14	9,5	[5,5-50,0]	12
01:00	21,9	[9,7-119,7]	11	9,9	[3,8-37,0]	14	9,5	[5,2-28,2]	12
05:00	12,4	[5,5-66,5]	14	9,9	[4,8-23,9]	12	12	[5,2-37,3]	11
08:00	14,9	[4,1-36,5]	10	14,4	[4,9-43,0]	15	8,2	[4,5-21,2]	11
13:00	13,9	[5,9-73,5]	16	10,7	[5,4-36,1]	12	12,8	[3,1-30,6]	8
17:00	11,8	[5,3-68,9]	15	9,7	[5,4-11,8]	7	11,1	[6,9-27,4]	12

Streuung: Minimum und Maximum der Cortisolkonzentration; N: Anzahl der Speichelproben

3.3.2 Rhythmusanalyse

Zur Erfassung eines circadianen Rhythmus mit der Lomb-Scargle-Methode sind mindestens vier Messungen im Zeitfenster von 24 Stunden erforderlich. Deshalb wurden nur Messungen der Studienkinder in die statistische Auswertung einbezogen, von denen mindestens vier gültige Konzentrationsmessungen mit einem ausgeglichenen Tag-/Nachtverhältnis vorlagen. Es gingen 15 Frühgeborene am ersten, zehn am siebten und acht Frühgeborene am vierzehnten Untersuchungstag in die Analyse ein.

Lediglich bei einem Frühgeborenen konnte am ersten Untersuchungstag ein circadianer Rhythmus mit einer Periodenlänge von 24 Stunden nachgewiesen werden (F-Test: $p = 0,04$) (Abbildung 8).

Der Peak der Harmoniekurve lag bei einer Cortisolkonzentration von 41,19 nmol/L um 5:02 Uhr morgens. In der Nacht konnte eine deutlich niedrigere mittlere Cortisolkonzentration ($\bar{x} = 11,74$ nmol/L) als am Tag ($\bar{x} = 19,85$ nmol/L) gemessen werden. In der statistischen Gruppenanalyse der weiteren Frühgeborenen konnten keine signifikanten circadianen oder ultradianen Schwankungen der Cortisolkonzentration an den Studientagen 1, 7 und 14 beobachtet werden (Tabellen im Anhang S. 75-76).

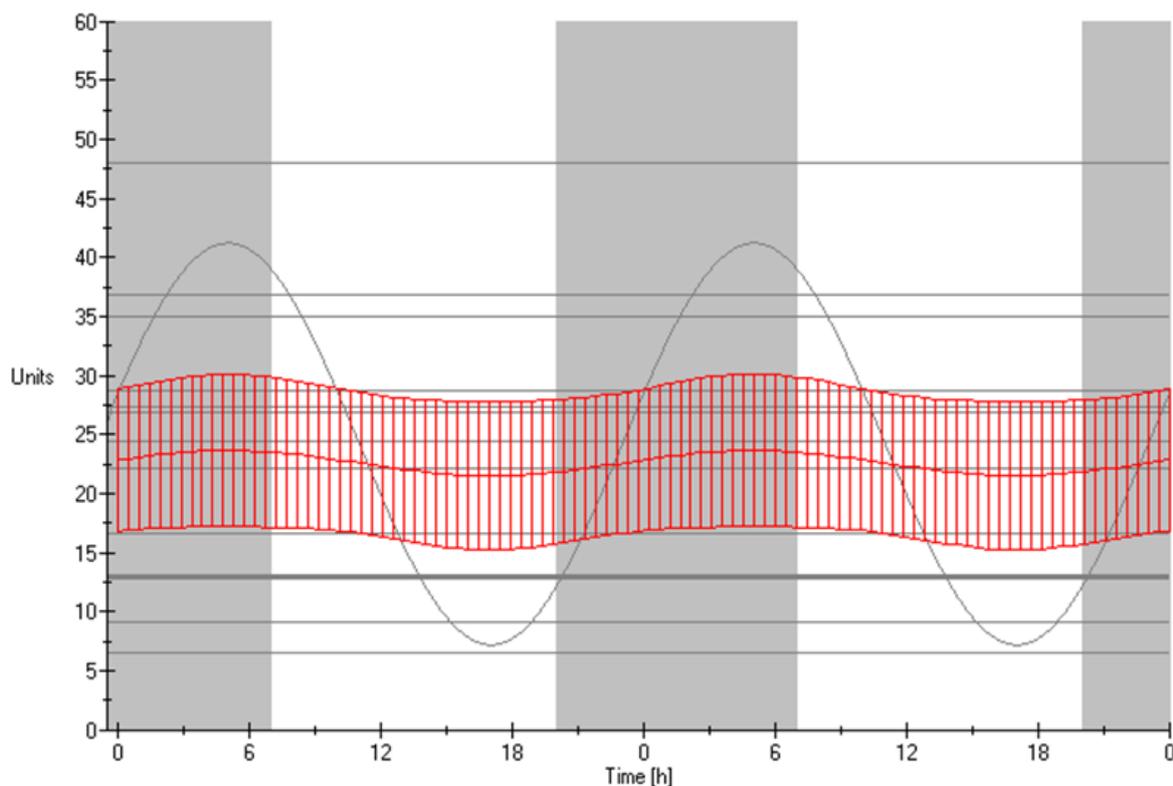


Abbildung 8: Circadianer Cortisolrhythmus eines Frühgeborenen

Darstellung des circadianen Rhythmusprofils eines Frühgeborenen mit einer Periodenlänge von 24 Stunden. Zur besseren Veranschaulichung wurde das Rhythmusprofil über zweimal 24 Stunden abgebildet. Units: Einheit der Cortisolkonzentration nmol/L; Time(h): Angabe der Uhrzeit in Stunden

3.3.3 Vergleich der Cortisolkonzentration im Speichel zwischen den Studientagen

Der statistische Vergleich der Cortisolkonzentration zwischen den einzelnen Studientagen und den verschiedenen Erhebungszeitpunkten wurde nach einer logarithmischen Transformation geprüft. In den Berechnungen ließen sich keine signifikanten tageszeitlichen Schwankungen hinsichtlich der gemessenen Uhrzeiten innerhalb eines Studientages ermitteln.

Die Cortisolkonzentration des ersten Erhebungstages (Median = 16,5 nmol/L, IQR (Interquartilsabstand) = 10,6–27 nmol/L) war signifikant höher im Vergleich zu den Messwerten des siebten (Median = 9,8 nmol/L, IQR = 6,3–16,4 nmol/L), (Tukey-HSD, $z = 3,90$, $p < 0,001$) und vierzehnten Untersuchungstages (Median = 10,0 nmol/L, IQR = 7,6–15,5 nmol/L), (Tukey-HSD, $z = 3,03$, $p < 0,005$). Hingegen wichen die mittleren Cortisolwerte am siebten und vierzehnten Untersuchungstag nicht signifikant voneinander ab (Tukey-HSD, $z = 0,68$, $p = 0,78$) (Tabelle 4, Abbildung 9).

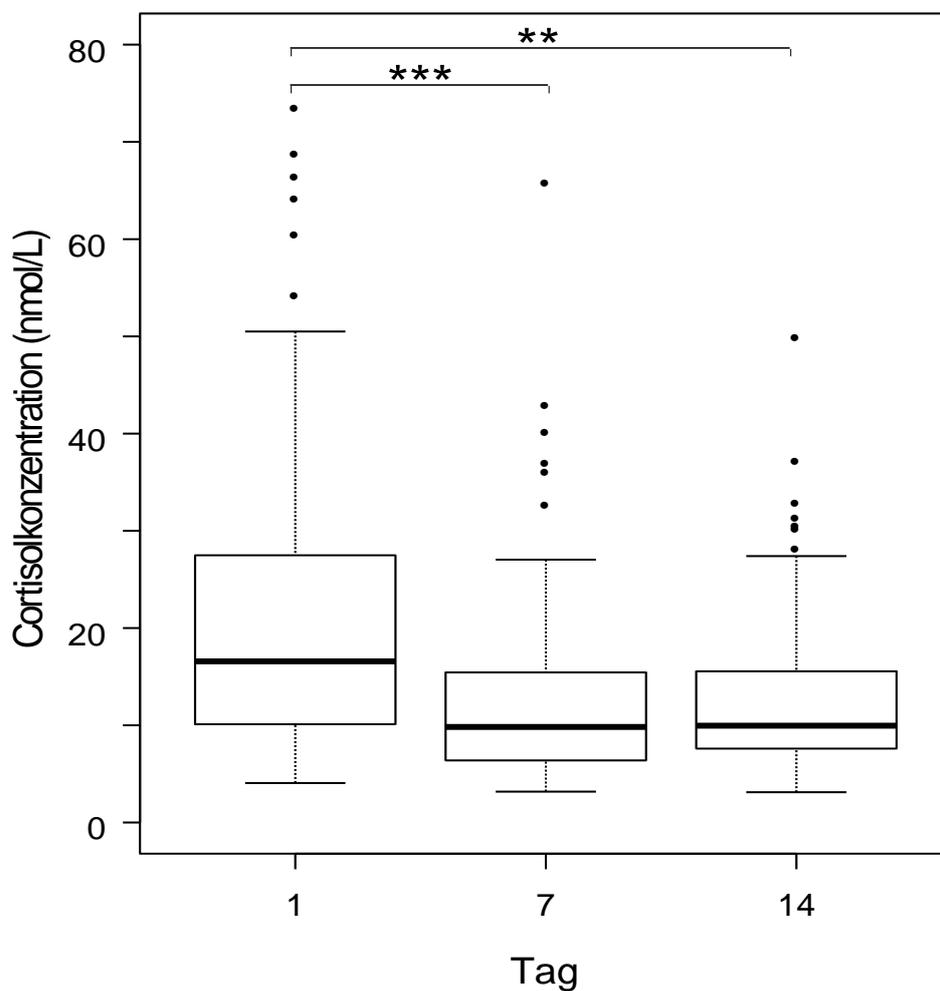


Abbildung 9: Vergleich der Cortisolkonzentration im Speichel (nmol/L)

Die Cortisolkonzentration war am ersten Studientag (N=95) signifikant höher im Vergleich zum siebten (N=89) und vierzehnten (N=78) Untersuchungstag.

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

3.3.4 Vergleich der Tag- und Nachtcortisolkonzentration im Speichel

Die statistische Prüfung zeigte keine signifikanten Differenzen zwischen den Tag- und Nachtcortisolmessungen gleicher Studientage. Die Prüfung der Tag- bzw. Nachtcortisolkonzentration zwischen den drei Studientagen ergab signifikant höhere Cortisolkonzentrationen in der ersten Untersuchungsnacht (Median = 17,1 nmol/L, IQR = 9,7–24,4 nmol/L) im Vergleich zur siebten (Median = 9,6 nmol/L, IQR = 4,7–14,6 nmol/L), (Tukey-HSD: $z = 4,13$, $p < 0,001$) und vierzehnten Untersuchungsnacht (Median = 9,8 nmol/L, IQR = 5,8–13,7 nmol/L), (Tukey-HSD: $z = 2,89$, $p = 0,042$) (Tabelle 4, Abbildung 10).

Die Tagescortisolkonzentration zeigte zwischen den Studientagen eins (Median = 12,9 nmol/L, IQR = 3,4–22,4 nmol/L), sieben (Median = 10,4 nmol/L, IQR = 5,9–14,8 nmol/L) und vierzehn (Median = 10,8 nmol/L, IQR = 6,9–14,6 nmol/L) keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 4, Abbildung 11).

Tabelle 4: Tag-/Nachtcortisolkonzentration im Speichel (nmol/L)

Variable	Median	IQR	p-Wert
Intercept (Gesamt d1)	16,5	[10,6-27]	
Gesamt d7	9,8	[6,3-16,4]	0,001 ^a
Gesamt d14	10,0	[7,6-15,5]	0,005 ^a
Intercept (Studientag 1)	12,9	[3,4-22,4]	
Studientag 7	10,4	[5,9-14,8]	0,179
Studientag 14	10,8	[6,9-14,6]	0,259
Intercept (Studiennacht 1)	17,1	[9,7-24,4]	
Studiennacht 7	9,6	[4,7-14,6]	0,001 ^a
Studiennacht 14	9,8	[5,8-13,7]	0,042 ^a

IQR: Interquartilsabstand (25%-, 75%-Quartil), Gesamt d1, d7, d14: Alle Messzeitpunkte an Tag 1, 7 und 14; ^a Tukey-HSD Signifikanztest

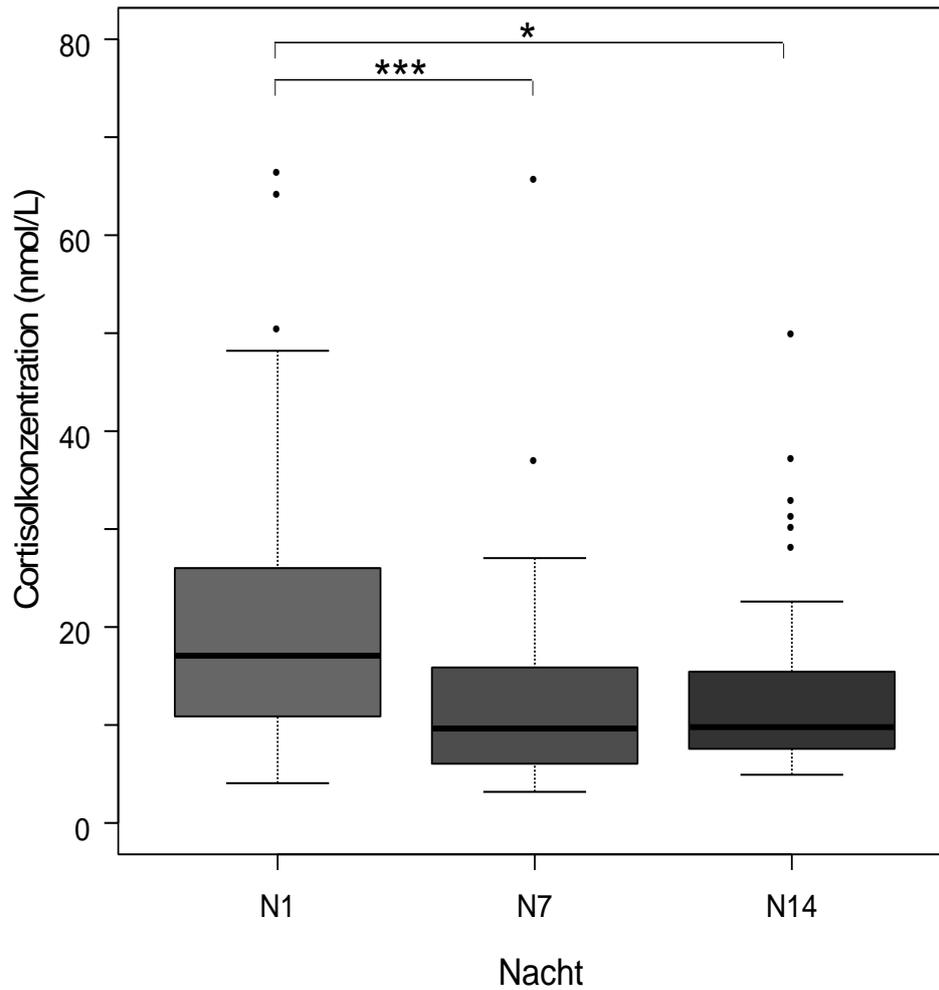


Abbildung 10: Darstellung der Cortisolkonzentration in der Nacht (nmol/L)

Die Cortisolkonzentration erwies sich in der ersten Untersuchungsnacht (N=54) signifikant höher als in der siebten (N=55) und vierzehnten (N=47) Untersuchungsnacht.

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

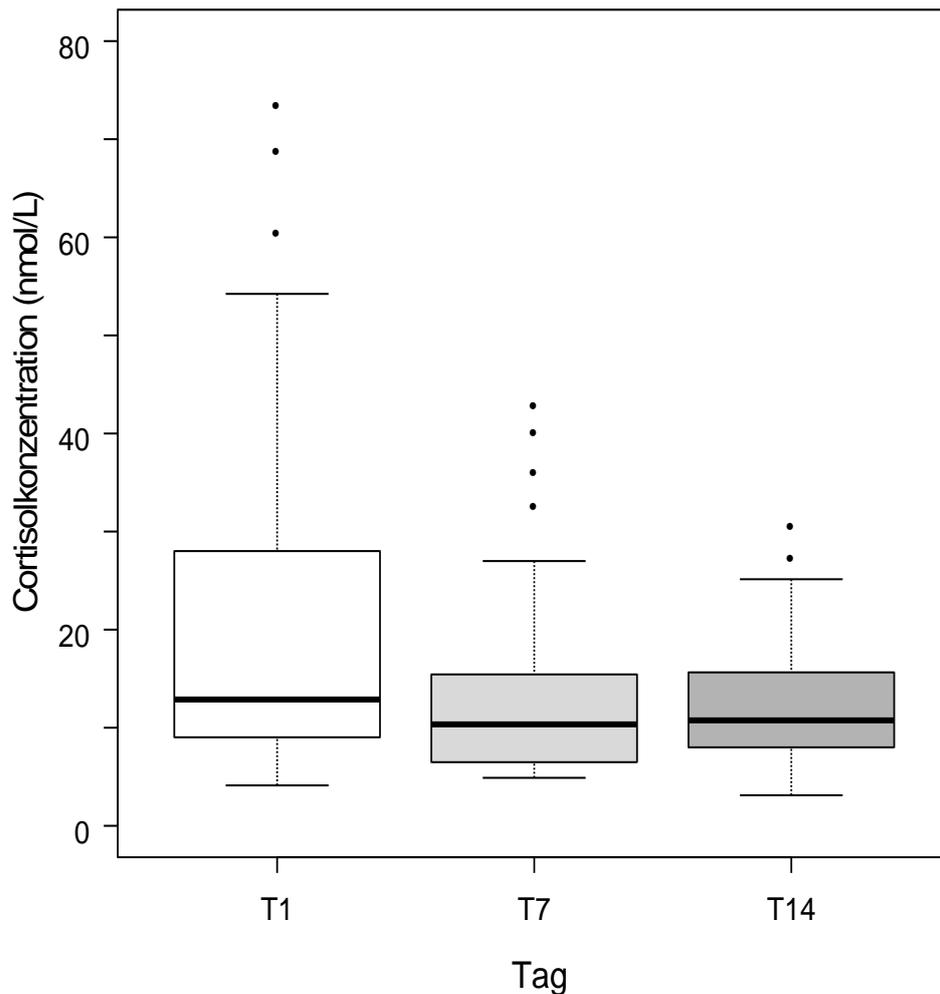


Abbildung 11: Darstellung der Cortisolkonzentration am Tag (nmol/L)

Die Tagescortisolkonzentration zeigte zwischen den Studientagen eins (N=41), sieben (N=34) und vierzehn (N=31) keinen signifikanten Unterschied.

