

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

DISSERTATION

**Probiotika zur Prophylaxe der nekrotisierenden Enterokolitis  
bei Neugeborenen mit ductusabhängigem Herzfehler?**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Liz Kocjancic

aus Brandenburg an der Havel

Datum der Promotion: 30.11.2023

## Inhaltsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| 1. Zusammenfassung.....  | 1  |
| 2. Abstract.....   | 3  |
| 3. Einleitung.....   | 4  |
| 3.1. Vorkommen.....  | 4  |
| 3.2. Pathogenese.....  | 4  |
| 3.3. Klinik und Diagnostik.....  | 5  |
| 3.4. Therapie.....   | 5  |
| 3.5. Neue Forschungsansätze.....   | 5  |
| 3.6. Zielsetzung.....  | 6  |
| 4. Methodik.....   | 7  |
| 4.1. Studiendesign.....  | 7  |
| 4.2. Einschlusskriterien.....  | 7  |
| 4.3. Intervention.....   | 7  |
| 4.4. Datenerhebung.....  | 8  |
| 4.5. Statistische Analyse.....   | 9  |
| 5. Ergebnisse.....   | 10 |
| 5.1. Studienpopulation und deren Merkmale.....   | 10 |
| 5.2. Studienendpunkte.....   | 10 |
| 5.3. Anwendungssicherheit von Infloran®.....   | 11 |
| 5.4. Stichprobengröße für weiterführende Studien.....  | 12 |
| 6. Diskussion.....   | 13 |
| 6.1. Probiotika als NEC-Prophylaxe bei Neugeborenen mit ductusabhängigem Herzfehler? ..<br>..... | 13 |
| 6.2. Darmmikrobiom und dessen Einflussfaktoren.....  | 13 |
| 6.3. Die kardiogene NEC als eigenständiges Krankheitsbild.....                                   | 15 |
| 6.4. Weiterführende Studien.....   | 16 |
| 6.5. Schlussfolgerung.....   | 17 |
| 7. Referenzen.....   | 18 |
| 8. Eidesstattliche Versicherung.....   | 22 |
| 9. Anteilserklärung.....   | 23 |
| 10. Auszug aus der Journal Summary List.....   | 24 |
| 11. Publikation.....   | 26 |
| 12. Lebenslauf.....  | 35 |
| 13. Publikationsliste.....   | 36 |
| 14. Danksagung.....  | 37 |

## 1. Zusammenfassung

**Hintergrund:** Die nekrotisierende Enterokolitis (NEC) ist eine multifaktoriell bedingte entzündliche Darmerkrankung des Neugeborenen mit hoher Letalität. Das Überleben einer NEC geht häufig mit schweren gastrointestinalen und neurologischen Langzeitfolgen einher, weshalb präventiven Maßnahmen zur Vermeidung einer NEC große Bedeutung zukommt. Frühgeborene zählen zur Hochrisikogruppe, doch auch Neugeborene mit ductusabhängigem Herzfehler haben ein erhöhtes Risiko, an einer NEC zu erkranken. In einer Reihe von Studien konnte gezeigt werden, dass eine prophylaktische Gabe von Probiotika mit mehreren Bakterienstämmen die NEC-Inzidenz und Mortalität bei Frühgeborenen drastisch senken kann. Ob dieser Effekt auch bei Neugeborenen mit ductusabhängigem Herzfehler erzielt werden kann, ist bislang nicht untersucht worden.

**Studienziel:** Untersuchung einer möglichen Assoziation zwischen dem prophylaktischen Einsatz eines Probiotikums (Infloran®, bestehend aus *Bifidobacterium infantis* und *Lactobacillus acidophilus*) und der NEC-Rate bei Neugeborenen mit ductusabhängigem Herzfehler.

**Methodik:** In dieser retrospektiven Kohortenstudie wurden Patientendaten von Neugeborenen mit ductusabhängigem Herzfehler, welche einer Alprostadil-Infusion bedurften, aus einem Zeitraum von 10 Jahren (2005-2014) erhoben und analysiert. Es wurden zwei Studiengruppen gebildet und miteinander verglichen: Die Interventionsgruppe (IG), welche täglich das Probiotikum Infloran® oral bzw. über eine Magensonde erhielt, und die historische Kontrollgruppe (KG), welche keinerlei Probiotika bekam. Die Infloran®-Gabe erfolgte bis zum Absetzen der Alprostadil-Infusion und wurde nur während eines Antibiotikaeinsatzes pausiert. Die primäre Zielvariable der Studie war die Diagnose NEC Stadium  $\geq$ II (modifizierte Bell-Kriterien), sekundäre Zielvariablen waren die Gesamtmortalität und die NEC-bezogene Mortalität.

**Ergebnisse:** 488 Kinder waren Teil der Studie (IG: n = 242, KG: n = 246). Die Studiengruppen unterschieden sich nicht in Bezug auf Gestationsalter, Geburtsgewicht, Häufigkeit verschiedener Herzfehler, Antibiotikatherapie und Erythrozytentransfusionen. Eine NEC trat bei 6 von 247 (2,4%) Patienten der KG und bei 3 von 242 (1,2%) Patienten der IG auf ( $p = 0,504$ ). Die NEC-bezogene Mortalität (KG: 0,4% vs. IG: 0,4%,  $p = 1,000$ ) und Gesamtmortalität (KG: 11% vs. IG: 8,7%,  $p = 0,448$ ) unterschieden sich nicht. Eine Subgruppenanalyse von insgesamt 152 Kindern mit Fehlbildung des Aortenbogens (z.B. Aortenisthmusstenose, unterbrochener Aortenbogen) ergab eine signifikante Reduktion der NEC-Rate von 5,6% auf 0% in der IG ( $p = 0,048$ ).

**Schlussfolgerung:** Obwohl es nur halb so viele NEC-Fälle in der IG als in der KG gab, war der Unterschied statistisch nicht signifikant. Die Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass besonders Neugeborene mit Fehlbildung des Aortenbogens von der routinemäßigen Gabe eines Probiotikums, welches mehrere Bakterienstämme beinhaltet, profitieren könnten.

## 2. Abstract

**Background:** Necrotizing enterocolitis (NEC) is among the most frequent and lethal gastrointestinal diseases of neonates. Survival of NEC is often associated with severe gastrointestinal and neurological long-term complications, making prevention of NEC of great importance. Besides premature infants, neonates with ductal-dependent congenital heart disease (CHD) are also at increased risk of developing NEC. There is strong evidence that application of dual-strain probiotics reduces the frequency of NEC and mortality in premature infants. Whether this effect can also be achieved in neonates with ductal-dependent CHD has not yet been investigated.

**Objectives:** We aimed to examine the effect of a dual-strain probiotic containing *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus acidophilus* on NEC frequency and mortality in neonates with ductal-dependent CHD.

**Methods:** This is a retrospective single-center cohort study on all neonates born within a 10-year period (2005-2014) with ductal-dependent CHD, who required prostaglandin E1 (PGE1) to maintain ductal patency. Clinical data were collected from medical files and statistically analyzed. Infants receiving the enteral dual-strain probiotic Infloran® formed the intervention group (IG) and were compared to infants without any supplementation of probiotics (historical control group, CG). Probiotics were administered on each day of PGE1 infusion and were paused only during antibiotic therapy. Outcomes of this study were diagnosis of NEC Stage  $\geq$ II (Modified Bell Stage), NEC-related mortality and overall mortality.

**Results:** 488 infants were included in the study (IG: n = 242, CG: n = 246). Groups were similar regarding birth weight, gestational age, distribution of heart defects, antibiotic therapy and erythrocyte transfusions. NEC appeared in 6 of 247 (2.4%) infants of the CG and in 3 of 242 (1.2%) infants of the IG ( $p = 0.504$ ). NEC-related mortality (CG: 0.4% vs. IG: 0.4%,  $p = 1.000$ ) and overall mortality (CG: 11% vs. IG: 8.7%,  $p = 0.448$ ) did not differ between the two groups. We found a significant reduction of NEC frequency in a subgroup analysis of 152 infants with aortic arch malformation (e.g., coarctation of the aorta, interrupted aortic arch) from 5.6% in the CG to 0% in the IG ( $p = 0.048$ ).