3.3.5 Untersuchung von Interaktionseffekten

Die Interaktion zwischen den Einflussgrößen GA, PNA, Geschlecht, pränatale Steroidgabe und der Cortisolkonzentration wurde nach der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen anhand des linearen gemischten Modells überprüft. Zur statistischen Analyse wurde die Cortisolkonzentration des Messzeitpunktes 20:00 Uhr gewählt, da zu diesem Zeitpunkt die höchste Anzahl an Speichelproben vorlag. Signifikante Korrelationen zwischen der Cortisolkonzentration und dem GA (ANOVA: $\chi^2 = 0,03$, $df = 1$, $p = 0,872$), dem PNA (ANOVA: $\chi^2 = 1,56$, $df = 1$, $p = 0,211$), dem Geschlecht (ANOVA: $\chi^2 = 1,80$, $df = 1$, $p = 0,180$) und der pränatalen Steroidgabe (ANOVA: $\chi^2 = 0,22$, $df = 1$, $p = 0,637$) konnten nicht ermittelt werden.

3.4 Das Aktivitäts-/Ruheverhalten

3.4.1 Rhythmusanalyse

Zur Erstellung des Rhythmusprofils wurden nur vollständige Datenaufzeichnungen aller Studienkinder (N=62) über 24 Stunden berücksichtigt. Insgesamt konnten 151 vollständige Datensätze (84%) ausgewertet werden. Die Daten von 29 Aktivitätsaufzeichnungen (16%) lagen aufgrund von technischen Ausfällen, medizinischen Interventionen und Entlassungen vor Studienende nur unvollständig vor.

In der Rhythmusanalyse konnte bei allen Frühgeborenen eine circadiane oder ultradiane Aktivitätsrhythmik nachgewiesen werden (F-Test: $p < 0,001$) (Tabellen im Anhang S. 76-78). Zur Charakterisierung des Rhythmusverhaltens wurden die Periodenlängen näher betrachtet. Bei den Frühgeborenen dominierte eine vierstündige Periodenlänge in den ersten vier Lebenswochen (46 von 151 erhobenen Aktivitätsaufzeichnungen, 31%). Bei 12 Kindern wurde an einzelnen Studientagen eine Periodenlänge von 24 Stunden beobachtet. Die Periodenlängen der weiteren Studienkinder variierten zwischen 5 und 12 Stunden (Tabelle 5).

Im Verlauf des Erhebungszeitraumes zeigte sich eine zunehmende Tendenz in Richtung einer 12-stündigen Periodenlänge. An dem Untersuchungstag 14 wiesen 11 Frühgeborene (23%) eine 12-stündige Periodenlänge auf, während dies an Tag 1 bei sechs Frühgeborenen (11%) und an Tag 7 bei drei Frühgeborenen (6%) der Fall war.

Tabelle 5: Anzahl der beobachteten Periodenlängen der Aktivitätsphase

PL (h)	Alle Tage (N=151)	Studientag 1 (N=56)	Studientag 7 (N=47)	Studientag 14 (N=48)
4	46 (31%)	15 (27%)	14 (30%)	17 (35%)
5	21 (14%)	10 (18 %)	6 (13%)	5 (10%)
6	34 (22%)	11 (19%)	16 (34%)	7 (15%)
8	18 (12%)	9 (16%)	3 (6%)	6 (13%)
12	20 (13%)	6 (11%)	3 (6%)	11 (23%)
24	12 (8%)	5 (9%)	5 (11%)	2 (4%)

PL (h): Periodenlänge angegeben in Stunden; N: Ausgewertete Aktivitätsaufzeichnungen

Die graphische Darstellung der Aktivitäts-Rhythmusprofile zeigte, dass sich besonders die nächtlichen Aktivitätsfrequenzen der Frühgeborenen im Laufe des zweiwöchigen Beobachtungszeitraumes reduzierten (Abbildung 12).

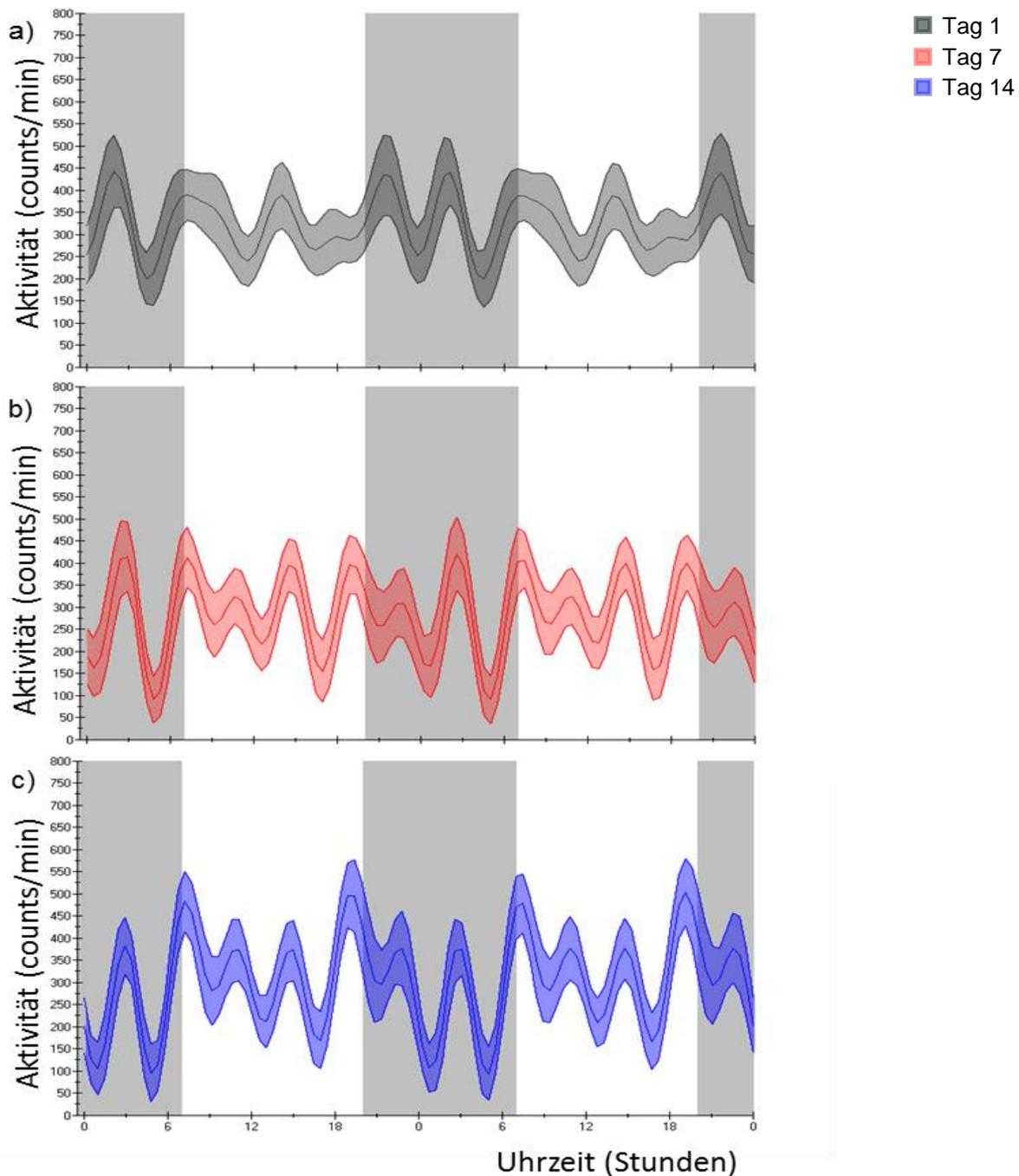


Abbildung 12: Darstellung des Aktivitäts-/Ruherhythmus der Frühgeborenen

24-Stundenprofil des Aktivitätsrhythmus der Frühgeborenen des a) ersten Studientages (N=56), b) siebten (N=47) und c) vierzehnten Studientages (N=48). Die Darstellung erfolgte mit dem Programm Chronosfit. Die Mittelwerte wurden mit ihrem 95%igen-Konfidenzintervall abgebildet. Der weiße Hintergrund stellt die Tagesperiode und der graue Hintergrund die Nachtperiode dar.

Die in der circadianen Rhythmusanalyse berechneten Variablen (Mesor, Peak, Tages- und Nachtmittelwerte) wurden zwischen den Studientagen statistisch geprüft. Die Frühgeborenen hatten in der ersten Untersuchungsnacht im Mittel signifikant höhere Aktivitätsfrequenzen ($329 \pm 185,1$ Units) als in der siebten Untersuchungsnacht ($260,2 \pm 132,4$ Units; Tukey-HSD: $z = 2,50$, $p = 0,03$). Die Mittelwerte der Aktivitätsaufzeichnungen der siebten und vierzehnten Nacht unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Abbildung 13).

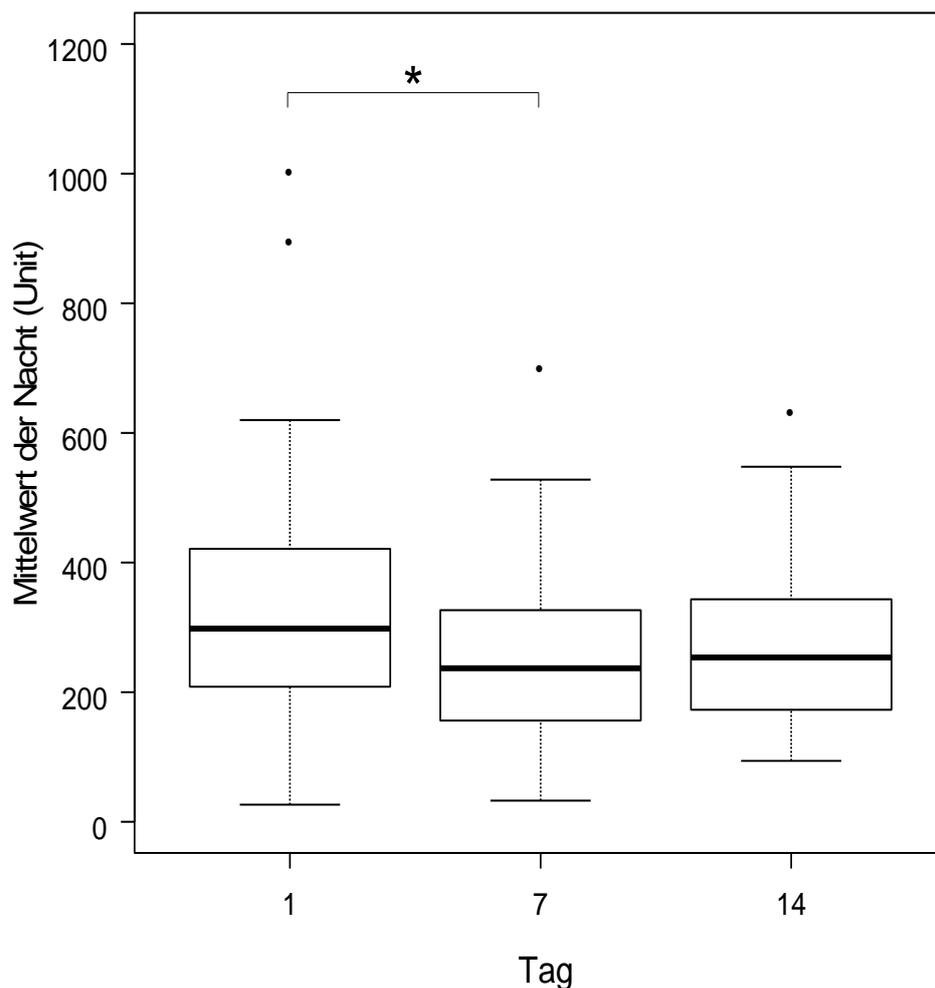


Abbildung 13: Darstellung der Nachtmittelwerte der Aktivitätsanalyse

Unit: counts/min. Die statistische Berechnung zeigte ein im Mittel signifikant höheres Aktivitätsniveau der Frühgeborenen in der ersten Untersuchungsnacht (N=56) im Vergleich zur siebten Studiennacht (N=47). Die Aktivitätsfrequenzen der siebten und vierzehnten Nacht unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

* $p < 0,05$

3.4.2 Ergebnisse der Aktivitätsanalyse anhand des ActiLife Scores

Die Aktivitätsaufzeichnungen wurden aus 153 Datensätzen (85% von 180 Datensätzen) mittels des Programms ActiLife Version 6 analysiert. Es konnten 27 Datenaufzeichnungen (15% von 180 Datensätzen) aufgrund eines instabilen Gesundheitszustandes der Kinder, technischer Störungen des Aktometers, medizinischer Interventionen (z.B. Fototherapien) oder einer Entlassung der Kinder vor Studienende nicht vollständig ausgewertet werden. Das Programm ActiLife bereinigt mit Hilfe eines Algorithmus unvollständige Datenaufzeichnungen ab einer Vektoraufzeichnung von Nullwerten über 60 Minuten. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der aufgezeichneten Datenlängen zwischen den drei Untersuchungstagen.

Die aufgezeichneten Aktivitätsfrequenzen der Frühgeborenen wurden in die drei folgenden Aktivitätsstufen, niedrig (Ruhephase), mittel (mittlere Aktivität) und hoch (hohe Aktivität), eingeteilt. Die Dauer der Ruhephase (Median = 15:54 h) war im Mittel signifikant länger als die Zeit in der mittleren (Median = 05:17 h; Tukey-HSD: $z = 13,56$, $p < 0,001$) und hohen Aktivitätsstufe (Median = 04:26 h; Tukey-HSD: $z = 16,29$, $p < 0,001$) (Abbildung 14).

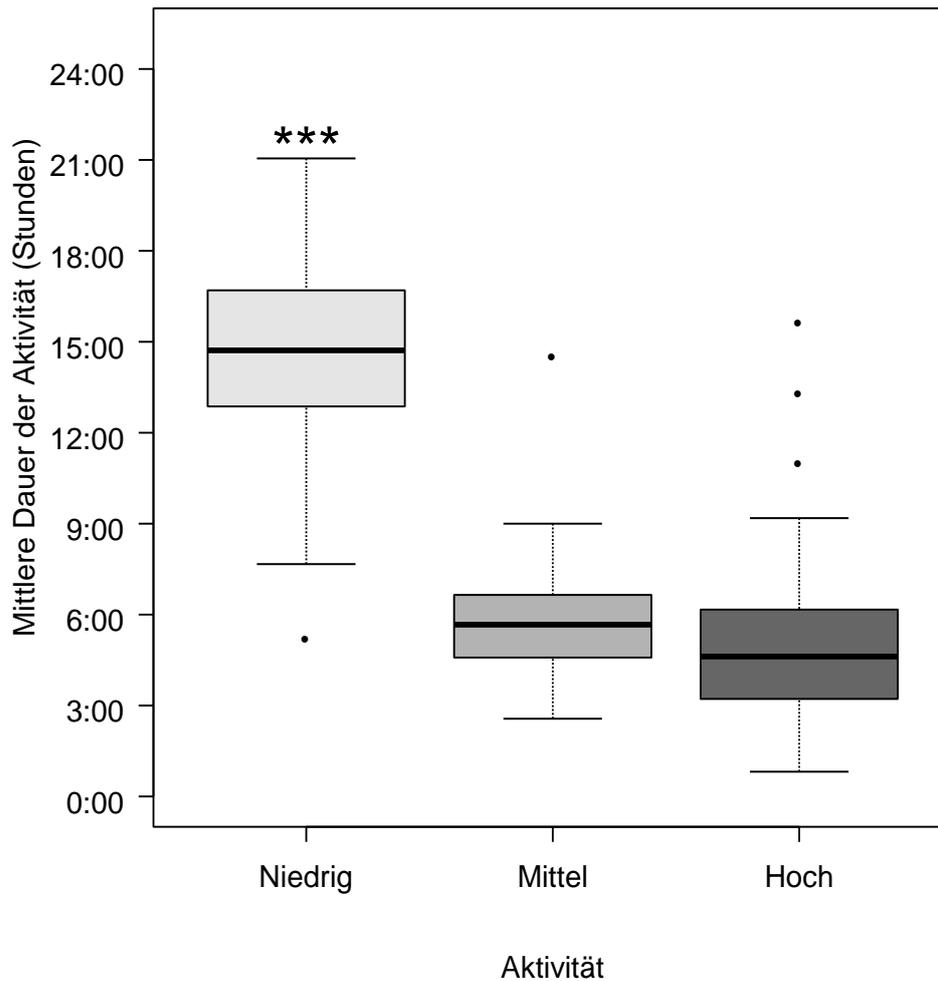


Abbildung 14: Vergleich der durchschnittlichen Dauer der drei Aktivitätsstufen

Aufzeichnung der durchschnittlichen Zeit pro Aktivitätsstufe. Aktivität niedrig: Ruhephase (Median = 15:54 Std.), mittel: mittlere Aktivität (Median = 05:17 Std.), hoch: hohe Aktivität (Median = 04:26 Std.).

*** $p < 0,001$

Während des zweiwöchigen Erhebungszeitraumes veränderte sich das Aktivitätsverhalten der Frühgeborenen. Die Frühgeborenen verbrachten am ersten Studientag einen signifikant niedrigeren prozentualen Anteil in der Ruhephase im Vergleich zu den Studientagen sieben (Tukey-HSD: $z = -3,33$, $p < 0,01$) und vierzehn (Tukey-HSD: $z = -2,54$, $p < 0,05$). So betragen die prozentualen Mittelwerte der Ruhephase (niedrige Aktivität) am ersten Studientag 55%, dagegen am siebten Tag 61% und am vierzehnten Tag 60%.

Der prozentuale Anteil der mittleren Aktivität zeigte sich mit 24% signifikant höher am ersten Untersuchungstag als am siebten mit 21% (Tukey-HSD: $z = 2,58$, $p < 0,05$) sowie am vierzehnten Tag mit 21% (Tukey-HSD: $z = 2,95$, $p < 0,01$).

Die mittlere Dauer der höchsten Aktivitätsstufe lag bei den Frühgeborenen am ersten Studientag bei 21%, an dem Studientag 7 bei 18% und dem Studientag 14 bei 19%, die prozentualen Mittelwerte zeigten aber keine signifikanten Unterschiede. Das Aktivitätsverhalten der Frühgeborenen wich an den Erhebungstagen sieben und vierzehn ebenfalls nicht signifikant voneinander ab (Abbildung 15).

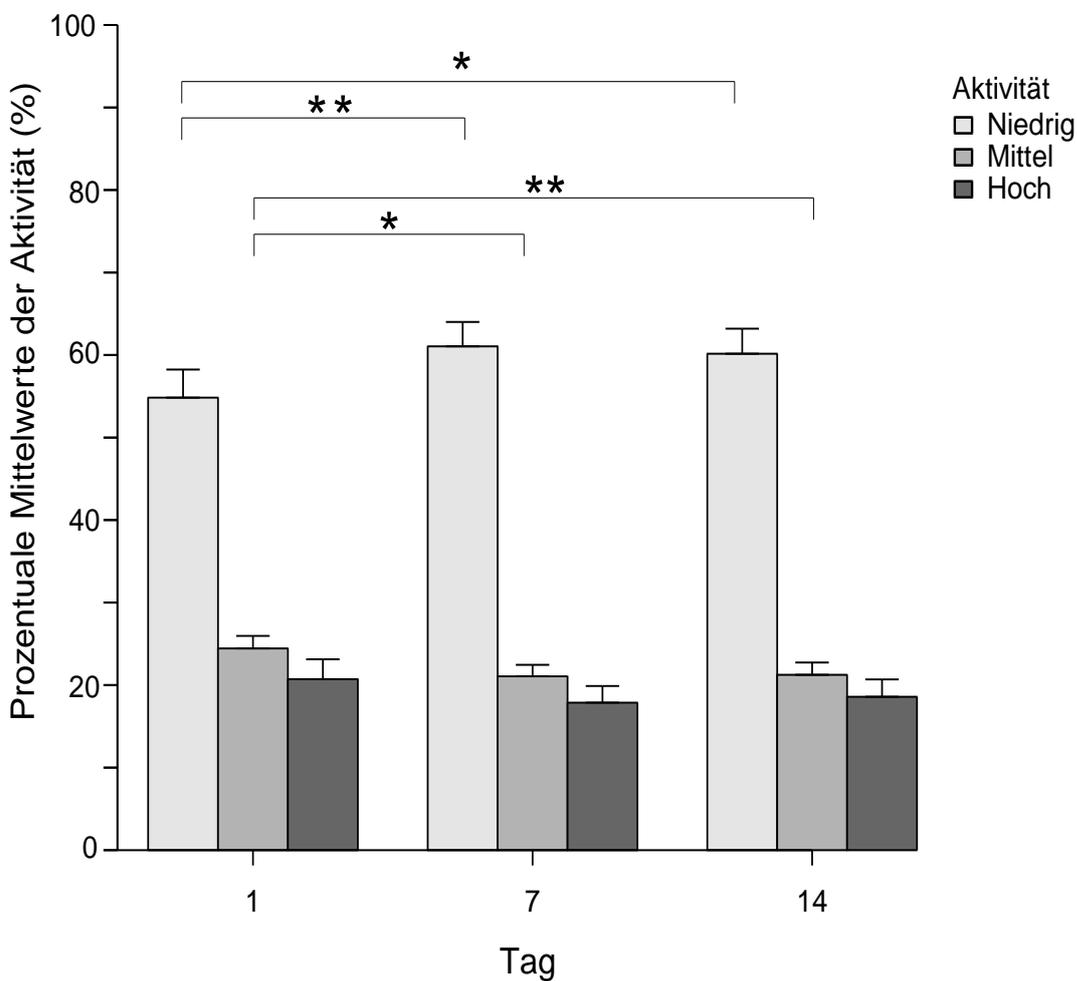


Abbildung 15: Prozentualer Anteil der Aktivitäts-/Ruhephasen

Der prozentuale Anteil der Ruhephase zeigte sich am ersten Studientag ($N=56$) signifikant niedriger als an den Untersuchungstagen sieben ($N=49$) und vierzehn ($N=48$). Dagegen lag der prozentuale Anteil der mittleren Aktivität am ersten Tag im Vergleich zum siebten und vierzehnten Tag signifikant höher.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

3.4.3 Die Entwicklung des Schlafverhaltens

Die prozentuale Gesamtschlafdauer der Frühgeborenen verlängerte sich von $66\% \pm 14\%$ an Studientag 1 auf $73\% \pm 12\%$ an Studientag 7 und $69\% \pm 13\%$ an Studientag 14. Die statistische Überprüfung erbrachte eine signifikante Zunahme der Schlafdauer zwischen den Studientagen 1 und 7 (Tukey-HSD: $z = 2,50$, $p < 0,05$). Im Vergleich zum vierzehnten Untersuchungstag ergab sich kein signifikanter Unterschied (Tukey-HSD: $z = 1,25$, $p = 0,41$) (Abbildung 16).

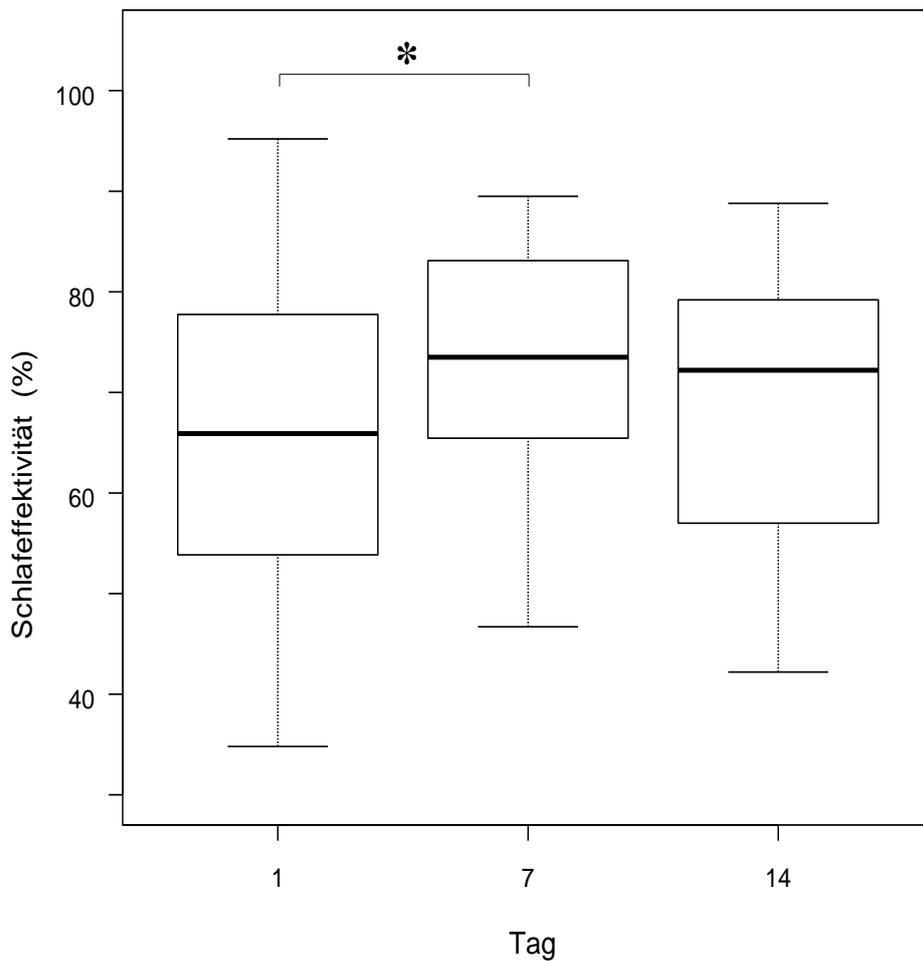


Abbildung 16: Prozentualer Anteil der Schlafphase

Die Schlafdauer der Frühgeborenen nahm vom ersten bis zum siebten Studientag signifikant zu.

* $p < 0,05$

3.4.4 Untersuchung der Interaktionseffekte

In der durchgeführten Regressionsanalyse konnte keine signifikante Korrelation zwischen dem Aktivitätsverhalten der Frühgeborenen und dem Gestationsalter oder Geschlecht nachgewiesen werden.

Eine negative Korrelation konnte zwischen dem postnatalen Alter und der Aktivität der Frühgeborenen gemessen werden. Das postnatale Lebensalter korrelierte signifikant mit den Tages- (ANOVA: $p < 0,05$) und Nachtmittelwerten (ANOVA: $p < 0,01$) der Aktivitätsfrequenzen. Mit einem zunehmenden postnatalen Alter der Frühgeborenen reduzierte sich die Stärke der Aktivitätsfrequenzen am Tag und in der Nacht (Abbildung 17).

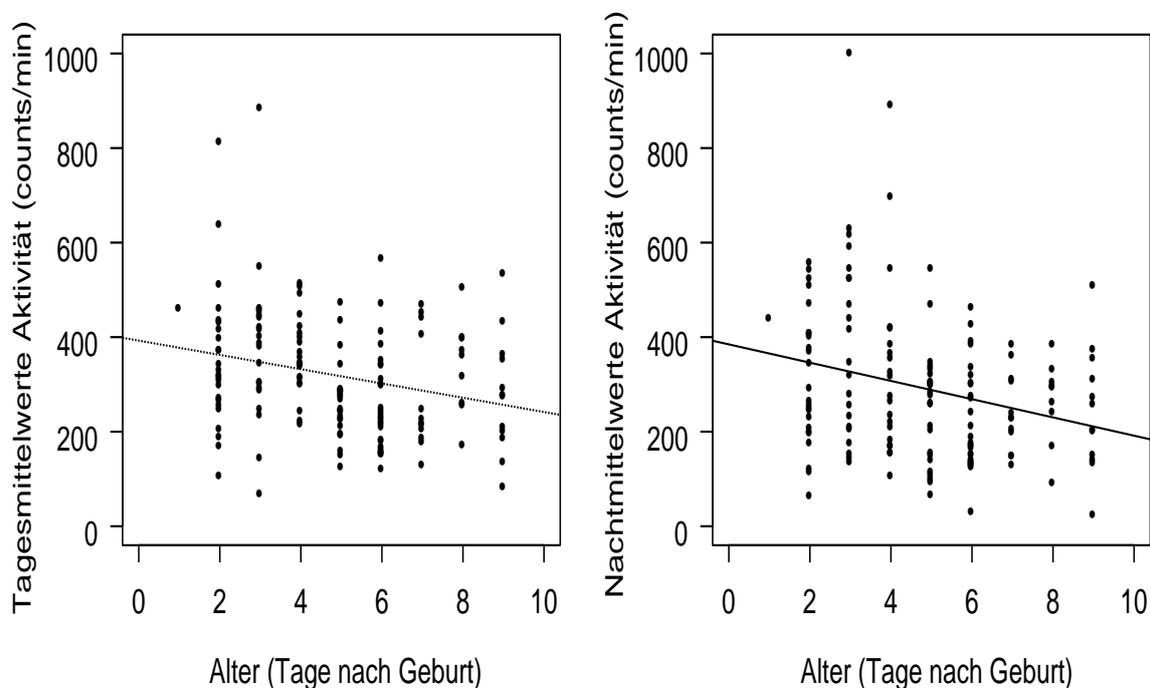


Abbildung 17: Korrelation zwischen Aktivität und postnatalem Alter

Die Aktivität der Frühgeborenen (N=151) wurde in der Anzahl der Bewegungen pro Minute (counts/min) gemessen. Die Aktivitätsfrequenzen wurden pro Tag und Nacht in Abhängigkeit vom postnatalen Alter dargestellt.

Diskussion

4.1 Stand der Wissenschaft

Die Entwicklung tagesperiodischer Zeitmuster ist für die Reifung von Frühgeborenen und Reifgeborenen ein wichtiger Prozess. Das Hormon Cortisol hat in der Ontogenese von Neugeborenen und Säuglingen eine wichtige Funktion, indem es zur Entwicklung vieler Enzyme, Organe und des Immunsystems sowie zur Gewichtszunahme beiträgt (Street et al., 2012). Circadiane Zeitmuster konnten bereits bei Feten nachgewiesen werden. Synchrone Aufzeichnungen der fetalen und mütterlichen Herzfrequenz deuteten auf parallele circadiane Rhythmen zwischen dem Fetus und der Mutter hin (Lunshof et al., 1998; Seron-Ferre et al., 2001). In experimentellen Untersuchungen an Laborratten wurde gezeigt, dass die Aktivität der fetalen suprachiasmatischen Kerne (SCN) durch den mütterlichen circadianen Rhythmus vorgegeben wird (Reppert & Schwartz, 1983). Diese Koordination wird durch das mütterliche Melatonin induziert, da eine Reduzierung des mütterlichen Melatonins zur Zunahme der Melatonin- und Dopamin D1-Rezeptoren in den fetalen SCN führte (Naitoh et al., 1998). Die fetale circadiane Rhythmik geht mit der Geburt verloren. Eine Frühgeburt unterbricht die Verbindung zwischen Fetus und Mutter vorzeitig, wodurch möglicherweise eine Verzögerung in der postnatalen Entwicklung des circadianen Regulationszentrums beim Frühgeborenen entstehen könnte (Mirmiran & Kok, 1991).

In der vorliegenden Literatur wird das Auftreten eines eigenständigen circadianen Rhythmus bei Frühgeborenen hinsichtlich hormoneller und physiologischer Parameter kontrovers diskutiert. Dauer und Frequenz der Datenerhebungen waren teilweise nicht ausreichend oder die Studienprotokolle unterschieden sich hinsichtlich der verwendeten Auswertungsmethoden (Weerth et al., 2003b). Einige Studien bestimmten zwei Messzeitpunkte am Morgen und am Abend und definierten das Auftreten eines circadianen Rhythmus anhand eines höheren Cortisolmesswertes am Morgen als am Abend (Antonini et al., 2000; Castro et al., 2000; Kidd et al., 2005; Krieger et al., 1971). Andere Studien untersuchten die Cortisolkonzentration in einem Drei-Stundenintervall und Sechs-Stundenintervall, erhoben aber keine Messungen in der Nacht (Bettendorf et al., 1998; Neu et al., 2007). Eine zu geringe Probenentnahmefrequenz kann dazu führen, dass Cortisolmessungen am Höhe- oder Tiefpunkt einer Fluktuation erfolgen und

folglich falsche Ergebnisse widerspiegeln (Price et al., 1983). Zur Bestimmung eines circadianen Rhythmus sind mindestens vier Messungen im Zeitfenster von 24 Stunden erforderlich (Lemmer, 2012). Um vergleichbare Ergebnisse erhalten zu können, ist eine hohe Frequenz der Probensammlung sowie eine einheitliche Methodik der Auswertung entscheidend (Weerth et al., 2003b).

Einige Arbeiten verwiesen auf eine parallele Entwicklung des Schlaf-/Wachrhythmus und des circadianen Cortisolrhythmus (Antonini et al., 2000; Castro et al., 2000; McMillen et al., 1991). Eine gleichzeitige Datenerhebung dieser beiden Parameter war in der vorliegenden Arbeit daher von großem Interesse.

4.2 Charakteristik des Patientenkollektivs

Die Fallzahlen in bisher durchgeführten Studien zur circadianen Rhythmusanalyse umfassten insgesamt 10 bis 40 Frühgeborene (Bettendorf et al., 1998; Economou et al., 1993; Kidd et al., 2005; Weerth et al., 2003b). Für die vorliegende explorative Studie wurde die Größe des Studienkollektivs empirisch auf ca. 60 Frühgeborene für die Aktivitätsmessungen und ca. 20 Frühgeborene für die Bestimmung der Cortisolkonzentration festgelegt.

Die Studienpopulation stellt sich in den bereits publizierten Studien hinsichtlich der Ein- und Ausschlusskriterien sehr unterschiedlich dar. Einige Studien rekrutierten zur Bestimmung des Cortisol-Profiles und des Aktivitätsverhaltens Frühgeborene mit einem Gestationsalter von 34 bis 36 SSW (Giganti et al., 2001a; Korte et al., 2001), andere Studien schlossen auch Frühgeborene mit einem Gestationsalter von 30 bis 34 SSW (Economou et al., 1993; Castro et al., 2000) oder frühgeborene Kinder <30 SSW (Kidd et al., 2005) ein. Bei dem Vergleich der verschiedenen Studien ist deswegen wichtig, die Heterogenität der Studienkollektive zu berücksichtigen. Die Studienpopulation der vorliegenden Arbeit schloss Frühgeborene mit einem Gestationsalter von 30<37 vollendeten Wochen ein. Die Gewinnung einer ausreichenden Speichelmenge ist ab diesem Gestationsalter gegeben.

Eingeschlossen wurden in der vorliegenden Studie Frühgeborene in einem stabilen Allgemeinzustand, um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Stress, Schmerz, Inflammation etc. möglichst auszuschließen. Zum anderen sollten instabile

Frühgeborene nicht durch Speichelentnahmen zusätzlich gestört werden. In den publizierten Studien wurden ebenfalls vorwiegend Frühgeborene mit einem stabilen Gesundheitszustand eingeschlossen (Economou et al., 1993; Kidd et al., 2005; Korte et al., 2001). Einige Studien wiederum untersuchten gezielt die Beeinflussung eines instabilen Gesundheitszustandes auf die Cortisolkonzentration (Economou et al., 1993; Scott & Watterberg, 1995).