**Conclusion:** There were fewer NEC cases in the IG than in the CG; however, this was not statistically significant. Nevertheless, the results indicate that neonates with aortic arch malformation may benefit from a routine administration of a dual-strain probiotic.

### **3. Einleitung**

Teilinhalte dieses Kapitels wurden veröffentlicht in Neonatology (2020): „Effect of a Dual-Strain Probiotic on Necrotizing Enterocolitis in Neonates with Ductal-Dependent Congenital Heart Disease: A Retrospective Cohort Study“ (1).

Die nekrotisierende Enterokolitis (necrotizing enterocolitis, NEC) ist eine entzündliche Darmerkrankung von Neugeborenen und zählt zu den häufigsten gastrointestinalen Notfällen in der Neonatologie. Sie kann im Verlauf zu einer transmuralen Nekrose des Darms und in der Folge zu einem septischen Schock mit hoher Letalität führen, trotz adäquater intensivmedizinischer Behandlung. Die Prävention einer NEC ist deshalb von großer Bedeutung.

#### **3.1. Vorkommen**

Betroffen sind in erster Linie Frühgeborene (Gestationsalter <37 vollendete Schwangerschaftswochen) bzw. Kinder mit einem Geburtsgewicht < 1500 Gramm (very low birth weight, VLBW) (2), doch auch Reifgeborene können eine NEC entwickeln. Bei Reifgeborenen ist eine NEC häufig mit Komorbiditäten assoziiert, wie z.B. einem kongenitalen Herzfehler (congenital heart disease, CHD) (3-5). Insbesondere ductusabhängige bzw. zyanotische Herzfehler erhöhen bei Neugeborenen das Risiko, an einer NEC zu erkranken (3) – diese Form der NEC wird auch als „kardiogene NEC“ bezeichnet. Die NEC-Inzidenz von durchschnittlich 5,1% bei Säuglingen mit CHD (6) macht sie zu einer ähnlich stark betroffenen Risikogruppe für das Auftreten einer NEC wie Frühgeborene (7). Die Mortalität von Säuglingen mit kardiogener NEC ist jedoch höher als die von Säuglingen mit NEC ohne CHD (38% vs. 27%) (6). Nach einer Studie von Cheng et al. (8) ist die Mortalität bei Kindern mit kardiogener NEC höher, wenn sie an einem zyanotischen Herzfehler leiden, als bei Kindern mit azyanotischem Herzfehler (71% vs. 39%).

#### **3.2. Pathogenese**

Die Pathogenese der NEC wird als multifaktoriell angesehen. Bei Frühgeborenen scheinen die Unreife des intestinalen Immunsystems und der Darmbarriere sowie das durch Krankenhauskeime veränderte Darmmikrobiom eine übergeordnete Rolle zu spielen (9, 10). Die Integrität der intestinalen Epithelbarriere bei Frühgeborenen ist beeinträchtigt, wodurch es zu einer Invasion pathologischer Keime kommen kann (11). Diese bakterielle Translokation sowie die zusätzliche Einwirkung von äußeren Stressoren könnte zur Aktivierung einer inflammatorischen Kaskade beitragen (11). Im Gegensatz dazu scheint bei Kindern mit CHD einerseits eine Reduktion des mesenterialen Blutflusses und die damit einhergehende Minderperfusion des Gastrointestinaltraktes, und andererseits eine chronische Hypoxie bei der Entstehung einer NEC

von Bedeutung zu sein. In der Folge kann es auch hier zur Veränderung des intestinalen Mikrobioms sowie zu einer intestinalen Ischämie mit sekundärer Inflammation kommen (12, 13). Kinder mit zyanotischen CHD, die mit einer verminderten Sauerstoffsättigung des arteriellen Blutes einhergehen, können eine intestinale Hypoxie entwickeln, welche mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung einer schweren NEC assoziiert ist (14, 15). Andere Herzfehler führen zu einem diastolischen Rückfluss in der Aorta descendens, der seinerseits aufgrund der daraus folgenden, mesenterialen Minderperfusion („steal-Phänomen“) einen Risikofaktor für die Entstehung einer NEC darstellt (3, 16).

### **3.3. Klinik und Diagnostik**

Klinisch äußert sich eine NEC zunächst durch unspezifische Symptome wie z.B. Trinkschwäche, Lethargie, ein geblähtes Abdomen, Erbrechen, Apnoe und blutige Stühle (2). Im Verlauf kommt es zu dilatierten Darmschlingen und fehlender Darmperistaltik (17). Der Verdacht auf eine NEC kann radiologisch erhärtet werden, z.B. durch den Nachweis von portalvenöser Gasansammlung, Lufteinschlüssen in der Darmwand (Pneumatosis intestinalis) oder einer Darmwandperforation als diagnostisches Spätzeichen mit folglich freier Luft im Abdomen (2, 9). In manchen Fällen können jedoch auch im Spätstadium einer NEC eindeutige radiologische Zeichen fehlen (9), was die Diagnosestellung oft erschwert.

### **3.4. Therapie**

Die Therapie erfolgt primär konservativ durch Gabe von Breitbandantibiotika, Umstellung auf ausschließlich parenterale Ernährung und Entleerung des Magens durch eine Magensonde (2, 9). Im Verlauf wird jedoch bei bis zu 50% der betroffenen Kinder eine operative Therapie notwendig (2). Hierbei werden in der Regel der Darm durch eine Stomaanlage entlastet sowie gangränöse Darmabschnitte reseziert (9, 18), wodurch es zu Strikturen, intestinaler Obstruktion durch postoperative Adhäsionen und auch - bei einer ausgedehnten NEC - zu einem Kurzdarmsyndrom kommen kann (19). Kinder, die eine NEC überleben, können neben gastrointestinalen Komplikationen auch schwere neurologische Schäden davontragen, wie eine Zerebralparese, kognitive Störungen und schwere Sehstörungen (20). Die mit einer NEC verbundenen Komplikationen und Langzeitfolgen machen sie zu einer gefürchteten Erkrankung und einem wichtigen Forschungsthema.

### **3.5. Neue Forschungsansätze**

Um die Pathogenese der NEC besser verstehen zu können, wurden in der Vergangenheit sämtliche potenzielle Einflussfaktoren auf die Entstehung einer NEC erforscht, z.B. die Ernährung

(Muttermilch vs. Formula-Nahrung), der Geburtsmodus, Antibiotikatherapie und intestinale Hypoxie/Ischämie (21). Ihnen gemeinsam ist, dass diese Faktoren zu einer intestinalen Dysbiose beitragen können (12, 22, 23), wodurch die Frage, inwieweit das Darmmikrobiom an der Entstehung einer NEC beteiligt ist, immer weiter in den Fokus der Forschung geriet.

In Studien der vergangenen Dekade konnte wiederholt gezeigt werden, dass Probiotika dazu in der Lage sind, die NEC-Inzidenz und die Mortalität bei Frühgeborenen drastisch zu senken (24-26). Die Kombination verschiedener Bakterienstämme, insbesondere *Bifidobacterium infantis* und *Lactobacillus acidophilus*, zeigte den größten Effekt (24, 26, 27). Probiotika wirken sich durch verschiedenste Mechanismen positiv auf die intestinale Barrierefunktion und das Immunsystem aus. Sie können unter anderem die Permeabilität der Darmmukosa herabsetzen (28), die Adhäsion pathologischer Bakterien an das Darmepithel sowie deren Invasion in die Zellen hemmen (29), die intestinale Sekretion von Immunglobulin A fördern (30), die Produktion des immunregulierenden Zytokins TGF- $\beta$ 1 (31), sowie die Zytokinproduktion durch Makrophagen erhöhen (32). Außerdem sind Probiotika nach aktuellem Forschungsstand bei Frühgeborenen sicher in der Anwendung. Die Meta-Analyse von Guthmann et al. (33) schloss insgesamt 2193 Patienten ein, von denen 1117 Patienten Probiotika erhielten. Keiner dieser Patienten entwickelte eine Sepsis mit probiotischen Bakterienstämmen oder andere unerwünschte Wirkungen.

Ob Neugeborene mit CHD, insbesondere zyanotischen CHD, ebenfalls von einer Gabe von Probiotika profitieren, ist bisher nur unzureichend erforscht worden. Einzig die prospektive, randomisierte und kontrollierte Studie von Dilli et al. (34) untersuchte bisher den Effekt eines enteral verabreichten Bakterienstammes auf die NEC-Rate und Mortalität bei Kindern mit zyanotischem CHD und brachte vielversprechende Ergebnisse: die NEC-Rate konnte von 10% in der Placebogruppe auf 0% in der Interventionsgruppe reduziert werden. Die Mortalität sank von 28% auf 10%. Allerdings war die Studienpopulation mit insgesamt 100 Patienten sehr klein, die NEC Rate in der Kontrollgruppe vergleichsweise hoch und es wurde ein Synbiotikum bestehend aus nur einem Bakterienstamm (*Bifidobacterium lactis*) und Inulin verabreicht.

### **3.6. Zielsetzung**

Die vorliegende Arbeit untersucht nun als erste Studie den Effekt eines Probiotikums mit mehr als einem Bakterienstamm auf die NEC-Inzidenz und die Mortalität von Neugeborenen mit ductusabhängigem Herzfehler.



## 4. Methodik

Die Vorgehensweise ist in der Publikation in Neonatology (2020): „Effect of a Dual-Strain Probiotic on Necrotizing Enterocolitis in Neonates with Ductal-Dependent Congenital Heart Disease: A Retrospective Cohort Study“ (1) beschrieben.

### 4.1. Studiendesign

Dies ist eine retrospektive Studie der Charité – Universitätsmedizin Berlin und des Deutschen Herzzentrums Berlin, in welcher die Daten von 488 Patienten aus einem Zeitraum von 10 Jahren (2005-2014) analysiert wurden.

### 4.2. Einschlusskriterien

In die Datenanalyse wurden alle zwischen Januar 2005 und Dezember 2014 geborenen Kinder eingeschlossen, die bei stationärer Aufnahme jünger als 28 Tage alt waren und einen ductusabhängigen Herzfehler hatten. Ein ductusabhängiger Herzfehler wurde definiert als eine angeborene Herzfehlbildung, bei welcher ein offener Ductus arteriosus Botalli zur Sicherstellung der pulmonalen oder systemischen Perfusion notwendig war. Neugeborene mit ductusabhängigem Herzfehler erhalten eine kontinuierliche intravenöse Gabe von Prostaglandin E1 (PGE1, Alprostadil, Minprog®), um den Ductus arteriosus Botalli auch nach der Geburt offenzuhalten. Die PGE1-Gabe geschieht in der Regel bis zur Therapie des Herzfehlers, entweder durch eine therapeutischen Herzkatheterintervention oder eine operative Versorgung des Herzfehlers.

Aus der Studie ausgeschlossen wurden Neugeborene, welche am ersten Lebenstag verstorben sind, primär palliativmedizinisch behandelt wurden oder bei denen nicht eindeutig beschrieben wurde, ob sie Probiotika erhielten oder nicht.

### 4.3. Intervention

Im Jahr 2008 wurde das Probiotikum Infloran®, welches die Bakterienstämme *Bifidobacterium infantis* und *Lactobacillus acidophilus* enthält, aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse zur NEC Prophylaxe bei Frühgeborenen in den Therapiestandard von Frühgeborenen an der Charité aufgenommen. Da Säuglinge mit ductusabhängigem Herzfehler ebenfalls ein erhöhtes Risiko für eine NEC aufweisen und man annahm, dass Probiotika auch hier einen gesundheitlichen Vorteil bringen könnten, wurde im Jahr 2009 am Universitätsklinikum Charité Berlin und am Deutschen Herzzentrum Berlin die Indikation für eine routinemäßige Gabe von Probiotika auf diese Patientengruppe ausgeweitet. Die bis dato fehlende Evidenz für die Gabe eines Probiotikums in dieser Patientengruppe wurde niedriger gewichtet als der Vorteil einer potenziellen Verringerung der NEC Inzidenz. Seitdem bekommen Säuglinge (Früh- und Termingeborene), welche eine

kontinuierliche PGE1-Infusion aufgrund eines ductusabhängigen Herzfehlers erhalten, zusätzlich das Probiotikum Infloran® per oral. Dieses enthält pro Kapsel je 1 Milliarde lebende Bakterien der Stämme *Lactobacillus acidophilus* und *Bifidobacterium infantis*. Die Patienten erhalten zweimal täglich ½ Kapsel Infloran®. Die Verabreichung erfolgt für die Dauer der PGE1-Infusion und wird nur während eines Antibiotikaeinsatzes pausiert.

Für diese Studie wurden alle Patienten, welche die Einschlusskriterien erfüllten, in zwei Gruppen eingeteilt und miteinander verglichen: die Interventionsgruppe, welche Infloran® erhielt und die (historische) Vergleichsgruppe, welche keinerlei Probiotika erhielt.

#### **4.4. Datenerhebung**

Alle der Studie zugrundeliegenden Daten entstammen den Patientenakten in elektronischer und Papierform. Hieraus wurden demografische Daten, Details zur kardiologischen Diagnose, relevante Angaben zur Geburt, zum prä-, post- und operativen Verlauf, zur Dauer der PGE1- und Infloran®-Gabe, zur NEC-Diagnose sowie zur Mortalität entnommen und in tabellarischer Form zusammengetragen. Alle Daten stammen aus dem Zeitraum von der Geburt der Kinder bis zu deren Entlassung aus der Klinik bzw. zu deren Tod – je nachdem, was zuerst eintrat. Zu den erhobenen Daten gehörten auch postnatale Laborparameter (arterieller Nabelschnur-pH, Hämoglobin, Leukozyten, Thrombozyten), Komorbiditäten (Atemnotsyndrom, Bronchopulmonale Dysplasie, intrakranielle Blutung, periventrikuläre Leukomalazie, Frühgeborenen-Retinopathie), (minimal-)invasive Eingriffe (Rashkind-Manöver, Herzkatheter), die Krankenhausaufenthaltsdauer und weitere, sodass pro Studienteilnehmer mehr als 90 Angaben erfasst worden sind.

Als primärer Endpunkt der Studie wurde die Diagnose NEC des Stadiums IIa oder höher definiert. Die Stadieneinteilung erfolgte nach den modifizierten Bell-Kriterien (17). Diese teilen eine NEC anhand vegetativer Symptome, intestinaler Symptome sowie radiologischer Zeichen in 3 Stadien mit je 2 Untergruppen ein, wobei radiologische Zeichen wie Ileus oder Pneumatosis intestinalis ab dem Stadium IIa obligatorisch sind. Sekundäre Endpunkte der Studie waren die Gesamtmortalität vor stationärer Entlassung sowie die NEC-bezogene Mortalität, d.h. die Mortalität, welche in eindeutigen Zusammenhang mit dem Auftreten einer NEC gebracht werden konnte. Zusätzlich wurde der Einfluss des Probiotikums auf unterschiedliche Arten von Herzfehlern untersucht. Auch Ergebnisse der Blutkulturen der Patienten wurden in die Studie mit einbezogen, um die Infloran®-Gabe als Ursache einer Infektion auszuschließen.

#### **4.5. Statistische Analyse**

Nach Zusammentragung aller relevanten Daten wurden diese mittels IBM SPSS Statistics, Version 24.0 (IBM Inc., Armonk, NY, USA) statistisch ausgewertet. Die Ergebnisse der deskriptiven Statistik wurden in Tabellenform abgebildet, wobei von kategorialen Variablen die absolute und relative Häufigkeit und von metrischen Variablen der Median und die Spannweite dargestellt wurden. Mittels statistischer Tests wurden die Ergebnisse der Interventions- und Kontrollgruppe miteinander verglichen. Dichotome Variablen wurden mithilfe des Exakten Fisher-Tests und des Chi-Quadrat-Tests auf Unabhängigkeit überprüft. Die Analyse metrischer Variablen erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Ergebnisse mit einem p-Wert  $<0,05$  galten hierbei als statistisch signifikant.