In Bezug auf das postnatale Alter (PNA) der Frühgeborenen bei Studienbeginn unterscheiden sich die bisher veröffentlichten Studien ebenfalls voneinander. Einige Arbeiten untersuchten die Cortisolkonzentration und das Aktivitätsverhalten bereits in den ersten zwei Lebenswochen (Economou et al., 1993; Kidd et al., 2005; Korte et al., 2001). Andere Studien schlossen Frühgeborene erst ab der zweiten Lebenswoche ein (Castro et al., 2000) oder wählten als postnatales Alter bei Studieneinschluss eine sehr weite Altersspanne zwischen drei Lebenstagen und vier Wochen (Giganti et al., 2001a). In der vorliegenden Studie wurde bei Studienbeginn ein postnatales Alter <7 Tagen angestrebt, aber bis <10 Tagen akzeptiert.

4.3 Diskussion der Methodik

4.3.1 Bestimmung der Cortisolkonzentration im Speichel

Die Bestimmung der Cortisolkonzentration aus dem Speichel der Frühgeborenen stellt im Gegensatz zur Blutentnahme ein non-invasives Messverfahren dar, welches mit einem geringeren Stress für die Frühgeborenen verbunden ist (Ng et al., 2013). Das Hormon Cortisol wird zu 90% im Plasma an das cortisol-binding-globulin (CBG, Transcortin) und zu 7% an Albumin gebunden. Die Plasma-Cortisolkonzentration fluktuiert abhängig von der CBG-Menge und der Blutflussrate. Freies Cortisol (1-3%) wird in den Speichel abgegeben und ist daher unabhängig von der Blutflussrate messbar (Antonini et al., 2000; Santiago et al., 1996). Die Cortisolwerte der Speichelkonzentration korrelieren mit den Cortisolwerten im Plasma nach ACTH-Stimulation positiv (Calixto et al., 2002; Chou et al., 2011).

In der vorliegenden Literatur konnte zudem ein Zusammenhang zwischen der Nahrungsaufnahme, stressreichen invasiven Maßnahmen und einer steigenden Cortisolkonzentration im Speichel von Frühgeborenen nachgewiesen werden

(Weerth et al., 2003a). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Mindestabstand von zwei Stunden zur letzten Mahlzeit und zu stressreichen invasiven Maßnahmen eingehalten.

Die Speichelgewinnung mit kommerziellen Wattespitzen (Salivette, Sarstedt Inc.), die 10-15 Minuten im Mund der Frühgeborenen gelassen wurden, erbrachte laut Literaturangaben keine zufriedenstellenden Erfolgsraten (Herrington et al., 2004). Bei Verwendung der Salivetten wurde ein Verlust von 54% der Speichelproben durch Verdunstungen während der Aufbewahrung bei -4°C nachgewiesen (Herrington et al., 2004). Eine weitere Methode der Speichelgewinnung stellt die Aspiration des Speichels mit Hilfe eines Absaugsystems dar, welches auch zur Aspiration des Trachealsekretes verwendet wird (Antonini et al., 2000; Bettendorf et al., 1998). Durch die Aspiration des Speichels konnten ausreichende Volumina zur Cortisolbestimmung gesammelt werden, jedoch waren Verletzungen der Mundschleimhaut und Verunreinigung der Proben mit Blut nicht auszuschließen (Bettendorf et al., 1998). Neu entwickelte Schwammspitzen (BD VisispearTM, Salimetrics LLC) wurden in den letzten Jahren erfolgreich zur Speichelsammlung bei Neugeborenen eingesetzt (Donzella et al., 2008; Weerth et al., 2003a; Weerth et al., 2007). Aktuell liegen aber keine Daten zur Speichelgewinnung mit dieser Methodik bei Frühgeborenen vor. In einer Studie von Neu et al. (2007) wurden Filterpapiere untersucht, mit denen der Speichel der Frühgeborenen absorbiert und eine Aufbewahrung bis zu 6 Monaten garantiert werden konnte.

Mehrere Testansätze für die vorliegende Studie erreichten keine überzeugenden Resultate bei Verwendung der Schwammspitzen. Vielmehr erwies sich der Gebrauch universeller Wattestäbchen (\varnothing 10-11 mm, NOBA Verbandmittel Danz GmbH) am erfolgreichsten. Die Wattestäbchen besaßen eine ausreichende Saugfähigkeit, um Speichelvolumina bis zu 100 μl aufzusaugen. Auch war dem Pflegepersonal der Umgang mit dem Wattestäbchen durch den Gebrauch zur Mundhygiene vertraut. Insgesamt konnten 65% der Proben erfolgreich ausgewertet werden. Der hauptsächliche Verlust der gesammelten Speichelproben entstand durch Verdunstung des Speichels (25%) während des Aufbewahrens bei -20°C . Eine direkte Extraktion des Speichels nach der Entnahme und eine Lagerung der Proben bei tieferen Temperaturen bis zur Durchführung des ELISAs hätten eventuell den Verlust reduzieren können.

Nach Abschluss der vorliegenden Studie erschien eine Veröffentlichung, die eine vergleichbare Messmethode zur Speichelgewinnung von Frühgeborenen vorstellte (Ng et al., 2013). In der Studie konnten 85% verwertbare Proben mit einem Volumen von mindestens 100µl gewonnen werden. Im Vergleich zur vorliegenden Studie wurden kleinere Wattetupfer (Ø 5 mm) (Probact Swabs, UK) verwendet. Die Speichelproben wurden innerhalb von 24 Stunden weiterverarbeitet und bei -80°C aufbewahrt.

4.3.2 Erfassung des Aktivitäts-/Ruheverhaltens

In der Literatur wurden zur Aufzeichnung der Aktivitäts- und Ruhemuster von Reifgeborenen und Frühgeborenen verschiedene Methoden beschrieben, z.B. die Verwendung von Tagebüchern, drucksensitiven Matratzen, Videoaufnahmen oder die Aktographie (Giganti et al., 2001a; Glotzbach et al., 1995, Shimada et al., 1993). In Tagebuchaufzeichnungen wurde die motorische Aktivität der Neugeborenen durch die Eltern oder das Pflegepersonal jedoch oft unterschätzt, so dass dies eine zuverlässige und objektive Erfassung der kindlichen Aktivitätsmuster erschwerte (Sadeh et al., 2000).

In den letzten Jahren wurde die Aktographie als ein nicht-invasives Messverfahren immer häufiger angewendet, da es die Ermittlung quantitativ zuverlässiger Daten ermöglicht (Sadeh, 2011). Mit dem Aktometer ist eine Datenaufzeichnung über lange Studienzeiträume ortsunabhängig durchführbar. Zusätzlich registriert das Aktometer die Aktivitätsfrequenzen in einem engem Zeitraum von 60 Sekunden, wodurch präzise statistische Analysen ermöglicht werden (Sadeh, 2011; Sadeh & Acebo, 2002). Da teilweise passive Bewegungsaufzeichnungen von aktiven Bewegungen schwer zu differenzieren sind, wird eine parallele Logbuchführung zur Aktometermessung empfohlen (Sadeh, 2011).

Die Videographie ergibt ebenfalls eine sehr objektive und genaue Datenaufzeichnung. Die Anwendung dieser Methode ist im Vergleich zur Aktographie aber organisatorisch aufwendiger und ortsgebunden (Giganti et al., 2001a; Giganti et al., 2001b).

4.4 Diskussion der Ergebnisse

4.4.1 Rhythmusanalyse des Hormons Cortisol

Nur bei einem von 22 Frühgeborenen konnte ein circadianer Rhythmus der Cortisolkonzentration mit einer Periodenlänge von 24 Stunden am ersten Untersuchungstag beobachtet werden. Das Frühgeborene wurde mit einem Gestationsalter (GA) von 33+6 SSW geboren und war bei Eintritt in die Studie (=erster Untersuchungstag) drei Tage alt. Der circadiane Rhythmus des Frühgeborenen zeigte dennoch keine Stabilität über den Erhebungszeitraum hinweg, so dass er am siebten und vierzehnten Studientag nicht mehr darstellbar war. Bei den übrigen Frühgeborenen zeigte sich weder ein circadianer noch ein ultradianer Rhythmus bezüglich der Cortisolkonzentration im Untersuchungszeitraum.

Die aktuelle Literatur beschreibt, dass der circadiane Cortisolrhythmus bei Frühgeborenen intra- und interindividuell sehr unterschiedlich auftritt. Ein circadianer Cortisolrhythmus konnte bei Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von 31<34 SSW zwischen der 2.-16. postnatalen Lebenswoche mit einem medianen Auftreten in der 8. Lebenswoche beobachtet werden (Castro et al., 2000). In der Studie von Antonini et al. (2000) zeigten fünf von neun Studienkinder (55%) (mit einem GA von 31<34 SSW) zwischen der 2. und 8. Lebenswoche circadiane Cortisolschwankungen, bei den weiteren vier Frühgeborenen konnte ein circadianer Rhythmus erst ab der 12.-16. Lebenswoche beobachtet werden. Die Erhebung eines Cortisol-Profiles bei unreiferen Frühgeborenen mit einem GA <30 SSW fand keine circadiane Rhythmik (Kidd et al., 2005). Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass die beschriebenen Arbeiten den circadianen Rhythmus nur aus zwei Probenentnahmen, eine am Morgen und eine am Abend, bestimmten (Antonini et al., 2000; Castro et al., 2000; Kidd et al., 2005). Bettendorf et al. (1998) beschrieben bei drei von zehn Frühgeborenen (mit einem GA von 26<31 SSW) ein circadianes Muster der Cortisolkonzentration in der 2.-5. Lebenswoche. Neu et al. (2007) konnten bei vier von 26 Frühgeborenen (15%) (mit einem GA von 32<35 SSW) innerhalb der ersten zwei Lebenswochen eine circadiane Rhythmik des Hormons Cortisol beobachten.

Auch bei reifgeborenen Kindern konnte ein stabiler circadianer Cortisolrhythmus erst ab dem zweiten bis dritten Lebensmonat festgesellt werden (Antonini et al., 2000; Castro

et al., 2000; Klug et al., 2000; Weerth et al., 2003b). In der Veröffentlichung von Weerth et al. (2003b) wurde der Zusammenhang zwischen der Entwicklung des Aktivitäts-/Schlafverhaltens und der Reifung eines circadianen Cortisolrhythmus deutlich, so dass Reifgeborene mit dem Auftreten längerer Schlafphasen in der Nacht auch eher eine erhöhte Cortisolkonzentration am Morgen zeigten.

Die Ursache der hohen Instabilität und der interindividuellen Variabilität der circadianen Rhythmik bei Frühgeborenen in den ersten Lebenswochen könnte unter anderem auf eine funktionelle Unreife der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHN-Achse) zurückzuführen sein (Herrington et al., 2004). Die suprachiasmatischen Kerne des vorderen Hypothalamus sind eventuell nicht ausreichend entwickelt, um pulsatile Sekretionen des Hormons Cortisol regulieren zu können (Herrington et al., 2004). Bei Prüfung der HHN-Achse bei Frühgeborenen ließ sich mit Metyrapone eine im Normbereich liegende ACTH-Sekretion der Hypophyse provozieren (Battin et al., 2007). Bei Frühgeborenen mit einem Gestationsalter <28 SSW führten Stresssituationen aber zu einer inadäquaten Sekretion von Cortisol (Hanna et al., 1990).

Auch der auf einer Frühgeborenenintensivstation vorgegebene Stationsablauf mit festgelegten Fütterungs- und Versorgungszeiten über 24 Stunden könnte die individuelle Entwicklung des circadianen Rhythmus hinauszögern (Neu et al., 2007).

Ein genetischer Einfluss der Rhythmusentwicklung wurde anhand von Analysen bei eineiigen und zweieiigen Zwillingen nicht gefunden (Custodio et al., 2007). In der eigenen Untersuchung wurde wegen einer zu kleinen Fallzahl von einer statistischen Betrachtung der Parameter bei Zwillingspaaren abgesehen.

4.4.2 Die Tag-/Nachtcortisolkonzentration

Die gemessenen Cortisolkonzentrationen von Tag 1 (Streuung: 4,1–119,7 nmol/L), Tag 7 (Streuung: 3,2–65,8 nmol/L) und Tag 14 (Streuung: 3,1–50,0 nmol/L) stimmten mit den in der Literatur beschriebenen Messbereichen überein (Bettendorf et al., 1998; Economou et al., 1993; Neu et al., 2007). Signifikant höhere Werte der Cortisolkonzentration konnten in der vorliegenden Arbeit am ersten Untersuchungstag im Vergleich zum siebten und vierzehnten Studientag beobachtet werden (Abbildung 8). Dabei ließ die Aufteilung der Messwerte in Tages- und Nachtgruppen

erkennen, dass die Cortisolwerte in der ersten Untersuchungsnacht signifikant höher im Vergleich zu den folgenden Untersuchungs Nächten waren.

Auch in der Literatur wurde über eine höhere Cortisolkonzentration bei Frühgeborenen in den ersten Lebenswochen berichtet. Die Cortisolkonzentration der Frühgeborenen reduzierte sich kontinuierlich mit zunehmendem Lebensalter bis zu einer vergleichbaren Cortisolkonzentration von Reifgeborenen (Doerr et al., 1988; Economou et al., 1993; Metzger et al., 1993; Scott & Watterberg, 1995). Vergleichbar mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wiesen Frühgeborene signifikant höhere Cortisolwerte am Abend als am Morgen und Nachmittag auf (Economou et al., 1993; Kidd et al., 2005). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass medizinische Interventionen meistens am Tag durchgeführt werden und somit höhere Cortisolkonzentrationen am Abend verursachen (Economou et al., 1993). Um dies zu beweisen, sind aber weitere Studien notwendig.

Bei Reifgeborenen konnte gezeigt werden, dass es durch den Geburtsvorgang (vaginale Geburt) zu einer Erhöhung der Cortisolkonzentration in den ersten 18 bis 24 Stunden kam (Klug et al., 2000). Im Vergleich zu gesunden Reifgeborenen zeigten Frühgeborene eine signifikant höhere Cortisolkonzentration während der ersten 30 Lebenstage (Economou et al., 1993; Doerr et al., 1988). Dies ist möglicherweise auf einen schwierigeren Anpassungsprozess und auf stressreichere Umwelteinflüsse (z.B. intensivmedizinische Maßnahmen) zurückzuführen. Eine erhöhte Cortisolkonzentration konnten vor allem bei kranken Frühgeborenen, z.B. mit einem Atemnotsyndrom, Infektionen, Bradykardien, Asphyxien oder Pneumothoraces, gemessen werden (Gunes et al., 2006; Scott & Watterberg, 1995). Economou et al. (1993) verglichen die Cortisolkonzentrationen zwischen kranken (Atemnotsyndrom) und gesunden Frühgeborenen. Es zeigte sich eine signifikant höhere Cortisolkonzentration bei den erkrankten Frühgeborenen. Diese Differenz zeichnete sich jedoch erst nach dem dritten Lebenstag und nicht direkt nach der Geburt ab (Economou et al., 1993; Scott & Watterberg, 1995). Die in der vorliegenden Studie untersuchten Frühgeborenen mit sehr hohen Cortisolkonzentrationen benötigten besonders in den ersten Lebenstagen eine Atemhilfe in Form einer CPAP-Beatmung (continuous positive airway pressure) aufgrund einer Atemstörung. Notwendige medizinische und pflegerische Maßnahmen in den ersten Lebenstagen, die Trennung von der Mutter, Lärm- und Lichteinflüsse während des Stationsalltags stellen weitere Stressfaktoren dar, die eine erhöhte

Cortisolkonzentration bei Frühgeborenen im Vergleich zu gesunden Reifgeborenen erklären könnten (Economou et al., 1993). Interessanterweise zeigten Untersuchungen an erwachsenen Intensivpatienten, dass eine hohe Cortisolkonzentration in Stresssituationen den tagesperiodischen Cortisolrhythmus aufhob (Reincke et al., 1995). In Langzeitstudien wurde ermittelt, dass die Cortisolkonzentration bei Frühgeborenen noch im Kleinkindalter im Vergleich zu reifgeborenen Kindern erhöht war (Buske-Kirschbaum et al., 2007). Frühgeburtliche Stressfaktoren und Entwicklungsprozesse scheinen somit auf die Entwicklung der HHN-Achsen-Funktion einen langfristigen Einfluss zu nehmen.

4.4.3 Einflussfaktoren auf die Cortisolkonzentration

Die vorliegende Studie zeigte keinen signifikanten Einfluss des Gestationsalters, des postnatalen Alters, des Geschlechts oder einer pränatalen Steroidtherapie auf die Cortisolkonzentration im Speichel von Frühgeborenen in den ersten Lebenswochen.

In der Literatur korrelierte die Cortisolkonzentration negativ mit dem Gestationsalter. Je reifer die Frühgeborenen bei der Geburt waren, desto niedriger war die Cortisolkonzentration (Chou et al., 2011; Neu et al., 2007; Scott & Watterberg, 1995). Ein derartiger Zusammenhang zeigte sich in der vorliegenden Studie nicht. Dies könnte mit der relativ geringen Fallzahl zusammenhängen. Über einen Zusammenhang zwischen der Cortisolkonzentration und dem postnatalen Alter oder dem Geschlecht der Frühgeborenen liegen in der vorliegenden Literatur bisher keine Angaben vor (Neu et al., 2007; Scott & Watterberg, 1995).

Einige Studien beobachteten keinen Einfluss einer pränatalen Steroidtherapie (Betamethason) auf die basalen postnatalen Cortisolwerte der Frühgeborenen (Battin et al., 2007; Davis et al., 2004; Davis et al., 2006; Schaffer et al., 2009). Die Zeitspanne zwischen pränataler Steroidbehandlung und Messung der Cortisolwerte nach Geburt variierte in den Studien jedoch zwischen 1-21 Tagen (Battin et al., 2007; Davis et al., 2004; Davis et al., 2006; Schaffer et al., 2009). Andere Studien erfassten dagegen bis sieben Tage nach der Geburt eine geringere Cortisolkonzentration bei Frühgeborenen mit einer pränatalen Steroidgabe an die Mutter im Vergleich zu Frühgeborenen ohne pränatale Steroidtherapie (Buyukkayhan et al., 2009; Kairalla, 1992). Frühgeborene mit pränataler Steroidtherapie der Mutter reagierten zudem auf einen Stressreiz (z.B.

Blutabnahme) mit einer absinkenden oder gleichbleibenden Cortisolkonzentration (Davis et al., 2006). Diese Frühgeborenen zeigten aber interessanterweise einen stärkeren Herzfrequenzanstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe, welcher möglicherweise kompensatorisch bei einem fehlenden Cortisolanstieg auftrat (Davis et al., 2006). Bei Frühgeborenen ohne pränatale mütterliche Steroidgabe konnte nach Schmerzreiz ein Anstieg der Cortisolkonzentration gemessen werden (Davis et al., 2004; Davis et al., 2006; Schaffer et al., 2009). Alle aufgeführten Untersuchungen fanden keinen Unterschied zwischen einer einmaligen (12 mg) oder zweimaligen (2x12 mg) Steroidgabe (Davis et al., 2004; Davis et al., 2006; Schaffer et al., 2009).

4.4.4 Rhythmusanalyse der Aktivität

Die Rhythmusanalyse der vorliegenden Arbeit zeigte bei den Frühgeborenen eine überwiegende ultradiane Aktivitätsrhythmik. Unter den ultradianen Rhythmen konnte vorrangig eine vierstündige Periodenlänge beobachtet werden. Eine circadiane Aktivitäts-Ruhe-Rhythmik war bei den Frühgeborenen nicht stabil vorhanden und wurde immer wieder von einer ultradianen Rhythmik überlagert.

Bei Frühgeborenen und Reifgeborenen konnte bezüglich der Körpertemperatur, der Herzfrequenz, des Blutdrucks und der Aktivität bereits in den ersten Lebenswochen ein circadianer Rhythmus festgestellt werden (Mirmiran & Kok, 1991; Glotzbach et al., 1995). Der circadiane Rhythmus (GA 34<36 SSW) entwickelte sich bei Frühgeborenen im Vergleich zu Reifgeborenen allerdings verzögert (Korte et al., 2001). Die Beobachtungen von Korte et al. (2001) stellten dar, dass bei reifgeborenen Kindern circadiane Zeitmuster in Hinblick auf das Aktivitätsverhalten bereits in der ersten Lebenswoche nachweisbar waren, bei Frühgeborenen dominierte dagegen in den ersten zwei Lebenswochen eine ultradiane Rhythmik. In der Studie von Glotzbach et al. (1995) wurde die Aktivitätsrhythmik von Frühgeborenen (GA >29 SSW, PNA >1 Woche) an drei aufeinander folgenden Tagen untersucht. Vergleichbar mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit zeigten die untersuchten frühgeborenen Kinder eine ultradiane Aktivitätsrhythmik mit einer Periodenlänge von drei bis vier Stunden. In der Veröffentlichung von Mirmiran & Kok (1991) wurde der Aktivitätsrhythmus von Frühgeborenen (GA 26<32 SSW) einmalig über 24 Stunden in der 2.-8. Lebenswoche untersucht. Die Analysen zeigten bei einem Frühgeborenen eine circadiane Rhythmik.

Die weiteren elf Kinder wiesen weder ein ultradianes noch ein circadianes Aktivitäts-Ruhe-Muster auf. Die Frühgeborenen befanden sich in dieser Studie von Mirmiran & Kok (1991) unter konstanten Tag-Nacht-Lichtverhältnissen, wodurch eventuell die Entwicklung eines ultradianen oder circadianen Rhythmus verzögert wurde. Andere Arbeiten beobachteten ein circadianes und ultradianes Aktivitäts-Ruhe-Muster bei frühgeborenen und reifgeborenen Kindern erst ab dem zweiten Lebensmonat (Antonini et al., 2000; Castro et al., 2000; McMillen et al., 1991; Nishihara et al., 2002; Shimada et al., 1993). Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese von Antonini et al. (2000) und Castro et al. (2000), dass sich tagesperiodische Zeitmuster sowohl auf Aktivitätsebene als auch auf hormoneller Ebene parallel entwickeln. Es muss hierbei beachtet werden, dass die o.g. Studien die Aktivitätsrhythmik anhand von Tagesprotokollen ermittelten, während Korte et al. (2001) die Aktivitäts-Ruhe-Rhythmen aktographisch erfassten. Durch die zuverlässigere und präzisere Datenaufzeichnung mit Hilfe des Aktometers konnten circadiane und ultradiane Schwankungen in der Arbeit von Korte et al. (2001) eventuell früher beobachtet werden.

Die spätere Entwicklung des circadianen Rhythmus bei Frühgeborenen im Vergleich zu Reifgeborenen kann wie bei der Entwicklung der Tagesrhythmik von Cortisol auf eine ungenügende Reife des zentralen Schrittmachers und unausgereifte Perzeption externer Einflussfaktoren zurückzuführen sein. Es gibt Hinweise, dass der Myelinisierungsprozess des Nervus opticus (Sehnerv) erst nach 40 SSW beendet ist und neuronale Mechanismen zwischen dem SCN und der Retina erst ab dem 3. Lebensmonat funktionstüchtig entwickelt sind (Magoon & Robb, 1981). Exogene Zeitgeber wie Licht, Nahrungsaufnahme und soziale Interaktionen könnten somit erst nach Abschluss des Reifungsprozesses einen wesentlichen Einflussfaktor darstellen (Giganti et al., 2001a; McMillen et al., 1991). Bisher konnte nicht eindeutig geklärt werden, wann die anatomischen und funktionellen Strukturen bei früh- und reifgeborenen Kindern für die Entwicklung einer Tagesrhythmik ausgereift sind (McMillen et al., 1991). Glotzbach et al. (1995) stellten eine Korrelation zwischen den ultradianen Periodenlängen der Aktivitätsrhythmik von vier bis sechs Stunden und den Interventions- und Versorgungszeiten der Frühgeborenen auf der Frühgeborenenstation fest. In der Studie von Korte et al. (2001) wurde ebenfalls ein Zusammenhang zwischen den festgelegten

Abständen der Nahrungsaufnahme und der Entwicklung ultradianer Rhythmen vermutet, wodurch die Entstehung einer circadianen Rhythmik eventuell verzögert wird (Korte et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich auf den beiden neonatologischen Stationen (I7 und 042) eine Abnahme der Beleuchtungsstärke in der Nacht im Vergleich zu den Lichtverhältnissen am Tag. In der Literatur lassen sich Hinweise darauf finden, dass eine Berücksichtigung der Tag-Nacht-Lichtverhältnisse auf den Stationen sich sowohl auf die Stabilität der Herzfrequenz, die Sauerstoffsättigung, die Zunahme des Gewichtes als auch auf die Entwicklung eines circadianen Rhythmus positiv auswirken (Vásquez-Ruiz et al., 2013). Auf Frühgeborenenintensivstationen wurde in den letzten Jahren zunehmend eine Hell-/Dunkel-Atmosphäre in Anlehnung an die Tagesrhythmik geschaffen, um Frühgeborene in ihrer Reifung der circadianen Rhythmik bereits ab den ersten Lebenswochen zu unterstützen (McMillen et al., 1991; Shimada et al., 1993).

4.4.5 Betrachtung des Aktivitäts-/Ruheverhaltens

Die vorliegende Arbeit zeigte, dass die Frühgeborenen in der Nacht des ersten Untersuchungstages aktiver als an den folgenden Studientagen waren. Die Messungen des Aktivitätsverhaltens anhand des ActiLife-Scores belegten, dass die Frühgeborenen besonders am ersten Studientag sehr aktiv waren, wohingegen die Bewegungsfrequenzen im weiteren Studienverlauf abnahmen und die Ruhephasen zunahmten. Auch nahm die Gesamtschlafzeit der Frühgeborenen im Verlauf der Studie zu.

Frühgeborene und Feten weisen in ihrem Aktivitätsverhalten interessante Parallelen auf. In zwei älteren Untersuchungen wurde beobachtet, dass Feten wie Frühgeborene mehr Aktivität in der Nacht zeigten (Patrick et al., 1982; Roberts et al., 1979). Zusätzlich ergab sich eine vergleichbare Dauer der Schlaf- und Wachphasen von Frühgeborenen und Feten (Vries et al., 1987). Bei Frühgeborenen (34-36 SSW) konnte eine Zunahme der Schlafphase in der Nacht ab dem 4. bis 8. postnatalen Lebenstag beobachtet werden, während sich das Schlafverhalten tagsüber zunächst nicht veränderte (Korte et al., 2001). Reifgeborene Kinder zeigten dagegen bereits in der ersten Lebenswoche ein deutliches Tag-Nacht-Muster mit einer längeren Schlafperiode in der Nacht als am Tag (Ardura et al., 1995; Korte et al., 2001). Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit berichteten Giganti et al. (2001a, 2006) über einen Anstieg der

Ruhephase von Frühgeborenen (GA 33<36 SSW) in den ersten Lebenswochen. Videoaufzeichnungen zeigten zudem, dass frühgeborene Kinder (GA 33<36 SSW) in den ersten postnatalen Lebenswochen längere Wachphasen zwischen 02:00 Uhr und 05:00 Uhr als tagsüber aufwiesen (Giganti et al., 2001a; Giganti et al., 2001b). Auch hatten Frühgeborene mehr aktive als ruhige Schlafphasen in den ersten Lebenswochen bis zum Erreichen des errechneten Geburtstermins (Giganti et al., 2006; Cioni & Prechtel, 1990). Reifgeborene zeigten hingegen längere Wachperioden am Spätnachmittag und Abend zwischen 17:00 Uhr bis 20:00 Uhr vergleichbar zu Erwachsenen (Giganti et al., 2001a; Giganti et al., 2001b; Glotzbach et al., 1995). In der Studie von Shimada et al. (1993) konnten dagegen keine Unterschiede zwischen dem Aktivitätsmuster der Frühgeborenen am Tag und in der Nacht ermittelt werden. Shimada et al. erfassten das Aktivitätsverhalten anhand von Tagebüchern, wobei Giganti et al. und Korte et al. eine präzisere Datenerfassung mittels Videoaufnahmen und Aktographie gewählt hatten. In der Regulierung des menschlichen circadianen Rhythmus hat das Hormon Melatonin einen wichtigen Einfluss. Melatonin wird hauptsächlich in der Nacht sezerniert und erreicht auch in der Muttermilch seine höchsten Konzentrationen in der Nacht (Illnerova et al., 1993). Aktuelle Studien belegten, dass Stillen im Gegensatz zur Flaschennahrung zu einer längeren Schlafphase der Säuglinge führte (Cohen Engler et al., 2012). In Langzeitstudien wurde das Schlaf- und Wachverhalten von Frühgeborenen mit dem Schlafmuster von reifgeborenen Kindern im 12. und 20. Lebensmonat verglichen. Frühgeborene wiesen auch im ersten und zweiten Lebensjahr einen höheren Anteil aktiver Schlafphasen in der Nacht und eine schlechtere Schlafqualität als reifgeborene Kinder auf (Asaka & Takada, 2010; Gossel-Sybank et al., 2004; Wolke et al., 1995). Auch Kinder mit einem Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom (ADHS) haben häufig ein unruhigeres Schlafverhalten in der Nacht (Gossel-Sybank et al., 2004). Epidemiologische Studien zeigten, dass frühgeborene Kinder häufiger als reifgeborene Kinder an ADHS erkrankten (Pugliese et al., 2013). Weitere Untersuchungen sind aber notwendig, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Ausbildung eines ADHS-Syndroms und gestörten Schlafmustern bei Frühgeborenen festzustellen.

4.5 Limitierende Faktoren der vorliegenden Studie

Die Studienpopulation war relativ heterogen bezüglich des Gestationsalters und postnatalen Alters. Während des Studienzeitraumes kam es bei einigen Kindern zu interkurrenten Erkrankungen und Problemen, die sich möglicherweise auf die Ergebnisse ausgewirkt haben. Bei einigen Frühgeborenen wurde die Speichelentnahme durch eine sehr trockene Mundflora erschwert. Fototherapie oder Medikamente können unter anderem eine verminderte Speichelsekretion verursachen (Ng et al., 2013).

Auf parallele Logbuchaufzeichnungen oder Videoaufnahmen wurde verzichtet, da Studien eine hohe Übereinstimmung zwischen Logbuchaufzeichnungen und der Aktometeranalyse gezeigt hatten (Sadeh, 1996). Durch eine parallele Tagebuchführung hätten passive Bewegungen möglicherweise noch besser gefiltert werden können.

Bei der Auswertung des Aktivitäts-Ruhe-Verhaltens mit dem ActiLife-Score wurde ein Algorithmus verwendet, der für Reifgeborene im Alter von zwei bis vier Wochen entwickelt worden war, weil noch kein spezieller Algorithmus für Frühgeborene vorlag. Die Studiendurchführung auf zwei unterschiedlichen Stationen könnte die Untersuchungsergebnisse beeinflusst haben, da sich die Pflegestationen z.B. hinsichtlich des Stationsablaufes, der Lichtverhältnisse und des Geräuschpegels unterschieden. Die meisten Studienkinder wurden in den ersten Lebenstagen intensivmedizinisch versorgt und danach auf die Spezialstation verlegt. Sie befanden sich somit konsekutiv auf beiden Stationen.

4.6 Stärken der vorliegenden Studie

Die vorliegende Studie war prospektiv mit klar definierten Ein- und Ausschlusskriterien angelegt. Sie wurde unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Die Fallzahl war mit 62 Frühgeborenen für die Analyse des Aktivitäts-/Ruheverhaltens und 22 Frühgeborenen für die Untersuchung der Tag-/Nachtrhythmik der Cortisolkonzentration im Vergleich zu anderen Studien relativ groß. Die Fallzahlen in bisher durchgeführten Studien zur Analyse des Aktivitäts-/Ruheverhaltens umfassten 10 bis maximal 20 Frühgeborene (Castro et al., 2000; Giganti et al., 2001a; Giganti et al., 2001b; Glotzbach et al., 1995; Korte et al., 2001). Bisherige Studien zur Bestimmung circadianer Schwankungen der Cortisolkonzentration umfassten eine Gesamtpopulation von 10 bis 40 Frühgeborenen (Antonini et al., 2000; Bettendorf et al., 1998; Economou

et al., 1993; Weerth et al., 2003b). Diese Zahlen verdeutlichen, wie schwierig es ist, Frühgeborene für derartige klinische Studien zu rekrutieren.

In einigen Studien erfolgte die Bestimmung der circadianen Cortisolchwankungen nur durch eine Messung am Morgen und eine weitere am Abend (Antonini et al., 2000; Castro et al., 2000; Kidd et al., 2005; Krieger et al., 1971). Zudem führten die Studien keine Messungen in der Nacht durch (Bettendorf et al., 1998; Neu et al., 2007). Im Vergleich dazu wurden in der vorliegenden Arbeit sechs Speichelproben pro 24 Stunden entnommen, wodurch eine genauere Erfassung des Cortisol-Profiles erfolgen konnte.

Durch die Aufzeichnung des Aktivitäts-/Ruheverhaltens mit Hilfe eines Aktometers wurde eine objektive, Untersucher-unabhängige sowie Orts-unabhängige Datenaufzeichnung über einen längeren Zeitraum gewährleistet (Sadeh, 2011). Da einige Arbeiten auf eine parallele Entwicklung des Schlaf-/Wachrhythmus und des circadianen Cortisolrhythmus verwiesen (Antonini et al., 2000; Castro et al., 2000; McMillen et al., 1991), wurden in der vorliegenden Arbeit Cortisolkonzentration und Aktivitäts-/Ruheverhalten zu gleichen Zeitpunkten erfasst.

Eine angepasste Hell-/Dunkel-Atmosphäre in Anlehnung an die Tagesrhythmik unterstützt die Reifung der circadianen Rhythmik bei Frühgeborenen und Neugeborenen (McMillen et al., 1991; Shimada et al., 1993). Die Erfassung der Lichtverhältnisse über 24 Stunden konnte auf beiden neonatologischen Stationen (I7 und 042) eine optimale Abnahme der Beleuchtungsstärke in der Nacht im Vergleich zu den Lichtverhältnissen am Tag zeigen.

Die Untersuchungen für die vorliegende Studie erfolgten ausschließlich nicht-invasiv. Die Gewinnung von Speichel mit Wattestäbchen erfolgte nicht nur ohne Schmerzreiz, sondern konnte in gewisser Weise auch das natürliche Saugbedürfnis der Kinder befriedigen. Die Anwendung von Aktometern zur Messung des Aktivitätsverhaltens schränkte die Bewegungsfreiheit der Kinder nicht ein.

4.7 Schlussfolgerungen

Bei der Mehrheit der Frühgeborenen konnte weder ein stabiler circadianer noch ein ultradianer Rhythmus der Cortisolkonzentration in den ersten Lebenswochen nachgewiesen werden. Nur wenige Frühgeborene zeigten eine Entwicklung zu einer circadianen Rhythmik ihres Aktivitäts- und Ruheverhaltens. Dagegen dominierte eine ultradiane Aktivitäts-Ruhe-Rhythmik mit einer vierstündigen Periodenlänge. Erkenntnisse zur circadianen Rhythmusentwicklung von Frühgeborenen sind für Behandlungsprozesse und Umgebungsgestaltungen von großem Interesse. Ein besseres Verständnis der Entwicklung von biologischen Rhythmen bei Frühgeborenen und ihre intra- und interindividuellen Unterschiede könnten für die Pflege und medizinische Behandlung dieser Kinder von großer Bedeutung sein.

Die Frühgeborenen zeigten bei einem Lebensalter von durchschnittlich vier Tagen vor allem nachts eine signifikant höhere Cortisolkonzentration als eine und zwei Wochen später. Eine parallele Aufzeichnung des Aktivitäts- und Ruheverhaltens erfasste auch eine höhere Aktivität der Frühgeborenen in der ersten Untersuchungsnacht als eine und zwei Wochen später. Der prozentuale Anteil der Ruhephasen nahm im Verlauf der zweiwöchigen Beobachtungszeit zu, während der Anteil der mittleren Aktivitätsstufe abnahm. Eine höhere Cortisolkonzentration und eine stärkere Aktivität der Frühgeborenen zu Beginn des Untersuchungszeitraumes lassen sich möglicherweise auf einen stressreichen Anpassungsprozess bzw. die intensivmedizinische Behandlung in den ersten Lebenswochen zurückführen.