## 5. Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in Neonatology (2020): „Effect of a Dual-Strain Probiotic on Necrotizing Enterocolitis in Neonates with Ductal-Dependent Congenital Heart Disease: A Retrospective Cohort Study“ (1). Eine detaillierte tabellarische Darstellung der Studienergebnisse ist in dieser Publikation aufgeführt.

### 5.1. Studienpopulation und deren Merkmale

Insgesamt erfüllten 507 Patienten die Einschlusskriterien, wovon 19 Kinder aus folgenden Gründen aus der Studie ausgeschlossen wurden: Bei 8 der Patienten fehlten relevante Angaben zur Probiotikum-Gabe, 7 der Kinder waren innerhalb ihrer ersten 24 Lebensstunden verstorben und 4 Neugeborene wurden nach ihrer Geburt primär palliativ behandelt. Somit konnten 488 Kinder in die Studie eingeschlossen werden, von denen 242 Patienten Infloran® erhielten (Interventionsgruppe) und 246 Patienten keinerlei Probiotika verabreicht bekamen (Kontrollgruppe).

Der Vergleich dieser beider Patientengruppen ergab keine demografischen Merkmalsunterschiede, jedoch gab es in der Interventionsgruppe signifikant mehr Kinder, die in der Charité Berlin geboren wurden und die per Sectio caesarea entbunden wurden, als in der Kontrollgruppe. Bezüglich der Häufigkeit der verschiedenen ductusabhängigen Herzfehler gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen, wobei die häufigsten Herzfehler die Aortenisthmusstenose und die Dextro-Transposition der großen Arterien waren. Die Patienten der Interventionsgruppe erhielten die PGE1-Infusion im Durchschnitt über längere Zeit, als die der Kontrollgruppe (durchschnittlich 8 vs. 6 Tage,  $p < 0,001$ ). Insgesamt wurde PGE1 in der Interventionsgruppe 2455 Tage lang verabreicht und in der Kontrollgruppe 1788 Tage lang. In der Kontrollgruppe wurden mehr Kinder mechanisch beatmet ( $n = 110$  vs.  $77$ ,  $p = 0,003$ ) und es erhielten mehr Kinder Surfactant ( $n = 14$  vs.  $4$ ,  $p = 0,028$ ) als in der Interventionsgruppe. Es wurde kein Unterschied in der Häufigkeit von frühen und späten Neugeboreneninfektionen (early-onset infection, late-onset infection) zwischen beiden Gruppen festgestellt. Es zeigte sich eine Tendenz, dass die Kinder der Interventionsgruppe seltener mit Antibiotika behandelt wurden als die der Kontrollgruppe ( $n = 107$  vs.  $131$ ,  $p = 0,051$ ), wenngleich diese Tendenz statistisch nicht signifikant war.

### 5.2. Studienendpunkte

Insgesamt wurde bei 9 der 488 Patienten eine NEC des Stadiums IIa oder höher diagnostiziert. In 7 von 9 Fällen wurde die Diagnose noch durch die Ergebnisse histologischer Untersuchungen oder

den operativen Befund gestützt. Die NEC-Diagnosen wurden zwischen dem 5.-35. Lebenstag der Patienten gestellt, davon 6 Diagnosen vor operativer Herzfehlerkorrektur und 3 postoperativ. 1 von 9 der NEC-Patienten wurde ausschließlich konservativ behandelt, die übrigen 8 betroffenen Kinder wurden zusätzlich chirurgisch versorgt. Unter den NEC-Patienten wiesen 4 Kinder eine Aortenisthmusstenose, 2 ein Hypoplastisches Linksherzsyndrom, 2 eine Dextro-Transposition der großen Arterien (d-TGA) und 1 Patient eine Totale Lungenvenenfehlmündung auf.

Beim Vergleich beider Studiengruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Auftrittshäufigkeit einer NEC (Kontrollgruppe n = 6 bzw. 2,4% vs. Interventionsgruppe n = 3 bzw. 1,2%, p = 0,504). Ebenso wenig unterschieden sich die Gesamtmortalität (Kontrollgruppe 11% vs. Interventionsgruppe 8,7%, p = 0,448) und die NEC-bezogene Mortalität (Kontrollgruppe 0,4% vs. Interventionsgruppe 0,4%, p = 1,000) der beiden Studiengruppen. Auch nach Betrachtung der Untergruppen „VLBW“ und „nicht-VLBW“ zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Outcomes. Zusätzlich wurden die Studiengruppen nach den verschiedenen Herzfehlern eingeteilt und analysiert. Bei Kindern mit angeborener Fehlbildung des Aortenbogens, welche zu einer Minderperfusion der Aorta führte, zeigte sich eine signifikante Reduktion der NEC-Fälle bei der Interventionsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe (n = 4 bzw. 5,6% vs. n = 0 bzw. 0%, p = 0,048). Zu diesen Herzfehlern zählten in erster Linie die Aortenisthmusstenose (coarctation of the aorta, CoA) und der unterbrochene Aortenbogen (interrupted aortic arch, IAA) sowie weitere multiple Herzfehler, welche eine CoA oder IAA miteinschlossen. In der Interventionsgruppe gehörten dazu 80 Patienten, inklusive Kinder mit folgenden multiplen Herzfehlern: Aortenatresie + CoA (n = 1), Aortenatresie + IAA (n = 1), Aortenstenose + CoA (n = 3), d-TGA + CoA (n = 11). In der Kontrollgruppe zählten dazu 72 Patienten, u.a. Kinder mit einer Aortenstenose + CoA (n = 4), d-TGA + CoA (n = 4) und unbalanciertem atrioventrikulären Septumdefekt mit univentrikulärem Rechtsherz + CoA (n = 1).

### **5.3. Anwendungssicherheit von Infloran®**

Die Ergebnisse dieser Studie ergaben keinen Hinweis auf unerwünschte Wirkungen einer Infloran®-Gabe. Insgesamt wurde bei 86 von 242 Patienten (35,5%) der Interventionsgruppe eine Blutkultur entnommen. In keiner der Blutkulturen konnten die Bakterienstämme *Bifidobacterium infantis* oder *Lactobacillus acidophilus* nachgewiesen werden. 6 der 86 Blutkulturen wurden positiv getestet auf Staphylokokken (n = 3), Streptokokken (n = 2) sowie Escherichia Coli (n = 1). In der Kontrollgruppe gab es jeweils eine positive Blutkultur für Staphylokokken und Acinetobacter.

#### **5.4. Stichprobengröße für weiterführende Studien**

Mithilfe des Programms OpenEpi, version 3.01 (Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Atlanta, GA, USA) wurde anhand der Kelsey-Formel berechnet, welche Stichprobengröße eine randomisierte kontrollierte Studie bräuchte, um eine signifikante Reduktion der NEC-Inzidenz von 2,4% auf 1,2% durch die Gabe von Probiotika aufzuzeigen. Bei einem Alphafehler-Niveau von 5% und einer Teststärke von 80% müssten mindestens 3786 Patienten in die Studie eingeschlossen werden, davon je 1893 Patienten in der Interventions- und Kontrollgruppe (Zuteilungsverhältnis 1:1).

## 6. Diskussion

Teilinhalte dieses Kapitels wurden veröffentlicht in Neonatology (2020): „Effect of a Dual-Strain Probiotic on Necrotizing Enterocolitis in Neonates with Ductal-Dependent Congenital Heart Disease: A Retrospective Cohort Study“ (1).

### 6.1. Probiotika als NEC-Prophylaxe bei Neugeborenen mit ductusabhängigem Herzfehler?

Anhand der Studienergebnisse kann derzeit keine allgemeine Empfehlung zur routinemäßigen Infloran®-Gabe bei Neugeborenen mit ductusabhängigem Herzfehler ausgesprochen werden. Obwohl es weniger NEC-Fälle in der Interventionsgruppe als in der Kontrollgruppe gab, war dieses Ergebnis statistisch nicht signifikant. Allerdings deuten die Studienergebnisse darauf hin, dass Probiotika, welche die Bakterienstämme *Bifidobacterium infantis* und *Lactobacillus acidophilus* enthalten, die NEC-Inzidenz bei Säuglingen mit Fehlbildung des Aortenbogens und damit einhergehender Hypoperfusion der Aorta (und der mesenterialen Gefäße) senken könnten. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass eine verminderte Systemperfusion und des Gastrointestinaltraktes sowie eine kardial bedingte chronische Hypoxie zu einer Dysbiose des Darms beiträgt, die durch die Gabe von Probiotika positiv verändert werden könnte. Allerdings ist zu beachten, dass die statistische Power der Subgruppenanalyse aufgrund einer zu kleinen Stichprobengröße gering ausfällt. Des Weiteren ist nicht ausgeschlossen, dass sich die klinische Versorgung von Patienten mit CHD während der langen Studienperiode von 10 Jahren änderte, sodass auch dies Einfluss auf die NEC-Rate gehabt haben könnte.