Weitere Forschungsaktivitäten sind notwendig, um einen eventuellen Zusammenhang zwischen Krankheiten, Stressreizen und frühen Veränderungen des Aktivitäts-Ruhe-Verhaltens sowie der Cortisolkonzentration zu erkennen. Möglicherweise lässt sich dann künftig die Erfassung des Aktivitätsmusters von Frühgeborenen für die Optimierung ihrer Pflege und Behandlung nutzen.

Zusammenfassung

Hintergrund: Viele physiologische Funktionen des Menschen wie Hormonsekretion, Schlaf-Wach-Rhythmus oder Körpertemperatur unterliegen einem sich regelmäßig wiederholenden Muster, dem biologischen Rhythmus. Externe Umwelteinflüsse wie Licht, Temperatur, Nahrungsaufnahme und soziale Kontakte stellen entscheidende externe Zeitgeber dar, die zur Ausbildung biologischer Rhythmen beitragen und endogene Rhythmen fortwährend synchronisieren. Bereits bei Feten können circadiane Rhythmen, getriggert durch die Mutter, beobachtet werden. Nach der Geburt muss sich diese „innere Uhr“ in Synchronisation mit den externen Zeitgebern erst wieder neu einstellen. Frühgeborene sind in den ersten Lebenstagen zudem oft unausweichlichen Stressfaktoren durch intensivmedizinische, diagnostische, therapeutische oder pflegerische Maßnahmen ausgesetzt. Über die Entwicklung von circadianen Rhythmen bei Frühgeborenen gibt es in der Literatur bislang nur wenige und teilweise widersprüchliche Daten.

In der vorliegenden Studie wurde bei Frühgeborenen die Reifung des endogenen Rhythmus bezüglich des Aktivitäts-Ruhe-Verhaltens und der Cortisolkonzentration im Speichel in den ersten Lebenswochen untersucht.

Methodik: 62 Frühgeborene mit einem Gestationsalter von 30<37 SSW und einem postnatalen Alter <10 Lebenstagen wurden in die Studie eingeschlossen. An den Studientagen 1, 7 und 14 wurde bei allen Studienkindern über 24 Stunden das Aktivitäts-Ruhe-Verhalten mit Hilfe eines Aktometers aufgezeichnet. Bei 22 dieser Frühgeborenen wurden zusätzlich an den drei genannten Studientagen zu je sieben standardisierten Zeitpunkten Speichelproben für die Bestimmung (ELISA) der Cortisolkonzentration entnommen. Die Berechnung der Tag-Nacht-Rhythmik erfolgte mittels der Lomb-Scargle-Methode (Least Squares Spectral Analysis (LSSA)) und die Auswertung der Daten anhand eines angepassten linear gemischten Modells.

Ergebnisse: Eine circadiane Rhythmik bezüglich des Hormons Cortisol konnte nur bei einem Frühgeborenen am ersten Studientag beobachtet werden. Ansonsten ließ sich weder ein circadianer noch ultradianer Rhythmus der Cortisolkonzentration erkennen. Am ersten Studientag war die Cortisolkonzentration im Mittel des gesamten Tages

(= 24 Std.) signifikant ($p < 0,05$) höher als an den darauffolgenden Studientagen (Gesamttag 1: Median=16,5 nmol/L, Gesamttag 7: Median=9,8 nmol/L; Gesamttag 14: Median=10,0 nmol/L). Besonders die nächtliche Cortisolkonzentration der Frühgeborenen reduzierte sich signifikant ($p < 0,05$) im Studienverlauf (Nacht 1: Median=17,1 nmol/L; Nacht 7: Median=9,6 nmol/L; Nacht 14: Median=9,8 nmol/L).

Das Aktivitäts-Ruhe-Verhalten der Frühgeborenen wurde durch einen ultradianen Rhythmus mit einer vierstündigen Periodenlänge in den ersten Lebenswochen dominiert. Bei 12 Kindern konnte an einzelnen Studientagen eine circadiane Periodenlänge beobachtet werden. Die Aktivitätsanalyse zeigte eine signifikante Zunahme des prozentualen Anteils von Ruhephasen während der ersten Lebenswochen ($p < 0,05$) (Tag 1: 55%; Tag 7: 61%; Tag 14: 60%). Die durchschnittliche Gesamtschlafzeit verlängerte sich signifikant ($p < 0,05$) von 66% an Studientag 1 auf 72% an Studientag 7.

Schlussfolgerung: In den ersten vier Lebenswochen konnte bei den Frühgeborenen noch keine stabile circadiane Rhythmik gefunden werden. Hinsichtlich des Aktivitäts-Ruhe-Musters zeigte sich eine dominierende ultradiane Rhythmik von vier Stunden. Höhere Cortisolkonzentrationen und stärkere Aktivität der Frühgeborenen zu Beginn des Untersuchungszeitraumes sind möglicherweise auf stressreiche Umwelteinflüsse, wie z.B. intensivmedizinische Behandlungen oder medizinische Interventionen zurückzuführen. Weitere Studien sind in Bezug auf die Cortisolkonzentration und das Aktivitäts-Ruhe-Verhalten bei Frühgeborenen notwendig, um den Einfluss von wichtigen Umwelteinflüssen, wie Stressfaktoren und Krankheitsprozesse, aufzuzeigen sowie ggf. die Behandlung und Pflege optimieren zu können.

Summary

Background: Many physiological processes in humans like hormone secretion, activity-rest patterns or body temperature regulation underlie cyclic patterns, so-called biological rhythms. Environmental influences such as light-dark cycle, food ingestion, sleep-wake cycles and social cues are major determinants in synchronizing human circadian rhythm. The foetal circadian system is mainly synchronized by the maternal circadian rhythm; however, neonates lose this circadian rhythm after birth which needs time to adapt to the extra-uterine life. Preterm infants are exposed early to medical and caregiving interventions, which can be a reason of stress for preterm infants. To date, only few and inconsistent results exist about the development of the circadian rhythm of preterm infants in the literature.

The purpose of this study was to examine the biologic rhythm of preterm infants during their first weeks of life by measuring circadian cortisol levels and their activity-rest behaviour.

Methods: 62 preterm neonates with gestational age between 30 and 37 completed weeks and a postnatal age of less than ten days were included in the study. Actographic monitoring was used to record the activity and rest patterns of the preterm continuously over 24 hours on day one, seven and fourteen. Additionally, saliva samples were obtained from 22 preterm neonates at seven predefined time points of those days. Cortisol and activity data were analysed by Least Squares Spectral Analysis (LSSA) to assess periodic characteristics and frequencies. Hierarchical Linear Modeling was further performed for statistical analysis.

Results: The cortisol rhythm analysis indicated a circadian rhythm pattern for only one premature infant, the majority of the neonates showed no circadian or ultradian rhythm of the hormone cortisol. Furthermore, the cortisol level of the premature neonates was significantly higher on the first day of study ($p < 0.005$) compared to day seven and fourteen of the study (day 1: median=16.5 nmol/L, day 7: median=9.8 nmol/L; day 14: median=10.0 nmol/L). Notably, cortisol levels at night declined significantly ($p < 0.05$) during the study period (night 1: median=17.1 nmol/L; night 7: median=9.6 nmol/L; night 14: median=9.8 nmol/L).

The activity-rest rhythm of the preterm neonates was dominated by ultradian rhythm patterns with a period length of four hours in the first weeks of life. 12 preterm infants

showed a circadian pattern of activity-sleep-rhythm at one time point during the study. The duration of resting phases (low activity frequencies) increased significantly during the observation period (day 1: 55%; day 7: 61%; day 14: 60%). In addition, the sleep duration of the infants increased significantly ($p < 0.05$) from 66% of day one to 72% of day seven.

Conclusion: No stable circadian rhythm was found during the first four weeks of life of the examined preterm infants. An ultradian rhythm of the activity-rest behaviour with a period length of four hours could be detected in a subgroup of these infants. The study population showed higher cortisol levels and higher activity frequencies at earlier time points after birth which may reflect difficulties in the adaptation process of neonates after birth, e.g. intensive care or medical interventions. Further studies are necessary to better understand the correlation between stress processes, illnesses, extra uterine adaption and cortisol concentration as well as the activity-rest behaviour of preterm infants in order to optimize treatment and nursing of preterm infants.

Literaturverzeichnis

- Albert P, Hunsberger S. (2005). On analyzing circadian rhythms data using nonlinear mixed models with harmonic terms. *Biometrics*. 61:1115-20.
- Al Saedi S, Dean H, Dent W, Cronin C. (1995). Reference ranges for serum cortisol and 17-hydroxyprogesterone levels in preterm infants. *J Pediatr*. 126:985-7.
- Antonini S, Jorge S, Moreira A. (2000). The emergence of salivary cortisol circadian rhythm and its relationship to sleep activity in preterm infants. *Clin Endocrinol*. 52:423-6.
- Antonucci R, Porcella A, Fanos V. (2009). The infant incubator in the neonatal intensive care unit: Unresolved issues and future developments. *J Perinat Med*. 37:587-98.
- Ardura J, Andres J, Aldana J, Revilla M. (1995). Development of sleep-wakefulness rhythm in premature babies. *Acta Paediatr*. 84:484-9.
- Asaka Y, Takada S. (2010). Activity-based assessment of the sleep behaviors of VLBW preterm infants and full-term infants at around 12 months of age. *Brain Dev*. 32:150-5.
- Aschoff J. (1967). Human circadian rhythms in activity, body temperature and other functions. *Life Sci Space Res*. 5:159-73.
- Aschoff J. (1994). The timing of defecation within the sleep-wake cycle of humans during temporal isolation. *J Biol Rhythms*. 9:43-50.
- Balsalobre A. (2002). Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res*. 309:193-9.
- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S. (2014). lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. Available from: <http://cran.r-project.org/web/packages=lme4>.
- Battin M, Bevan C, Harding J. (2007). Repeat doses of antenatal steroids and hypothalamic pituitary-adrenal axis (HPA) function. *Am J Obstet Gynecol*. 197:40-6.
- Behrends J, Bischofberger J, Deutzmann R. (2012). *Duale Reihe Physiologie*. 2.Auflage 2012. Stuttgart: Thieme.
- Bettendorf M, Albers N, Bauer J, Heinrich U, Linderkamp O, Maser-Gluth C. (1998). Longitudinal evaluation of salivary cortisol levels in full-term and preterm neonates. *Horm Res*. 50:303-8.
- Blencowe H, Cousens S, Oestergaard M, Chou D, Moller A, Narwal R, Adler A, Garcia C, Rohde S, Say L, Lawn J. (2012). National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet*. 379:2162-72.
- Blondel B, Kaminski M. (2002). Trends in the occurrence, determinants, and consequences of multiple births. *Semin Perinatol*. 26:239-49.
- Bolt R, van Weissenbruch M, Lafeber H, Delemarre-van Waal H de. (2001). Glucocorticoids and lung development in the fetus and preterm infant. *Pediatr Pulmonol*. 32:76-91.

- Buyukkayhan D, Ozturk M, Kurtoglu S, Koklu E, Yikilmaz A. (2009). Effect of antenatal betamethasone use on adrenal gland size and endogenous cortisol and 17 hydroxyprogesterone in preterm neonates. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 22:1027–31.
- Buske-Kirschbaum A, Krieger S, Wilkes C, Rauh W, Weiss S, Hellhammer D. (2007). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and the cellular immune response in former preterm children. *J Clin Endocrinol Metab.* 92:3429-35.
- Calixto C, Martinez F, Jorge S, Moreira A, Martinelli C. (2002). Correlation between plasma and salivary cortisol levels in preterm infants. *J Pediatr.* 140:116–8.
- Castro M, Elias P, Martinelli C, Antonini S, Santiago L, Moreira A. (2000). Salivary cortisol as a tool for physiological studies and diagnostic strategies. *Braz J Med Biol Res.* 33:1171–5.
- Chou I, Lien H, Lin H, Fu J, Kao C, Tsai C, Lin P, Tsai F. (2011). The relationship of salivary and cord blood cortisol in preterm infants. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 24:85–8.
- Cioni G, Prechtl H. (1990). Preterm and early postterm motor behaviour in low-risk premature infants. *Early Hum Dev.* 23:159–91.
- Cohen Engler A, Hadash A, Shehadeh N, Pillar G. (2012). Breastfeeding may improve nocturnal sleep and reduce infantile colic: potential role of breast milk melatonin. *Eur J Pediatr.* 171:729–32.
- Custodio R, Junior C, Milani S, Simões A, Castro M de, Moreira A. (2007). The emergence of the cortisol circadian rhythm in monozygotic and dizygotic twin infants: the twin-pair synchrony. *Clin Endocrinol.* 66:192–7.
- Davis E, Townsend E, Gunnar M, Georgieff M, Guiang S, Cifuentes R, Lussky R. (2004). Effects of prenatal betamethasone exposure on regulation of stress physiology in healthy premature infants. *Psychoneuroendocrino.* 29:1028–36.
- Davis E, Townsend E, Gunnar M, Guiang S, Lussky R, Cifuentes R, Georgieff M. (2006). Antenatal betamethasone treatment has a persisting influence on infant HPA axis regulation. *J Perinatol.* 26:147–53.
- Doerr H, Sippell W, Versmold H, Bidlingmaier F, Knorr D. (1988). Plasma mineralocorticoids, glucocorticoids, and progestins in premature infants: longitudinal study during the first week of life. *Pediatr Res.* 23:525–9.
- Donzella B, Talge N, Smith T, Gunnar M. (2008). To spear or not to spear: comparison of saliva collection methods. *Dev Psychobiol.* 50:714–7.
- Economou G, Andronikou S, Challa A, Cholevas V, Lapatsanis P. (1993). Cortisol secretion in stressed babies during the neonatal period. *Horm Res.* 40:217–21.
- Euro-Peristat Project with SCPE and EUROCAT. (2015). European Perinatal Health Report. The health and care of pregnant woman and babies in Europe in 2010. www.europeristat.com.
- Faul F, Erdfelder E, Lang A, Buchner A. (2007). G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods.* 39:175–91.

- Giganti F, Cioni G, Biagioni E, Puliti M, Boldrini A, Salzarulo P. (2001a). Activity patterns assessed throughout 24-hour recordings in preterm and near term infants. *Dev Psychobiol.* 38:133–42.
- Giganti F, Fagioli I, Ficca G, Cioni G, Salzarulo P. (2001b). Preterm infants prefer to be awake at night. *Neurosci Lett.* 312:55–7.
- Giganti F, Ficca G, Cioni G, Salzarulo P. (2006). Spontaneous awakenings in preterm and term infants assessed throughout 24-h video-recordings. *Early Hum Dev.* 82:435–40.
- Glotzbach S, Edgar D, Ariagno R. (1995). Biological rhythmicity in preterm infants prior to discharge from neonatal intensive care. *Pediatrics.* 95:231–7.
- Gossel-Sybank R, Grimmer I, Korte J, Siegmund R. (2004). Actigraphic monitoring of the activity-rest behavior of preterm and full-term infants at 20 months of age. *Chronobiol Int.* 21:661–71.
- Greaves R, Pitkin J, Ho C, Baglin J, Hunt R, Zacharin M. (2015). Hormone Modelling in Preterm Neonates: Establishment of Pituitary and Steroid Hormone Reference Intervals. *J Clin Endocrinol Metab.* 100:1097-103.
- Gross I. (1990). Regulation of fetal lung maturation. *Am J Physiol.* 259:L337-44.
- Gunes T, Koklu E, Ozturk M, Koklu S, Cetin N. (2006). Evaluation of serum cortisol levels in a relatively large and mature group of ventilated and nonventilated preterm infants with respiratory distress syndrome. *Am J Perinatol.* 23:335–9.
- Halberg F. (1963). Circadian (about twenty-four-hour) rhythms in experimental medicine. *Proc R Soc Med.* 56:253-7.
- Hanna C, Colasurdo M, Buffkin D, Keith D, Mandel S, Cook D, Franchi S, Reynolds J. (1990). Assessment of pituitary ACTH secretion in the extremely premature infant using ovine corticotropin releasing hormone. *Pediatr Res.* 27:77.
- Hastings M. (1991). Neuroendocrine rhythms. *Pharmacol Ther.* 50:35–71.
- Hastings M, Reddy A, Maywood E. (2003). A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat Rev Neurosci.* 4:649–61.
- Heaman M, Kingston D, Chalmers B, Sauve R, Lee L, Young D. (2013). Risk factors for preterm birth and small-for-gestational-age births among Canadian women. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 27:54–61.
- Herrington C, Olomu I, Geller S. (2004). Salivary cortisol as indicators of pain in preterm infants: a pilot study. *Clin Nurs Res.* 13:53–68.
- Howson C, Kinney M, Lawn J. (2012). Born Too Soon: The Global Action Report on Preterm Birth. *World Health Organization.* Geneva.
- Illnerova H, Buresova M, Presl J. (1993). Melatonin rhythm in human milk. *J Clin Endocrinol Metab.* 77:838–41.