Die Inzidenz einer kardiogenen NEC variiert stark von Studie zu Studie (0-23,7%) (6) und war in dieser Studienpopulation mit 2,4% vergleichsweise gering. Dadurch bedarf es, wie zuvor beschrieben, nahezu 4000 Studienteilnehmer, um eine signifikante Reduktion der NEC-Rate bei Neugeborenen mit CHD um 50% nachzuweisen. Eine derart große Teilnehmerzahl ist nur mit einer Multicenterstudie realisierbar.

### 6.2. Darmmikrobiom und dessen Einflussfaktoren

In vergangenen Studien konnte aufgezeigt werden, dass Kinder mit CHD eine intestinale Dysbiose aufweisen, welche sich durch eine verringerte Anzahl an Bifidobacteriaceae und Bakterien insgesamt äußerte (35) sowie durch eine verminderte Anzahl an Bakterien der Gattung *Lactobacillus* (23). Ob Probiotika dazu in der Lage sind, die mikrobielle Besiedlung des Darms bei Kindern mit CHD positiv zu beeinflussen, ist derzeit noch unklar. Umenai et al. (36) vernahmen bei Kindern mit CHD nach der perioperativen Gabe eines monokulturellen

Probiotikums, welches *Bifidobacterium breve* enthielt, eine signifikant gesteigerte Anzahl an *B. breve* sowie eine verminderte Anzahl an Enterobacteriaceae und Pseudomonas in den Stuhlproben der Kinder. Ellis et al. (35) konnten durch die Verabreichung eines Probiotikums, welches Bifidobakterien des Stammes *B. infantis* enthielt, keine Veränderung der mikrobiellen Besiedlung bei Kindern mit CHD nachweisen. In beiden Studien wurden Probiotika mit jeweils nur einem Bakterienstamm eingesetzt, was den Effekt auf das Darmmikrobiom im Vergleich zu Probiotikum-Mixturen möglicherweise geschwächt hat. In einer Beobachtungsstudie an 80 Frühgeborenen (ohne CHD) untersuchten Van Best et al. (37) den Einfluss von zwei verschiedenen Probiotikum-Mixturen auf das Darmmikrobiom der Kinder. Hierbei konnte eine erfolgreiche Besiedlung des Darms durch die probiotischen Bakterienstämme nachgewiesen werden, die auch nach Absetzen der Probiotika bis zu mehrere Wochen persistierte, wobei sich die mikrobiellen Profile der beiden Probiotikum-Gruppen signifikant voneinander unterschieden. In beiden Probiotikum-Gruppen wurde eine verminderte Anzahl an Escherichia, Enterococcus und Klebsiella im Stuhl im Vergleich zur Placebo-Gruppe festgestellt. Daraus wird deutlich, dass unterschiedliche Kombinationen von Bakterienstämmen das Mikrobiom auf verschiedene Weise verändern können. Die Kombination der verschiedenen Bakterienstämme scheint ebenfalls Auswirkungen auf die längerfristige mikrobielle Besiedlung des Darms zu haben: In beiden verabreichten Probiotikum-Präparaten war unter anderem das Bakterium *Lactobacillus acidophilus* enthalten, doch nach Absetzen der Probiotika persistierte *L. acidophilus* im Darm nur in einer Interventionsgruppe, jedoch nicht in der anderen. Ob ein Bakterienstamm eines Probiotikums im Darm persistiert, scheint somit auch davon abzuhängen, mit welchen Bakterienstämmen er kombiniert wird. Inwieweit sich Probiotika mit mehreren Bakterienstämmen auf die bakterielle Besiedlung des Darms bei Neugeborenen mit CHD auswirken, sollte weiter untersucht werden, um deren Einfluss auf die NEC-Inzidenz und Mortalität bei dieser Patientengruppe besser verstehen und beurteilen zu können. Aufgrund eines Mangels an Daten konnten Stuhlprobenuntersuchungen in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt werden.

Andere Faktoren, die Einfluss auf das intestinale Mikrobiom haben, sind der Geburtsmodus und Antibiotikatherapien (22). Da in der Interventionsgruppe der vorliegenden Studie signifikant mehr Kinder per Sectio caesarea entbunden wurden und die Patienten der Interventionsgruppe tendenziell seltener Antibiotika erhielten als in der Kontrollgruppe, könnte das Studienergebnis durch diese beiden Variablen beeinflusst worden sein. Jedoch ist noch immer umstritten, ob der Geburtsmodus und Antibiotikatherapien überhaupt als unabhängige Risikofaktoren für die Entstehung einer NEC gelten (21).



Auch die Ernährung der Neugeborenen hat Auswirkungen auf die Entwicklung des Darmmikrobioms (22). Zudem gilt die Ernährung von Muttermilch bei Frühgeborenen als protektiv im Hinblick auf die Entstehung einer NEC (38, 39) und auch bei Neugeborenen mit CHD scheint Ernährung mit Muttermilch mit einem geringeren Risiko für das Auftreten einer präoperativen NEC assoziiert zu sein (40). Die Patienten der vorliegenden Arbeit erhielten bevorzugt Muttermilch und zweitrangig Formula-Nahrung, wenn keine Muttermilch zur Verfügung stand. Die Ernährung der Kinder wurde jedoch nur unzureichend dokumentiert, weshalb dieser Faktor in der retrospektiven Datenanalyse nicht berücksichtigt werden konnte. Dies könnte einen Einfluss auf die Ergebnisse dieser Studie gehabt haben.

Eine kürzlich veröffentlichte Meta-Analyse von Beghetti et al. (41) deutet darauf hin, dass die Wirkung von Probiotika durch die Ernährung beeinflusst werden kann. Es wurde verglichen, welchen Effekt Probiotika auf das NEC-Risiko bei Frühgeborenen besaßen, die entweder ausschließlich Muttermilch als Nahrung bekamen oder Formula-Nahrung allein bzw. mit Muttermilch kombiniert. Die Subgruppenanalyse ergab unter anderem, dass *Bifidobacterium lactis* zwar in beiden Gruppen das NEC-Risiko verringerte, jedoch mit einer größeren Effektstärke in der Gruppe, die ausschließlich Muttermilch als Nahrung bekam (OR 0,04 vs. OR 0,32). Inwieweit die Wirksamkeit von Probiotika bei Neugeborenen mit CHD durch ihre Ernährung beeinflusst werden kann, wurde bislang nicht untersucht.

Die Frage, welche Faktoren die größte Wirkung auf die mikrobielle Besiedlung des Darms bei Neugeborenen mit CHD haben und inwieweit sich diese Faktoren gegenseitig beeinflussen, ist von großem Interesse.

### **6.3. Die kardiogene NEC als eigenständiges Krankheitsbild**

Es wird deutlich, dass das Themenfeld der NEC bei Neugeborenen mit CHD noch viele Fragen aufwirft, die auf Grundlage der aktuellen Studien noch nicht hinreichend beantwortet werden können. Vergleiche der klassischen NEC mit der CHD-assoziierten (kardiogenen) NEC zeigten immer wieder deutliche Unterschiede in der Epidemiologie, dem Pathomechanismus, dem Krankheitsverlauf und Outcome der Patienten auf. In den vergangenen Jahren wurde zunehmend diskutiert, ob es sich bei der klassischen und der kardiogenen NEC um zwei unterschiedliche Entitäten handelt (6, 13, 42).

Doch auch innerhalb der Risikogruppe „Neugeborene mit CHD“ ist es sinnvoll, verschiedene Pathomechanismen in Erwägung ziehen. So könnte einer präoperativ entwickelten NEC ein anderer Pathomechanismus zugrunde liegen als einer postoperativ entwickelten NEC. In der

vorliegenden Arbeit wurden 3 der NEC-Diagnosen innerhalb von 72h postoperativ gestellt. Ein Patient, welcher eine NEC noch präoperativ entwickelte, bekam die Diagnose 1 Tag nach einer Ballon-Atrioseptostomie (Rashkind-Manöver). Auch hier könnte ein Zusammenhang zwischen dem invasiven Eingriff und dem Auftreten der NEC bestanden und sich im Pathomechanismus von den übrigen präoperativ aufgetretenen NEC-Fällen unterschieden haben.

Surmeli Onay et al. (43) untersuchten in einer Pilotstudie an Frühgeborenen (ohne CHD), welche Rolle eine Hypoxie/Ischämie in der Pathophysiologie einer früh auftretenden NEC ( $\leq 7$ . Lebenstag) und einer klassischen NEC ( $> 7$ . Lebenstag) spielt. Ihre Studienergebnisse deuten darauf hin, dass Frühgeborene, die innerhalb der ersten 7 Lebenstage eine NEC oder NEC-ähnliche Erkrankung entwickeln, bereits in utero eine intestinale Gewebsschädigung und Inflammation aufgrund eines hypoxisch-ischämischen Events erlitten haben könnten, welche sich dann in der ersten Lebenswoche als NEC bzw. NEC-ähnliche Erkrankung klinisch manifestiert. Die Autoren sprechen sich deshalb dafür aus, für diese Fälle den Terminus “Hypoxic-Ischemic Enterocolitis (HIEnt)” zu verwenden. In der vorliegenden Arbeit entwickelte ein Patient aus der Interventionsgruppe innerhalb der ersten 7 Lebenstage eine NEC. Würde man die Hypothese von Surmeli Onay et al. auf Reifgeborene übertragen, könnte diesem NEC-Fall ebenfalls ein anderer Pathomechanismus zugrunde liegen als den übrigen 8 NEC-Fällen dieser Arbeit. Die Studie von Surmeli Onay et al. hat einige Limitationen, z.B. wurden auch NEC-Fälle des Stadiums I nach Bell in die Studie eingeschlossen. Nichtsdestotrotz wird deutlich, dass unterschiedlichste Pathomechanismen zu einer ähnlichen klinischen Ausprägung führen können und die Differenzierung unterschiedlicher NEC-Formen von großer Bedeutung ist (44). Ein gründliches Verständnis um die Pathogenese einer NEC ist entscheidend für die Entwicklung effektiverer diagnostischer Maßnahmen, wirksamer Präventionsstrategien und letztendlich für die Verbesserung des Outcomes der betroffenen Patienten.

#### **6.4. Weiterführende Studien**

Zukünftige Studien könnten folgende Hypothese zugrunde legen: Ductusabhängige Herzfehler erhöhen das Risiko für die Entstehung einer NEC, wohingegen eine prophylaktische Verabreichung von Probiotika das intestinale Mikrobiom positiv verändern und damit das NEC-Risiko in dieser Risikogruppe verringern kann. Klinische Pilotstudien könnten diese Hypothese untersuchen und dabei die Analyse von Stuhlproben aller Patienten zu Beginn, während und nach der Verabreichung von Probiotika beinhalten. Außerdem sollte die Ernährung der Neugeborenen nach einem standardisierten Ernährungsprotokoll erfolgen und genau dokumentiert werden. Um die Anwendungssicherheit des verabreichten Probiotikums nachweisen zu können, sollte bei allen

Patienten eine Blutkultur abgenommen werden, z.B. zum Zeitpunkt der operativen Herzfehlerkorrektur.

### **6.5. Schlussfolgerung**

Probiotika, welche die Bakterienstämme *Bifidobacterium infantis* und *Lactobacillus acidophilus* enthalten, könnten dazu in der Lage sein, die NEC-Inzidenz bei Neugeborenen mit ductusabhängigem Herzfehler zu senken (1). Diese Annahme lässt sich aufgrund der begrenzten Anzahl der untersuchten Neugeborenen jedoch nicht beweisen. Die Studienergebnisse deuten darauf hin, dass besonders diejenigen Kinder davon profitieren könnten, bei denen die Art des Herzfehlers zu einer verminderten aortalen und in der Folge auch intestinalen Perfusion führt (1). Weitere Studien mit deutlich größeren Studienpopulationen wären notwendig, um eine eindeutige Empfehlung zur Verabreichung von Probiotika bei dieser Risikogruppe aussprechen zu können. Es bleibt weiterhin fraglich, welchen Stellenwert das Mikrobiom des Darms von Neugeborenen mit CHD in der Entstehung der kardiogenen NEC einnimmt und wodurch es vorrangig beeinflusst wird.

## 7. Referenzen

1. Kocjancic L, Bühner C, Berger F, Boos V. Effect of a Dual-Strain Probiotic on Necrotizing Enterocolitis in Neonates with Ductal-Dependent Congenital Heart Disease: A Retrospective Cohort Study. *Neonatology* 2020; 117(5):569–76.
2. Lin PW, Stoll BJ. Necrotising enterocolitis. *Lancet* 2006; 368(9543):1271–83.
3. McElhinney DB, Hedrick HL, Bush DM, Pereira GR, Stafford PW, Gaynor JW, Spray TL, Wernovsky G. Necrotizing enterocolitis in neonates with congenital heart disease: risk factors and outcomes. *Pediatrics* 2000; 106(5):1080–7.
4. Lambert DK, Christensen RD, Henry E, Besner GE, Baer VL, Wiedmeier SE, Stoddard RA, Miner CA, Burnett J. Necrotizing enterocolitis in term neonates: data from a multihospital health-care system. *J Perinatol* 2007; 27(7):437–43.
5. Ostlie DJ, Spilde TL, St Peter SD, Sexton N, Miller KA, Sharp RJ, Gittes GK, Snyder CL. Necrotizing enterocolitis in full-term infants. *J Pediatr Surg* 2003; 38(7):1039–42.
6. Siano E, Lauriti G, Ceccanti S, Zani A. Cardiogenic Necrotizing Enterocolitis: A Clinically Distinct Entity from Classical Necrotizing Enterocolitis. *Eur J Pediatr Surg* 2019; 29(1):14–22.
7. Battersby C, Santhalingam T, Costeloe K, Modi N. Incidence of neonatal necrotising enterocolitis in high-income countries: a systematic review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2018; 103(2):F182-F189.
8. Cheng W, Leung MP, Tam PK. Surgical intervention in necrotizing enterocolitis in neonates with symptomatic congenital heart disease. *Pediatr Surg Int* 1999; 15(7):492–5.
9. Neu J, Walker WA. Necrotizing enterocolitis. *N Engl J Med* 2011; 364(3):255–64.
10. Emami CN, Petrosyan M, Giuliani S, Williams M, Hunter C, Prasadarao NV, Ford HR. Role of the host defense system and intestinal microbial flora in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Surg Infect (Larchmt)* 2009; 10(5):407–17.
11. Anand RJ, Leaphart CL, Mollen KP, Hackam DJ. The role of the intestinal barrier in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Shock* 2007; 27(2):124–33.
12. Ellis CL, Rutledge JC, Underwood MA. Intestinal microbiota and blue baby syndrome: probiotic therapy for term neonates with cyanotic congenital heart disease. *Gut Microbes* 2010; 1(6):359–66.