- Kairalla A. (1992). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in premature neonates after extensive prenatal treatment with betamethasone: a case history. *Am J Perinatol.* 9:428–30.
- Kari M, Raivio K, Stenman U, Voutilainen R. (1996). Serum cortisol, dehydroepiandrosterone sulfate, and steroid-binding globulins in preterm neonates: effect of gestational age and dexamethasone therapy. *Pediatr Res.* 40:319–24.
- Kidd S, Midgley P, Nicol M, Smith J, McIntosh N. (2005). Lack of adult-type salivary cortisol circadian rhythm in hospitalized preterm infants. *Horm Res.* 64:20–7.
- Klug I, Dressendorfer R, Strasburger C, Kuhl G, Reiter H, Reich A, Muller G, Meyer K, Kratzsch J, Kiess W. (2000). Cortisol and 17-hydroxyprogesterone levels in saliva of healthy neonates: normative data and relation to body mass index, arterial cord blood ph and time of sampling after birth. *Biol Neonate.* 78:22–6.
- Knutsson A. (2003). Health disorders of shift workers. *Occup Med-C.* 53:103–8.
- Konopka R, Benzer S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 68:2112–6.
- Koukkari W, Sothorn R. (2006). *Introducing Biological Rhythms.* 1. Auflage 2006. New York: Springer Science+Business Media.
- Korte C, Styne D, Merritt T, Mayes D, Wertz A, Helbock H. (1996). Adrenocortical function in the very low birth weight infant: improved testing sensitivity and association with neonatal outcome. *J Pediatr.* 128:257–63.
- Korte J, Wulff K, Oppe C, Siegmund R. (2001). Ultradian and circadian activity-rest rhythms of preterm neonates compared to full-term neonates using actigraphic monitoring. *Chronobiol Int.* 18:697–708.
- Krieger D, Allen W, Rizzo F, Krieger H. (1971). Characterization of the normal temporal pattern of plasma corticosteroid levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 32:266–84.
- Lemmer B. (2012). *Chronopharmakologie.* 4. Auflage 2012. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH.
- Liggins G. (1994). The role of cortisol in preparing the fetus for birth. *Reprod Fertil Dev.* 6:141–50.
- Lunshof S, Boer K, Wolf H, van Hoffen G, Bayram N, Mirmiran M. (1998). Fetal and maternal diurnal rhythms during the third trimester of normal pregnancy: outcomes of computerized analysis of continuous twenty-four-hour fetal heart rate recordings. *Am J Obstet Gynecol.* 178:247–54.
- Magoon E, Robb R. (1981). Development of myelin in human optic nerve and tract. A light and electron microscopic study. *Arch Ophthalmol.* 99:655–9.
- Maier R, Obladen M. (2011). *Neugeborenenintensivmedizin: Evidenz & Erfahrung.* 8. Auflage 2011. Berlin: Springer Verlag.
- McMahon M, Gerich J, Rizza R. (1988). Effects of glucocorticoids on carbohydrate metabolism. *Diabetes Metab Rev.* 4:17-30.

- McMillen I, Kok J, Adamson T, Deayton J, Nowak R. (1991). Development of circadian sleep wake rhythms in preterm and full-term infants. *Pediatr Res.* 29:381–4.
- Metzger D, Wright N, Veldhuis J, Rogol A, Kerrigan J. (1993). Characterization of pulsatile secretion and clearance of plasma cortisol in premature and term neonates using deconvolution analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 77:458–63.
- Mirmiran M, Kok J. (1991). Circadian rhythms in early human development. *Early Hum Dev.* 26:121–8.
- Moore R, Eichler V. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 42:201–6.
- Mortensen L. (2013). Socioeconomic inequality in birth weight and gestational age in Denmark 1996-2007: using a family-based approach to explore alternative explanations. *Soc Sci Med.* 76:1–7.
- Naitoh N, Watanabe Y, Matsumura K, Murai I, Kobayashi K, Imai-Matsumura K, Ohtuka H, Takagi K, Miyake Y, Satoh K. (1998). Alteration by maternal pinealectomy of fetal and neonatal melatonin and dopamine D1 receptor binding in the suprachiasmatic nuclei. *Biochem Biophys Res Commun.* 253:850–4.
- Neu M, Goldstein M, Gao D, Laudenslager M. (2007). Salivary cortisol in preterm infants: Validation of a simple method for collecting saliva for cortisol determination. *Early Hum Dev.* 83:47–54.
- Ng P. (2000). The fetal and neonatal hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 82:F250-4.
- Ng P, Wong S, Chan I, Lam H, Lee C, Lam C. (2011). A prospective longitudinal study to estimate the "adjusted cortisol percentile" in preterm infants. *Pediatr Res.* 69:511–6.
- Ng S, Drury J, Turner M, Didi M, Victor S, Newland P, Weindling A. (2013). A novel method of collection of saliva for estimation of steroid levels in extremely premature infants. *Acta Paediatr.* 102: 356-9.
- Nishihara K, Horiuchi S, Eto H, Uchida S. (2002). The development of infants' circadian rest activity rhythm and mothers' rhythm. *Physiol Behav.* 77:91–8.
- Patrick J, Campbell K, Carmichael L, Natale R, Richardson B. (1982). Patterns of gross fetal body movements over 24-hour observation intervals during the last 10 weeks of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 142:363–71.
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D. (2014). nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. Available from: <http://cran.r-project.org/web/packages=nlme>.
- Pittendrigh C. (1967). Circadian systems. I. The driving oscillation and its assay in *Drosophila pseudoobscura*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 58:1762–7.
- Price D, Close G, Fielding B. (1983). Age of appearance of circadian rhythm in salivary cortisol values in infancy. *Arch Dis Child.* 58:454–6.

- Pugliese M, Rossi C, Guidotti I, Gallo C, Della Casa E, Bertoncelli N, Coccolini E, Ferrari F. (2013). Preterm birth and developmental problems in infancy and preschool age Part II: cognitive, neuropsychological and behavioural outcomes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 26:1653-7.
- R Development Core Team. (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available from: <http://www.R-project.org>.
- Rassow J. (2012). Biochemie Duale Reihe. 3. Auflage 2012. Stuttgart: Thieme.
- Reinberg A, Halberg F. (1971). Circadian chronopharmacology. *Annu Rev Pharmacol.* 11:455-92.
- Reinberg A, Lewy H, Smolensky M. (2001). The birth of chronobiology: Julien Joseph Virey 1814. *Chronobiol Int.* 18:173-86.
- Reincke M, Lehmann R, Karl M, Magiakou A, Chrousos P, Allolio B. (1995). Severe illness. Neuroendocrinology. *Ann N Y Acad Sci.* 771:556-69.
- Reppert S, Schwartz W. (1983). Maternal coordination of the fetal biological clock in utero. *Science.* 220:969-71.
- Rietveld W. (1990). The central control and ontogeny of circadian rhythmicity. *Eur J Morphol.* 28:301-7.
- Rivkees S. (2003). Developing Circadian Rhythmicity in Infants. *Pediatrics.* 112:373.
- Rivkees S, Mayes L, Jacobs H, Gross I. (2004). Rest-activity patterns of premature infants are regulated by cycled lighting. *Pediatrics.* 113: 833-9.
- Roberts A, Little D, Cooper D, Campbell S. (1979). Normal patterns of fetal activity in the third trimester. *Br J Obstet Gynaecol.* 86:4-9.
- Sadeh A. (1996). Evaluating night wakings in sleep-disturbed infants: a methodological study of parental reports and actigraphy. *Sleep.* 19:757-62.
- Sadeh A. (2011). The role and validity of actigraphy in sleep medicine: an update. *Sleep Med Rev.* 15:259-67.
- Sadeh A, Acebo C. (2002). The role of actigraphy in sleep medicine. *Sleep Med Rev.* 6:113-24.
- Sadeh A, Raviv A, Gruber R. (2000). Sleep patterns and sleep disruptions in school-age children. *Dev Psychol.* 36:291-301.
- Santiago L, Jorge S, Moreira A. (1996). Longitudinal evaluation of the development of salivary cortisol circadian rhythm in infancy. *Clin Endocrinol.* 44:157-61.
- Schaffer L, Luzi F, Burkhardt T, Rauh M, Beinder E. (2009). Antenatal betamethasone administration alters stress physiology in healthy neonates. *Obstet Gynecol.* 113:1082-8.
- Schleußner E. (2013). The prevention, diagnosis and treatment of premature labor. *Dtsch Arztebl.* 110:227-36.

- Scott S, Watterberg K. (1995). Effect of gestational age, postnatal age, and illness on plasma cortisol concentrations in premature infants. *Pediatr Res.* 37:112–6.
- Seron-Ferre M, Torres-Farfan C, Forcelledo M, Valenzuela G. (2001). The development of circadian rhythms in the fetus and neonate. *Semin Perinatol.* 25:363–70.
- Shapiro-Mendoza C, Lackritz E. (2012). Epidemiology of late and moderate preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med.* 17:120–5.
- Shimada M, Segawa M, Higurashi M, Akamatsu H. (1993). Development of the sleep and wakefulness rhythm in preterm infants discharged from a neonatal care unit. *Pediatr Res.* 33:159–63.
- Snijders T, Bosker R. (2012). *Multilevel Analysis: An Introduction to Basic and Advanced Multilevel Modeling*. Second Edition 2012. London: Sage Publishers.
- Snow, G. (2006). The blockrand Package: Randomization for block random clinical trials. Salt Lake City, Utah. Available from: <http://cran.rproject.org/web/packages/blockrand/>.
- So K, Buckley P, Adamson T, Horne R. (2005). Actigraphy correctly predicts sleep behavior in infants who are younger than six months, when compared with polysomnography. *Pediatr Res.* 58:761–5.
- Stephan F, Zucker I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 69:1583–6.
- Street M, Smerieri A, Petraroli A, Cesari S, Viani I, Garrubba M, Rossi M, Bernasconi S. (2012). Placental cortisol and cord serum IGFBP-2 concentrations are important determinants of postnatal weight gain. *J Biol Regul Homeost Agents.* 26:721–31.
- Takahashi J, Hong H, Ko C, McDearmon E. (2008). The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet.* 9:764–75.
- Tsai S, Thomas K, Lentz M, Barnard K. (2012). Light is beneficial for infant circadian entrainment: An actigraphic study. *J Adv Nurs.* 68:1738-47.
- Vásquez-Ruiz S, Maya-Barrios J, Torres-Narváez P, Vega- Martínez B, Rojas-Granados A, Escobar C, Angeles-Castellanos M. (2013). A light/dark cycle in the NICU accelerates body weight gain and shortens time to discharge in preterm infants. *Early Hum Dev.* 90:535-40.
- Vermes I, Dohanics J, Toth G, Pongracz J. (1980). Maturation of the circadian rhythm of the adrenocortical functions in human neonates and infants. *Horm Res.* 12:237–44.
- Virey J. (1814). *Éphémérides de la vie humaine, ou recherches sur la révolution journalière, et la périodicité de ses phénomènes dans la santé et les maladies*. Paris: Université Paris.
- Vries J de, Visser G, Mulder E, Prechtel H. (1987). Diurnal and other variations in fetal movement and heart rate patterns at 20-22 weeks. *Early Hum Dev.* 15:333–48.
- Waffarn F, Davis E. (2012). Effects of antenatal corticosteroids on the hypothalamic-pituitary adrenocortical axis of the fetus and newborn: experimental findings and clinical considerations. *Am J Obstet Gynecol.* 207:446–54.

- Weaver D. (1998). The suprachiasmatic nucleus: a 25-year retrospective. *J Biol Rhythms*. 13:100–12.
- Weerth C de, Graat G, Buitelaar J, Thijssen J. (2003a). Measurement of cortisol in small quantities of saliva. *Clin Chem*. 49:658–60.
- Weerth C de, Jansen J, Vos M, Maitimu I, Lentjes E. (2007). A new device for collecting saliva for cortisol determination. *Psychoneuroendocrino*. 32:1144–8.
- Weerth C de, Zijl R, Buitelaar J. (2003b). Development of cortisol circadian rhythm in infancy. *Early Hum Dev*. 73:39–52.
- Welsh D, Takahashi J, Kay S. (2010). Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annu Rev Physiol*. 72:551–77.
- Wever R. (1979). The circadian system of man. Results of experiments under temporal isolation. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- Wolke D, Meyer R, Ohrt B, Riegel K. (1995). The incidence of sleeping problems in preterm and fullterm infants discharged from neonatal special care units: an epidemiological longitudinal study. *J Child Psychol Psych*. 36:203–23.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Biologische Rhythmen	3
Abbildung 2: Terminologie der Chronobiologie	4
Abbildung 3: Lokalisation des suprachiasmatischen Nukleus (SCN)	5
Abbildung 4: Studienaufbau	14
Abbildung 5: Verfahren zur Speichelgewinnung	16
Abbildung 6: Aktometer	20
Abbildung 7: Darstellung des Patientenkollektivs	26
Abbildung 8: Circadianer Cortisolrhythmus eines Frühgeborenen	31
Abbildung 9: Vergleich der Cortisolkonzentration im Speichel (nmol/L)	32
Abbildung 10: Darstellung der Cortisolkonzentration in der Nacht (nmol/L)	34
Abbildung 11: Darstellung der Cortisolkonzentration am Tag (nmol/L)	35
Abbildung 12: Darstellung des Aktivitäts-/Ruherhythmus der Frühgeborenen	37
Abbildung 13: Darstellung der Nachtmittelwerte der Aktivitätsanalyse	38
Abbildung 14: Vergleich der durchschnittlichen Dauer der drei Aktivitätsstufen	40
Abbildung 15: Prozentualer Anteil der Aktivitäts-/Ruhephasen	41
Abbildung 16: Prozentualer Anteil der Schlafphase	42
Abbildung 17: Korrelation zwischen Aktivität und postnatalem Alter	43

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Demographische und klinische Daten der Studienpopulation	28
Tabelle 2: Stichprobengröße zur Erstellung des Cortisol-Profiles	29
Tabelle 3: Deskriptive Statistik der Cortisolkonzentration im Speichel (nmol/L)	30
Tabelle 4: Tag-/Nachtcortisolkonzentration im Speichel (nmol/L)	33
Tabelle 5: Anzahl der beobachteten Periodenlängen der Aktivitätsphase	36

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom
AIC	Akaike information criterion
ANOVA	Analysis of variance
CBG	Cortisol-binding-Globuline
CPAP	nasaler kontinuierlicher positiver Atemwegsdruck (continuous positive airway pressure)
CRH	Cortikotropin-Releasing-Hormon
ELBW	Extremely low birth weight
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
FFT	Fast Fourier transformation
GLMM	Generalisiertes lineares gemischtes Modell (generalized linear mixed model)
GA	Gestationsalter
HNN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
HRP	Horseradish Peroxidase
HSD-Test	Honestly Significant Difference-Test
IQR	Interquartilenabstand
LBW	Low birth weight
p.m.	post menstruationem
PNA	Postnatales Lebensalter
RG	Reaktionsgefäß
SCN	Suprachiasmatischer Kern (suprachiasmatic nucleus)
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SE	Standardfehler
SGA	Small for gestational age
SSW	Schwangerschaftswoche
VLBW	Very low birth weight
WHO	World Health organization

Anhang

11.1 Formelle Bemerkung

In der vorliegenden Arbeit wird die weibliche Form durch männliche Formulierungen vertreten.

11.2 Tabellarische Darstellung der Rhythmusanalyse

Tabelle 5: Rhythmusanalyse der Cortisolkonzentration (mmol/L) an den Studientagen 1,7 und 14

Studiencode	Studientag	\bar{x} Tag	\bar{x} Nacht	Mesor	Peak
M05	T1	10,69	14,05	12,71	12,71
M12	T1	18,58	15,35	16,64	16,64
M14	T1	19,85	11,74	24,18	41,19
M17	T1	10,28	35,08	26,81	26,81
M20	T1	7,94	16,71	12,95	12,95
M21	T1	12,68	26,93	22,18	22,18
M35	T1	26,77	22,74	24,47	24,47
M38	T1	30,17	39,83	35,00	35,00
M42	T1	47,50	14,50	28,65	28,65
M47	T1	10,68	25,51	16,61	16,61
M49	T1	6,84	12,32	9,03	9,03
M50	T1	28,64	26,38	27,35	27,35
M55	T1	48,16	31,19	36,85	36,85
M59	T1	5,58	7,54	6,56	6,56
M61	T1	35,15	56,49	47,96	47,96
Insgesamt					
Mittelwert	T1	21,30	23,76	23,20	24,33
Unteres KI	T1	13,43	16,55	16,95	17,57
Oberes KI	T1	29,17	30,97	29,44	27,40
M09	T7	5,80	7,97	7,11	7,11
M12	T7	26,99	10,72	16,14	16,14
M14	T7	9,23	9,82	9,62	9,62
M20	T7	21,16	13,08	16,31	16,31
M35	T7	5,99	19,97	15,31	15,31
M38	T7	6,02	8,50	7,44	7,44
M42	T7	12,20	7,11	9,29	9,29
M47	T7	7,35	4,19	5,77	5,77
M50	T7	28,20	22,63	25,42	25,42
M61	T7	13,98	9,56	11,03	11,03
Insgesamt					
Mittelwert	T7	13,69	11,35	12,34	12,34
Unteres KI	T7	7,45	7,23	8,06	8,06
Oberes KI	T7	19,94	15,48	16,63	14,19
M12	T14	15,53	11,03	12,96	12,96
M14	T14	17,72	23,53	21,20	21,20
M21	T14	17,98	6,51	12,24	12,24
M35	T14	11,35	11,50	11,44	11,44
M49	T14	9,04	6,12	7,58	7,58
M50	T14	14,39	23,39	19,53	19,53
M59	T14	12,29	19,08	16,82	16,82

M61	T14	16,06	15,95	15,99	15,99
Insgesamt					
Mittelwert	T14	14,30	14,64	14,72	14,72
Unteres KI	T14	11,65	8,82	10,95	10,95
Oberes KI	T14	16,95	20,45	18,49	16,28

T1: Studientag 1; T7: Studientag 7; T14: Studientag 14; Unteres KI: unteres Konfidenzintervall; oberes KI: oberes Konfidenzintervall; \bar{X} Tag: Mittelwert der Tageswerte; \bar{X} Nacht: Mittelwert der Nachtwerte; Mesor: Mittelwert der angepassten Funktion; Peak: Höchste Punkt der Zeitperiode

Tabelle 7: Rhythmusanalyse (counts/min) der Aktivität an den Studientagen 1,7 und 14