13. Bubberman JM, van Zoonen A, Bruggink JLM, van der Heide M, Berger RMF, Bos AF, Kooi EMW, Hulscher JBF. Necrotizing Enterocolitis Associated with Congenital Heart Disease: a Different Entity? *J Pediatr Surg* 2019; 54(9):1755–60.
14. DeWitt AG, Charpie JR, Donohue JE, Yu S, Owens GE. Splanchnic near-infrared spectroscopy and risk of necrotizing enterocolitis after neonatal heart surgery. *Pediatr Cardiol* 2014; 35(7):1286–94.
15. Stapleton GE, Eble BK, Dickerson HA, Andropoulos DB, Chang AC. Mesenteric Oxygen Desaturation in an Infant with Congenital Heart Disease and Necrotizing Enterocolitis. *Tex Heart Inst J* 2007; 34(4):442–4.
16. Carlo WF, Kimball TR, Michelfelder EC, Border WL. Persistent diastolic flow reversal in abdominal aortic Doppler-flow profiles is associated with an increased risk of necrotizing enterocolitis in term infants with congenital heart disease. *Pediatrics* 2007; 119(2):330–5.
17. Kliegman RM, Walsh MC. Neonatal necrotizing enterocolitis: Pathogenesis, classification, and spectrum of illness. *Current Problems in Pediatrics* 1987; 17(4):219–88.
18. Frost BL, Modi BP, Jaksic T, Caplan MS. New Medical and Surgical Insights Into Neonatal Necrotizing Enterocolitis: A Review. *JAMA Pediatr* 2017; 171(1):83–8.
19. Bazacliu C, Neu J. Necrotizing Enterocolitis: Long Term Complications. *Curr Pediatr Rev* 2019; 15(2):115–24.
20. Schulzke SM, Deshpande GC, Patole SK. Neurodevelopmental outcomes of very low-birth-weight infants with necrotizing enterocolitis: a systematic review of observational studies. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2007; 161(6):583–90.
21. Rose AT, Patel RM. A critical analysis of risk factors for necrotizing enterocolitis. *Semin Fetal Neonatal Med* 2018; 23(6):374–9.
22. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, van den Brandt PA, Stobberingh EE. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 2006; 118(2):511–21.
23. Xing J, Ying Y, Mao C, Liu Y, Wang T, Zhao Q, Zhang X, Yan F, Zhang H. Hypoxia induces senescence of bone marrow mesenchymal stem cells via altered gut microbiota. *Nat Commun* 2018; 9(1):2020.

24. AlFaleh K, Anabrees J. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; (4):CD005496.
25. Olsen R, Greisen G, Schröder M, Brok J. Prophylactic Probiotics for Preterm Infants: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Neonatology* 2016; 109(2):105–12.
26. Dermyshe E, Wang Y, Yan C, Hong W, Qiu G, Gong X, Zhang T. The “Golden Age” of Probiotics: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized and Observational Studies in Preterm Infants. *Neonatology* 2017; 112(1):9–23.
27. Morgan RL, Preidis GA, Kashyap PC, Weizman AV, Sadeghirad B. Probiotics Reduce Mortality and Morbidity in Preterm, Low-Birth-Weight Infants: A Systematic Review and Network Meta-analysis of Randomized Trials. *Gastroenterology* 2020; 159(2):467–80.
28. Stratiki Z, Costalos C, Sevastiadou S, Kastanidou O, Skouroliakou M, Giakoumatou A, Petrohilou V. The effect of a bifidobacter supplemented bovine milk on intestinal permeability of preterm infants. *Early Hum Dev* 2007; 83(9):575–9.
29. Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 1994; 35(4):483–9.
30. Xiao L, Gong C, Ding Y, Ding G, Xu X, Deng C, Ze X, Malard P, Ben X. Probiotics maintain intestinal secretory immunoglobulin A levels in healthy formula-fed infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Benef Microbes* 2019; 10(7):729–39.
31. Fujii T, Ohtsuka Y, Lee T, Kudo T, Shoji H, Sato H, Nagata S, Shimizu T, Yamashiro Y. *Bifidobacterium breve* enhances transforming growth factor beta1 signaling by regulating Smad7 expression in preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 43(1):83–8.
32. Marin ML, Tejada-Simon MV, Lee JH, Murtha J, Ustunol Z, Pestka JJ. Stimulation of cytokine production in clonal macrophage and T-cell models by *Streptococcus thermophilus*: comparison with *Bifidobacterium* sp. and *Lactobacillus bulgaricus*. *J Food Prot* 1998; 61(7):859–64.
33. Guthmann F, Kluthe C, Bühner C. Probiotics for prevention of necrotising enterocolitis: an updated meta-analysis. *Klin Pädiatr* 2010; 222(5):284–90.

34. Dilli D, Aydin B, Zenciroğlu A, Özyazici E, Beken S, Okumuş N. Treatment outcomes of infants with cyanotic congenital heart disease treated with synbiotics. *Pediatrics* 2013; 132(4):e932-8.
35. Ellis CL, Bokulich NA, Kalanetra KM, Mirmiran M, Elumalai J, Haapanen L, Schegg T, Rutledge JC, Raff G, Mills DA, Underwood MA. Probiotic administration in congenital heart disease: a pilot study. *J Perinatol* 2013; 33(9):691–7.
36. Umenai T, Shime N, Asahara T, Nomoto K, Itoi T. A pilot study of *Bifidobacterium breve* in neonates undergoing surgery for congenital heart disease. *J Intensive Care* 2014; 2:36.
37. van Best N, Trepels-Kottek S, Savelkoul P, Orlikowsky T, Hornef MW, Penders J. Influence of probiotic supplementation on the developing microbiota in human preterm neonates. *Gut Microbes* 2020; 12(1):1–16.
38. Lucas A, Cole TJ. Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet* 1990; 336(8730-8731):1519–23.
39. Altobelli E, Angeletti PM, Verrotti A, Petrocelli R. The Impact of Human Milk on Necrotizing Enterocolitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* 2020; 12(5).
40. Cognata A, Kataria-Hale J, Griffiths P, Maskatia S, Rios D, O'Donnell A, Roddy DJ, Mehollin-Ray A, Hagan J, Placencia J, Hair AB. Human Milk Use in the Preoperative Period Is Associated with a Lower Risk for Necrotizing Enterocolitis in Neonates with Complex Congenital Heart Disease. *J Pediatr* 2019; 215:11-16.e2.
41. Beghetti I, Panizza D, Lenzi J, Gori D, Martini S, Corvaglia L, Aceti A. Probiotics for Preventing Necrotizing Enterocolitis in Preterm Infants: A Network Meta-Analysis. *Nutrients* 2021; 13(1).
42. Diez S, Tievesch L, Weiss C, Halbfass J, Müller H, Besendörfer M. Clinical Characteristics of Necrotizing Enterocolitis in Preterm Patients With and Without Persistent Ductus Arteriosus and in Patients With Congenital Heart Disease. *Front Pediatr* 2020; 8:257.
43. Surmeli Onay O, Korkmaz A, Yigit S, Yurdakok M. Hypoxic-ischemic enterocolitis: a proposal of a new terminology for early NEC or NEC-like disease in preterm infants, a single-center prospective observational study. *Eur J Pediatr* 2020; 179(4):561–70.
44. Gordon PV, Swanson JR, MacQueen BC, Christensen RD. A critical question for NEC researchers: Can we create a consensus definition of NEC that facilitates research progress? *Semin Perinatol* 2017; 41(1):7–14.

## 8. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Liz Kocjancic, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **„Probiotika zur Prophylaxe der nekrotisierenden Enterokolitis bei Neugeborenen mit ductusabhängigem Herzfehler?“** selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

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

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift



## 9. Anteilserklärung

### Publikation 1:

**Kocjancic L**, Bühner C, Berger F, Boos V. Effect of a Dual-Strain Probiotic on Necrotizing Enterocolitis in Neonates with Ductal-Dependent Congenital Heart Disease: A Retrospective Cohort Study. *Neonatology* 2020; 117(5):569–76.

### Beitrag im Einzelnen:

Für die o.g. Publikation wurde ein Datensatz in tabellarischer Form mit insgesamt 42.011 Dateneingaben erstellt, von denen 40.284 durch Liz Kocjancic aus den Akten der Klinik für Neonatologie der Charité getätigt wurden. Hierfür wurden Patientenakten von 507 Patienten in elektronischer (SAP) und Papierform gesichtet. Kardiologische Diagnosen wurden durch Begutachtung echokardiografischer Befunde überprüft und gegebenenfalls korrigiert. In Zusammenarbeit mit dem Betreuer Dr. Vinzenz Boos wurden NEC-Diagnosen durch Begutachtung radiologischer, histologischer und operativer Befunde überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Die übrigen 1727 erhobenen Daten entstammen den Akten des Deutschen Herzzentrums Berlin (DHZB) und wurden von dem Betreuer Dr. Vinzenz Boos extrahiert, welcher gleichzeitig Mitarbeiter des DHZB ist. Die Analyse und statistische Auswertung der Daten wurden durch Liz Kocjancic getätigt. Das Vorgehen wurde zuvor mit dem Betreuer Dr. Vinzenz Boos beispielhaft besprochen. Die Abbildung 1 (Flussdiagramm) und alle Tabellen der o.g. Publikation wurden von Liz Kocjancic erstellt und nach Rückmeldung ihres Betreuers Dr. Vinzenz Boos überarbeitet. Liz Kocjancic verfasste die erste Version des Manuskriptes der o.g. Publikation.