Studiencode	Studientag	\bar{X} Tag	\bar{X} Nacht	Mesor	Peak
M01	1	123,63	140,34	131,28	317,13
M02	1	127,61	214,13	168,16	485,58
M03	1	233,26	153,69	205,47	616,52
M04	1	375,19	561,53	457,07	868,30
M05	1	464,26	348,73	417,63	982,09
M06	1	230,49	245,38	242,14	850,34
M07	1	71,13	148,29	102,22	421,91
M08	1	495,62	424,58	479,21	999,56
M09	1	241,33	465,09	345,74	1142,83
M10	1	568,80	303,03	442,27	906,26
M11	1	348,12	266,77	317,95	802,47
M13	1	109,30	66,65	91,37	202,45
M14	1	304,66	419,91	352,32	1509,48
M15	1	219,78	243,35	229,28	725,04
M16	1	345,59	278,70	317,50	861,94
M17	1	464,76	442,34	454,36	1056,46
M18	1	515,86	549,16	549,00	1370,60
M19	1	451,64	895,19	655,50	1757,36
M20	1	237,87	619,89	416,51	1359,69
M21	1	219,10	231,37	223,63	526,40
M23	1	366,28	206,32	284,07	763,37
M24	1	888,13	1003,30	941,82	1686,52
M25	1	247,02	279,78	258,85	714,71
M26	1	816,34	512,33	667,65	1635,63
M27	1	402,62	422,54	407,58	1041,46
M28	1	348,67	358,30	352,46	586,22
M29	1	315,25	387,62	353,10	769,15
M30	1	356,36	359,32	345,84	850,82
M31	1	85,71	26,41	57,71	167,69
M33	1	258,99	173,28	218,11	551,12
M34	1	346,53	286,27	321,17	843,50
M35	1	289,12	263,23	279,94	788,31
M36	1	300,87	175,93	246,16	913,39
M37	1	388,26	393,68	397,19	847,04
M38	1	259,33	473,58	352,52	978,56
M39	1	303,68	214,64	256,35	713,32
M40	1	161,03	191,16	177,42	710,61
M42	1	403,80	594,91	467,20	1004,75
M44	1	277,76	302,24	296,06	847,56
M45	1	424,32	547,89	480,52	1540,19
M46	1	640,36	404,24	524,93	937,93
M47	1	463,15	350,64	425,21	845,37
M48	1	190,52	132,89	165,45	370,23
M49	1	375,73	412,05	380,03	822,84
M50	1	251,45	471,80	353,87	800,34
M51	1	132,48	152,65	145,47	391,93

M52	1	374,92	297,66	346,36	672,87
M53	1	320,18	298,43	317,10	657,38
M54	1	196,11	69,13	136,21	394,17
M55	1	285,84	110,71	216,12	891,32
M56	1	189,11	276,68	226,71	480,03
M57	1	290,33	302,85	308,33	886,21
M58	1	203,61	143,41	169,94	317,89
M59	1	280,25	307,69	295,82	812,69
M60	1	172,91	210,55	185,94	498,38
M61	1	208,39	294,35	248,58	630,37
M01	7	246,90	32,75	147,41	508,01
M02	7	153,63	117,41	135,42	231,48
M03	7	344,57	134,67	250,30	653,04
M04	7	332,41	527,86	424,30	666,88
M05	7	311,88	268,33	298,77	709,44
M06	7	313,63	173,45	254,87	614,85
M09	7	213,43	143,92	179,55	639,42
M10	7	166,60	128,76	150,33	467,27
M11	7	344,90	319,65	314,78	697,74
M12	7	342,04	328,77	295,91	1064,33
M14	7	383,38	322,77	360,47	884,78
M15	7	229,95	203,05	189,12	560,83
M16	7	185,22	136,70	163,75	371,49
M18	7	510,62	700,11	591,79	1331,22
M19	7	371,20	156,98	280,19	971,53
M21	7	409,78	231,62	326,63	1113,39
M23	7	280,18	205,03	228,41	712,43
M24	7	346,83	236,89	302,63	664,64
M25	7	197,84	324,14	254,88	615,64
M26	7	419,57	379,71	418,69	976,08
M27	7	246,11	158,39	212,48	950,57
M29	7	219,16	109,99	164,67	535,66
M30	7	536,68	261,61	414,62	1025,37
M31	7	137,99	154,17	145,72	475,73
M32	7	305,18	212,92	265,28	579,73
M33	7	263,88	387,93	319,86	1363,14
M35	7	215,48	341,59	254,57	1142,81
M36	7	414,26	339,70	393,29	1098,93
M37	7	171,18	155,38	160,18	583,48
M38	7	434,62	199,97	322,01	814,06
M39	7	218,10	388,09	288,45	741,19
M40	7	183,25	135,19	168,84	519,61
M42	7	460,78	526,25	495,17	1260,45
M44	7	162,32	103,74	130,46	436,51
M45	7	445,58	442,05	434,76	1049,49
M46	7	322,14	233,24	291,45	972,58
M47	7	295,05	138,43	216,65	727,62
M48	7	471,68	310,80	391,50	1084,21
M49	7	515,44	258,80	396,08	1340,45
M50	7	291,54	282,82	289,85	1038,92
M51	7	208,83	209,40	197,72	458,77
M52	7	364,97	265,93	306,60	702,57
M53	7	400,41	245,05	321,57	572,46
M57	7	271,39	473,33	351,66	1158,38
M59	7	246,82	157,75	205,84	571,33
M60	7	251,65	410,90	319,38	911,63
M61	7	270,79	253,67	256,45	674,50
M01	14	161,14	322,01	237,87	568,89
M02	14	228,79	336,17	254,41	922,64
M05	14	346,05	178,09	302,40	752,98
M06	14	155,08	306,24	240,63	835,57
M09	14	251,96	168,08	221,88	658,34

M11	14	410,04	185,04	302,77	982,75
M12	14	224,80	224,03	223,34	543,44
M14	14	456,90	258,54	372,97	1226,71
M15	14	444,90	387,11	401,13	1083,38
M16	14	156,11	179,28	170,35	469,41
M18	14	360,43	368,63	361,74	961,57
M19	14	425,09	172,50	308,40	685,21
M20	14	148,15	179,34	168,30	529,27
M21	14	180,51	150,84	163,98	405,85
M23	14	212,21	136,30	175,10	519,18
M25	14	236,07	143,15	197,45	481,41
M26	14	439,36	373,76	411,24	814,56
M27	14	391,84	238,32	324,74	934,92
M28	14	319,04	279,23	312,51	983,67
M29	14	303,05	173,28	245,53	636,31
M30	14	295,43	377,14	309,56	991,74
M33	14	403,19	307,86	343,87	1168,27
M34	14	293,81	261,81	275,22	862,90
M35	14	386,11	350,51	344,74	1022,18
M36	14	474,94	429,75	530,43	1145,34
M38	14	300,99	202,82	262,47	679,45
M39	14	353,20	273,10	298,85	822,87
M40	14	224,12	130,58	177,86	576,91
M41	14	307,68	155,53	234,41	623,93
M42	14	552,98	633,37	548,56	1458,00
M44	14	288,12	206,54	271,49	558,81
M45	14	448,68	526,55	467,25	1192,41
M46	14	273,57	248,38	254,44	714,03
M47	14	389,97	211,99	306,64	876,68
M48	14	455,95	364,85	408,27	909,08
M49	14	400,81	546,59	448,58	879,19
M50	14	419,18	207,64	370,85	1218,44
M51	14	251,20	313,47	251,43	789,01
M52	14	175,67	94,10	141,56	510,02
M53	14	507,88	334,43	432,43	950,87
M54	14	439,22	308,52	369,74	866,98
M55	14	476,56	547,76	516,32	994,68
M56	14	278,77	512,67	383,38	1082,40
M57	14	250,50	96,63	182,66	510,93
M58	14	435,72	314,05	375,98	919,05
M59	14	229,03	154,77	196,65	535,55
M60	14	190,68	123,40	157,27	495,48
M61	14	319,32	118,44	237,80	539,53

T1: Studientag 1; T7: Studientag 7; T14: Studientag 14; \bar{x} Tag: Mittelwert der Tageswerte; \bar{x} Nacht: Mittelwert der Nachtwerte; Mesor: Mittelwert der angepassten Funktion; Peak: Höchste Punkt der Zeitperiode

11.3 Aufklärungsbogen



Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin•Baldingerstraße•35033 Marburg

Fachbereich Medizin
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin
Geschäftsf. Direktor: Prof. Dr. Rolf. F. Maier
Tel.: 06421 / 58 66229
Fax 06421 / 58 68970
E-Mail: rolf.maier@med.uni-marburg.de
Anschrift: Baldingerstraße
35033 Marburg

Marburg, 14.09.2011

Forschungsprojekt

„Akustische Stimulation bei Frühgeborenen: Auswirkungen auf physiologische, hormonelle und verhaltensbezogene Parameter“

Sehr geehrte Eltern,

wir möchten Sie um Ihr Einverständnis bitten, dass Ihr Kind an dem oben genannten Forschungsprojekt teilnimmt.

Worum geht es?

Frühgeborene sind vielen neuen Reizen ausgesetzt. Zu der Frage, welche Reize die physiologische und psychologische Entwicklung des Frühgeborenen fördern, gibt es bislang nur sehr wenige Informationen. Wir wissen bisher nicht, ob regelmäßige, gezielte Stimulation mit der Stimme der Mutter oder mit ruhiger Musik einen Vorteil für das Kind bedeutet oder ob die Umgebung – wie bisher angestrebt – möglichst ruhig sein sollte. Dies möchten wir mit der vorliegenden Studie untersuchen.

Was wäre im Falle Ihrer Zustimmung der Beitrag Ihres Kindes?

Falls Sie zustimmen, wird Ihr Kind zufällig in eine von drei Studiengruppen eingeteilt: Einer Gruppe werden 14 Tage lang einmal täglich außerhalb der Besuchszeiten für 30 Minuten über kleine Lautsprecher Wiegenlieder vorgespielt. Einer zweiten Gruppe wird ein von der Mutter vorgelesener und mit unserer Hilfe aufgenommener Text vorgespielt. Eine dritte Gruppe wird wie sonst üblich ohne zusätzliche akustische Stimulation versorgt.

Vor, während und nach der Stimulation messen wir Herzfrequenz, Sauerstoffsättigung, Atemfrequenz und Blutdruck bei Ihrem Kind. Zusätzlich entnehmen wir an Tag eins, sieben und vierzehn Speichel mit einem kleinen Watteträger aus der Wangentasche, um die Konzentration

von dem Hormon Cortisol zu messen. Dieses Hormon ist ein guter Indikator für das Erleben von Stress. Zudem möchten wir die körperliche Aktivität und Hauttemperatur der Kinder beobachten. Dafür trägt Ihr Kind ein leichtes, uhrähnliches Gerät am Oberarm, welches die Bewegungen aufzeichnet. Die Aufzeichnung der Messwerte beginnt 15 Minuten vor der Stimulation und endet 15 Minuten nach der akustischen Stimulation und findet zeitgleich bei den Kindern statt, die in die Gruppe ohne Stimulation gelost wurden.

Mit Ausnahme der akustischen Reize, der Auswertung der ohnehin erhobenen Überwachung Ihres Kindes (Herzfrequenz, Atemfrequenz, Sauerstoffsättigung, Temperatur), sowie der Entnahme von Speichelproben und der Aufzeichnung des Bewegungsverhaltens werden keine Maßnahmen durchgeführt, die über die klinisch notwendige Routineversorgung hinausgehen.

Was wäre im Falle Ihrer Zustimmung der Beitrag von Ihnen?

Falls Ihr Kind in die Gruppe gelost wird, die täglich mit der Stimme der eigenen Mutter stimuliert werden soll, würden wir Sie bitten, einen von uns vorgegeben Text auf Band zu sprechen.

Welches Risiko besteht für Ihr Kind?

Die genannten Prozeduren sind mit keinen Schmerzen für Ihr Kind verbunden. Nach menschlichem Ermessen ist die Teilnahme an dem Forschungsprojekt für Ihr Kind ungefährlich. Mit Risiken ist nicht zu rechnen.

Was passiert mit den Daten von Ihrem Kind, falls Sie Ihre Zustimmung geben?

Die Untersuchungsergebnisse werden unter Einhaltung der ärztlichen Schweigepflicht und entsprechend dem Datenschutzgesetz vertraulich behandelt und nur in pseudonymisierter Form gespeichert und ausgewertet. Dies bedeutet, dass Ihrem Kind eine interne Identifikationsnummer zugeordnet wird, die Außenstehenden keinerlei Rückschlüsse auf den Patienten erlaubt. Fünf Jahre nach Abschluss der Studie werden die Daten gelöscht.

Welche Konsequenzen ergeben sich für Sie und Ihr Kind, wenn Sie Ihre Zustimmung nicht geben?

Die Teilnahme an dem Forschungsprojekt ist freiwillig und kann jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen werden, ohne dass Ihnen oder Ihrem Kind dadurch irgendwelche Nachteile entstehen.

Haben Sie noch Fragen zu diesem Forschungsprojekt?

In diesem Fall wenden Sie sich bitte an die Ärztin/den Arzt, die/der Ihr Kind behandelt.

Prof. Dr. Rolf F. Maier

Direktor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Marburg

Studienleiter

11.4 Einverständniserklärung



Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin • Baldingerstraße • 35033 Marburg

Fachbereich Medizin

Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin

Geschäftsf. Direktor: Prof. Dr. Rolf. F. Maier

Tel.: 06421 / 58 66229

Fax 06421 / 58 68970

E-Mail: rolf.maier@med.uni-marburg.de

Anschrift: Baldingerstraße
35033 Marburg

Marburg, 14.09.2011

Forschungsprojekt

„Akustische Stimulation bei Frühgeborenen: Auswirkungen auf physiologische, hormonelle und verhaltensbezogene Parameter“

Einverständniserklärung

Ich wurde von über das o.g. Forschungsprojekt informiert und ausführlich aufgeklärt.

Ich hatte ausreichend Zeit, mich zur Teilnahme von mir und meinem Kind zu entscheiden.

Ich weiß, dass die Teilnahme freiwillig ist, dass ich jederzeit und ohne Angabe von Gründen diese Zustimmung widerrufen kann und dass die Nichtteilnahme mit keinerlei Nachteilen für mich und mein Kind verbunden ist.

Das Informationsblatt und eine Kopie dieser Einverständniserklärung habe ich erhalten.

Im Folgenden Zutreffendes bitte ankreuzen:

Ich erkläre mich hiermit – ausdrücklich auch im Namen des/der anderen Sorgeberechtigten – bereit, dass mein Kind an dem oben genannten Forschungsprojekt teilnimmt.

Ich bin Alleinerziehend oder trage das alleinige Sorgerecht. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass mein Kind an dem oben genannten Forschungsprojekt teilnimmt.

Ort und Datum

Name des/der Unterzeichnenden

Unterschrift des/der Sorgeberechtigten

11.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die im Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Entwicklung des circadianen und ultradianen Biorhythmus bei Frühgeborenen“

in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin unter Leitung von Prof. Dr. med. R. F. Maier mit Unterstützung durch Mirjam Wege und Prof. Dr. med. Dr. h.c. Björn Lemmer der Medizinischen Fakultät Mannheim ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ich versichere, dass ich sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe.

Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

Vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen:

Chronobiology International (2014) und Journal of Perinatology (2016) veröffentlicht.

Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen, die Angebote der Philipps-Universität zur Plagiatserkennung (Plagiatssoftware zu beziehen über das Hochschulrechenzentrum) sind mir bekannt.

Freiburg, den 24.11.2016

Franziska Dorn

11.6 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren:

in **Marburg:** Adamkiewicz, Alter, Barth, Bartsch, Basler, Bastians, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Becker, Berger, Bette, Bien, Bohlander, Bösner, Brehm, Burchert, Cetin, Czubayko, Daut, Del-Rey, Dettmeyer, Donner-Banzhoff, Eikmann, Engenhardt-Cabillic, Ellenrieder, Fendrich, Feuser, Frink, Fuchs-Winkelmann, Geks, Görg, Gress, Grosse, Hamer, Hegele, Hertl, Heverhagen, Hilt, Höffken, Hofmann, Hoyer, Hundt, Jacob, Jerrentrup, Kann, Kanngießer, Kill, Kircher, Kirschbaum, Klose, Köhler, König, Koolmann, Kruse, Krüger, Kühne, Kühnert, Lemke, Leonhardt, Lill, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Maschuw, Maurer, Michl, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Nimsky, Oliver, Oertel, Pagenstecher, Plant, Preisig-Müller, Ramaswamy, Renz, Richter, Rolfes, Rominger, Rosenow, Röhm, Ruchholtz, Schäfer, Schieffer, Schlosser, Schmidt, Schneider, Schulze, Schütz, Seifart Seitz, Sekundo, Sesterhenn, Sevinc, Sommer, Steinfeldt, Steiniger, Steinkamp, Teymoortash, Vogelmeier, Wagner, Waldegger, Waldmann, Weihe, Werner, Westermann, Wilhelm, Wulf, Zemlin, Zentgraf, Zettl, Ziring

in **Poitiers, Frankreich:** Beauchant, Boissonnot, Dufour, Hankard, Neau, Senon

in **Fulda:** Schächinger

in **Berlin:** Cataldegirmen, Kienapfel

in **Montréal:** Laforest-Kenald, Vandermoorteale

Publikationen und Präsentationen

Originalarbeiten

Dorn F, Wirth L, Gorbey S, Wege M, Zemlin M, Maier RF, Lemmer B. (2014). Influence of acoustic stimulation on the circadian and ultradian rhythm of premature infants. *Chronobiol Int.* 31:1062-74.

Wirth L, Dorn F, Wege M, Zemlin M, Lemmer B, Gorbey S, Timmesfeld N, Maier RF. (2016). The Effects of Standardized Acoustic Stimulation in Preterm Infants: A Randomized Controlled Trial. *J Perinatol.* 36:486-92.

Vortrag

Dorn F, Wirth L, Gorbey S, Wege M, Zemlin M, Maier RF, Lemmer B. Influence of acoustic stimulation on the circadian and ultradian rhythm of premature infants. 15th International Course on Chronopharmacology. Mannheim, 28.07.-01.08.2014.

Posterpräsentationen

Wirth L, Dorn F, Wege M, Zemlin M, Lemmer B, Gorbey S, Timmesfeld N, Maier RF. Auswirkungen von standardisierter akustischer Stimulation bei Frühgeborenen: eine randomisierte kontrollierte Studie. 40. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin. Bonn, 26.-28.06.2014. Posterpreis.

Dorn F, Wirth L, Gorbey S, Wege M, Zemlin M, Lemmer B, Maier RF. Circadianer und ultradianer Biorhythmus bei Frühgeborenen. 41. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin. Stuttgart, 21.-23.05.2016.