Auf Grundlage des umfangreichen Datensatzes wurde noch ein weiterer Artikel mit Liz Kocjancic als Co-Autorin veröffentlicht, welcher in der vollständigen Publikationsliste aufgeführt ist.

---

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

---

Unterschrift der Doktorandin

## 10. Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE,SSCI  
 Selected Categories: "PEDIATRICS" Selected Category Scheme: WoS  
**Gesamtanzahl: 123 Journale**

| Rank | Full Journal Title   | Total Cites | Journal Impact Factor | Eigenfactor Score |
|------|--|-------------|-----------------------|-------------------|
| 1    | JAMA Pediatrics  | 8,016       | 12.004                | 0.044320          |
| 2    | JOURNAL OF THE AMERICAN ACADEMY OF CHILD AND ADOLESCENT PSYCHIATRY | 19,942      | 6.391                 | 0.019370          |
| 3    | PEDIATRICS   | 80,070      | 5.401                 | 0.109340          |
| 4    | PEDIATRIC ALLERGY AND IMMUNOLOGY                                   | 4,360       | 4.654                 | 0.006520          |
| 5    | JOURNAL OF ADOLESCENT HEALTH                                       | 15,535      | 3.957                 | 0.029260          |
| 6    | Seminars in Fetal & Neonatal Medicine                              | 2,428       | 3.846                 | 0.004670          |
| 7    | Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition        | 4,193       | 3.776                 | 0.008410          |
| 8    | EUROPEAN CHILD & ADOLESCENT PSYCHIATRY                             | 5,186       | 3.740                 | 0.009270          |
| 9    | JOURNAL OF PEDIATRICS  | 32,002      | 3.739                 | 0.045030          |
| 10   | Pediatric Obesity  | 1,944       | 3.713                 | 0.005650          |
| 11   | DEVELOPMENTAL MEDICINE AND CHILD NEUROLOGY                         | 12,256      | 3.532                 | 0.013840          |
| 12   | PEDIATRIC DIABETES   | 4,182       | 3.347                 | 0.008070          |
| 13   | PEDIATRIC DENTISTRY  | 3,000       | 3.312                 | 0.001950          |
| 14   | Maternal and Child Nutrition                                       | 2,829       | 3.305                 | 0.006390          |
| 15   | ARCHIVES OF DISEASE IN CHILDHOOD                                   | 16,646      | 3.158                 | 0.014630          |
| 16   | JOURNAL OF PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY AND NUTRITION                | 12,812      | 3.015                 | 0.016910          |
| 17   | SEMINARS IN PERINATOLOGY   | 3,334       | 2.883                 | 0.005240          |
| 18   | PEDIATRIC RESEARCH   | 13,760      | 2.880                 | 0.014760          |
| 19   | PEDIATRIC NEPHROLOGY   | 8,796       | 2.816                 | 0.010470          |
| 20   | PEDIATRIC PULMONOLOGY  | 6,746       | 2.801                 | 0.010550          |

| Rank | Full Journal Title                                       | Total Cites | Journal Impact Factor | Eigenfactor Score |
|------|--|-------------|-----------------------|-------------------|
| 21   | CLINICS IN PERINATOLOGY                                  | 2,468       | 2.798                 | 0.003890          |
| 21   | Pediatric Critical Care Medicine                         | 6,375       | 2.798                 | 0.011150          |
| 23   | PAEDIATRIC AND PERINATAL EPIDEMIOLOGY                    | 3,240       | 2.681                 | 0.004580          |
| 24   | Pediatric Rheumatology                                   | 1,290       | 2.673                 | 0.003320          |
| 25   | Paediatric Respiratory Reviews                           | 1,575       | 2.615                 | 0.002780          |
| 26   | Neonatology  | 2,539       | 2.554                 | 0.005840          |
| 27   | Academic Pediatrics                                      | 2,405       | 2.537                 | 0.008410          |
| 28   | EUROPEAN JOURNAL OF PAEDIATRIC NEUROLOGY                 | 2,764       | 2.496                 | 0.005830          |
| 29   | PEDIATRIC BLOOD & CANCER                                 | 10,879      | 2.486                 | 0.024130          |
| 30   | International Breastfeeding Journal                      | 855         | 2.475                 | 0.001230          |
| 31   | Seminars in Pediatric Surgery                            | 1,604       | 2.462                 | 0.002680          |
| 32   | Childhood Obesity  | 1,233       | 2.426                 | 0.004060          |
| 33   | Frontiers in Pediatrics                                  | 1,692       | 2.349                 | 0.006430          |
| 33   | JOURNAL OF HUMAN LACTATION                               | 2,031       | 2.349                 | 0.002870          |
| 35   | CURRENT OPINION IN PEDIATRICS                            | 3,328       | 2.333                 | 0.005680          |
| 35   | Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care | 686         | 2.333                 | 0.001420          |
| 37   | PEDIATRIC NEUROLOGY                                      | 5,398       | 2.326                 | 0.009570          |
| 38   | Hormone Research in Paediatrics                          | 1,892       | 2.324                 | 0.005050          |
| 39   | PEDIATRIC INFECTIOUS DISEASE JOURNAL                     | 11,681      | 2.317                 | 0.019500          |
| 40   | Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology           | 2,119       | 2.298                 | 0.004360          |
| 41   | Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society     | 942         | 2.269                 | 0.004450          |
| 42   | PEDIATRIC CLINICS OF NORTH AMERICA                       | 3,413       | 2.266                 | 0.004830          |

## **11. Publikation**

**Kocjancic L**, Bühner C, Berger F, Boos V. Effect of a Dual-Strain Probiotic on Necrotizing Enterocolitis in Neonates with Ductal-Dependent Congenital Heart Disease: A Retrospective Cohort Study. *Neonatology* 2020; 117(5):569–76.

<https://doi.org/10.1159/000508831>



















## **12. Lebenslauf**

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

### **13. Publikationsliste**

**Effect of a Dual-Strain Probiotic on Necrotizing Enterocolitis in Neonates with Ductal-Dependent Congenital Heart Disease: A Retrospective Cohort Study**

Kocjancic L, Bühler C, Berger F, Boos V

Neonatology 2020; 117(5):569–76.

Impact Factor: 2,554

**Delivery room asphyxia in neonates with ductal-dependent congenital heart disease: a retrospective cohort study**

Boos V, Kocjancic L, Berger F, Bühler C

J Perinatol 2019; 39(12):1627-1634.

Impact Factor: 2,183

## **14. Danksagung**

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Christoph Bühler für die Möglichkeit, unter seiner Leitung zu promovieren, für die fachliche Unterstützung und die stets prompten Rückmeldungen zu all meinen Anliegen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. Vinzenz Boos für sein großes Engagement, sein beeindruckendes Fachwissen, die lehrreiche und ehrliche Zusammenarbeit und seine beständige Hilfsbereitschaft. Seine Liebe zur Kinderheilkunde und Freude an der Wissenschaft waren immer eine große Inspiration für mich.

Von Herzen danke ich meinen Eltern Ilka und Frank Fettback, die mir meinen bisherigen Lebensweg überhaupt ermöglicht haben, stets hinter all meinen Entscheidungen stehen und mich in jeder Lebenslage unterstützen.

Mein tief verbundener Dank gilt außerdem meinem Ehemann Patrick Kocjancic, der mich mit seiner mitreißenden Art auch an schwierigen Tagen motivierte, immer ein offenes Ohr für mich hatte und als liebevoller Familienvater stets bemüht war, mir den nötigen Freiraum für diese Arbeit zu schaffen.