

Aus der Klinik:
Klinikum Westbrandenburg GmbH
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Charlottenstraße 72
14467 Potsdam

**Untersuchung des Einflusses des Probiotikums
Bifidobacterium lactis auf ausgewählte fäkale Immun- und
Entzündungsparameter und die Erkrankungsinzidenz bei durch
Kaiserschnitt geborenen Säuglingen**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizinwissenschaften

(Dr. rer. hum.)

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

CAROLIN BURO

Rostock, April 2019

Jahr der Einreichung: 2019

Jahr der Verteidigung: 2020

Gutachter:

1. Prof. Dr. Michael Radke, Klinikum Westbrandenburg
2. Prof. Dr. Bernd Gerber, Klinikum Südstadt Rostock
3. Prof. Dr. Holger Rohde, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----|
| INHALTSVERZEICHNIS | I |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | III |
| TABELLENVERZEICHNIS | IV |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | V |
| | |
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Der Kaiserschnitt im Wandel der Zeit..... | 1 |
| 1.2 Gesundheitliche Folgen des Kaiserschnittes für Mutter und Kind | 3 |
| 1.3 Konsequenzen für die neonatale Gastrointestinalbesiedlung und das Immunsystem | 4 |
| 1.3.1 Bakterielle Kolonisierung des Gastrointestinaltraktes von Neugeborenen | 4 |
| 1.3.2 Bedeutung der Muttermilch für die Mikrobiotaentwicklung und das Immunsystem. | 5 |
| 1.3.3 Mechanismen der postnatalen Immunsystemreifung | 7 |
| 1.4 Probiotika als Interventionsmöglichkeit nach Kaiserschnitt | 9 |
| 1.4.1 Überblick der klinischen Einsatzmöglichkeiten von Probiotika | 11 |
| 1.4.2 <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> | 12 |
| 1.5 Zielstellung | 13 |
| | |
| 2 PROBANDEN UND METHODEN | 14 |
| 2.1 Studienprobanden | 14 |
| 2.2 Randomisierung | 15 |
| 2.3 Studienprodukt | 15 |
| 2.4 Studienablauf | 16 |
| 2.4.1 Dosierung des Studienproduktes..... | 17 |
| 2.4.2 Dokumentation der Studiendaten | 19 |
| 2.4.3 Stuhlprobensammlung..... | 19 |
| 2.4.4 Erkrankungsinzidenzen und Begleitmedikationen..... | 20 |
| 2.5 Referenzprobanden..... | 21 |
| 2.6 Statistik..... | 22 |

| | | |
|----------|--|-----|
| 3 | ERGEBNISSE | 23 |
| 3.1 | Vergleich der basalen Gruppencharakteristika | 23 |
| 3.2 | Studienpopulation nach Drop-outs und Ausschlüssen | 26 |
| 3.2.1 | Subgruppenbildung der Stillgruppen..... | 27 |
| 3.2.2 | Subgruppenbildung der Formulagruppen | 27 |
| 3.2.3 | Referenzgruppe..... | 28 |
| 3.3 | Anthropometrische Daten | 28 |
| 3.3.1 | Körpergewicht | 29 |
| 3.3.2 | Körperlänge..... | 31 |
| 3.3.3 | Kopfumfang | 32 |
| 3.4 | Nahrungsmittelverträglichkeit..... | 32 |
| 3.4.1 | Stuhlfrequenz | 33 |
| 3.4.2 | Spuckfrequenz | 34 |
| 3.5 | Stuhlprobenanalyse | 34 |
| 3.5.1 | pH-Wert..... | 35 |
| 3.5.2 | Sekretorisches Immunglobulin A | 39 |
| 3.5.3 | Alpha-1-Antitrypsin | 42 |
| 3.5.4 | Calprotectin | 44 |
| 3.6 | Erkrankungsinzidenz | 46 |
| 3.6.1 | Zusammenfassung und Einteilung der aufgetretenen Erkrankungen..... | 46 |
| 3.6.2 | Erkrankungsinzidenzen der ersten vier Lebensmonate | 47 |
| 3.6.3 | Dauer der Atemwegserkrankungen und der behandelten Blähungen/Koliken | 48 |
| 3.7 | Korrelationsanalysen | 50 |
| 4 | DISKUSSION | 52 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 76 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS | 78 |
| | ANHANG | VII |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| Abb. 1.1: Beeinflussung der kindlichen Mikrobiotaentwicklung | 7 |
| Abb. 1.2: Stimulation des Immunsystems durch die intestinale Mikrobiota | 8 |
| Abb. 1.3: Zusammenfassung beschriebener Wirkungen von Probiotika im Darm des Menschen | 10 |
| Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Studienablaufes | 16 |
| Abb. 3.1: Gesamtdarstellung der Studienpopulation | 26 |
| Abb. 3.2: Gewichtsentwicklung der Studien- und Referenzgruppen in den ersten vier Lebensmonaten | 29 |
| Abb. 3.3: Durchschnittliche tägliche Gewichtszunahme der Studien- und Referenzgruppen in den ersten vier Lebensmonaten | 30 |
| Abb. 3.4: Entwicklung der Körperlängen der Studien- und Referenzgruppen in den ersten vier Lebensmonaten..... | 31 |
| Abb. 3.5: Entwicklung der Kopfumfänge der Studien- und Referenzgruppen in den ersten vier Lebensmonaten..... | 32 |
| Abb. 3.6: Stuhlproben-pH-Werte zu den Visiten 3 und 5..... | 36 |
| Abb. 3.7: Separierte Darstellung der zeitlichen pH-Wert-Verläufe der Probanden | 38 |
| Abb. 3.8: Konzentrationen an sekretorischem Immunglobulin A zu den Visiten 3 und 5 | 41 |
| Abb. 3.9: Alpha-1-Antitrypsin-Konzentrationen zu den Visiten 3 und 5 | 43 |
| Abb. 3.10: Calprotectinkonzentrationen zu den Visiten 3 und 5 | 45 |
| Abb. 3.11: Kumulative Inzidenz und durchschnittliche Erkrankungsdauer der Atemwegserkrankungen..... | 49 |
| Abb. 3.12: Kumulative Inzidenz und durchschnittliche Erkrankungsdauer der behandelten Blähungen und Koliken | 49 |
| Abb. 4.1: Schematische Darstellung von Interventionsstrategien zur Abschwächung der Effekte einer Entbindung per Kaiserschnitt..... | 74 |

TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| Tab. 1.1: Anzahl der Kaiserschnittentbindungen in deutschen Krankenhäusern von 1991-2017..... | 2 |
| Tab. 1.2: Vergleich der Kaiserschnittraten ausgewählter europäischer Länder im Jahr 2010 | 2 |
| Tab. 2.1: Übersicht der Ein- und Ausschlusskriterien..... | 14 |
| Tab. 2.2: Dosierung des Studienproduktes..... | 18 |
| Tab. 2.3: Baselinedaten der Probanden | 19 |
| Tab. 3.1: Charakterisierung der Intention-To-Treat-(ITT)-Gruppen hinsichtlich der Baseline-Daten | 24 |
| Tab. 3.2: Durchschnittliche Stuhlfrequenz pro Tag | 33 |
| Tab. 3.3: Durchschnittliche Spuckfrequenz pro Tag..... | 34 |
| Tab. 3.4: Gruppenstärken der auswertbaren Stuhlproben | 35 |
| Tab. 3.5: Ergebnisse der pH-Wert-Messung..... | 35 |
| Tab. 3.6: Ergebnisse der slgA-Messung..... | 39 |
| Tab. 3.7: Ergebnisse der α 1-AT-Messung | 42 |
| Tab. 3.8: Ergebnisse der Calprotectin-Messung | 44 |
| Tab. 3.9: Erkrankungsinzidenz der ersten vier Lebensmonate | 47 |
| Tab. 3.10: Korrelationskoeffizienten r der Stuhlprobenparameter an Visite 3..... | 50 |
| Tab. 3.11: Korrelationskoeffizienten r der Stuhlprobenparameter an Visite 5..... | 51 |
| Tab. 4.1: Schematischer Vergleich der Parameterveränderungen bezogen auf die Ergebnisse der Referenzgruppe nach vier Lebensmonaten | 70 |
| Tab. 4.2: Schematischer Vergleich der Parameterveränderungen zwischen den Formulagruppen nach vier Lebensmonaten | 72 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|------------------|--|
| % | Prozent |
| °C | Grad Celsius |
| Ø | Durchschnitt |
| α1-AT | Alpha-1-Antitrypsin |
| µg | Mikrogramm |
| Abb. | Abbildung |
| AE | Adverse Event (unerwünschtes Ereignis) |
| <i>B. lactis</i> | <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> |
| BF | Breast-Fed (gestillt) |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| cfu | colony forming units (koloniebildende Einheiten) |
| cm | Zentimeter |
| d | days (Tage) |
| d.h. | das heißt |
| dl | Deziliter |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EL | Entlassung |
| ELISA | enzyme linked immunosorbent assay |
| <i>et al.</i> | und andere |
| etc. | et cetera (und die übrigen) |
| FF | Formula-Fed (formulaernährt) |
| g | Gramm |
| GOS/FOS | Galacto-/Fructooligosaccharide |
| h | Stunde |
| HA | hypoallergen |
| HMO | Humane Milcholigosaccharide |
| i.v. | intravenös |
| ITT | Intention-To-Treat |
| kg | Kilogramm |
| KS | Kaiserschnitt |
| l | Liter |
| LGG | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG |
| M | Mean (Mittelwert) |
| MF | Mix-Fed (zweimilchernährt) |

| | |
|------------------------|---|
| mg | Milligramm |
| ml | Milliliter |
| n | Probandenanzahl |
| n.s. | nicht signifikant |
| NEC | Nekrotisierende Enterokolitis |
| nm | Nanometer |
| OR | Odds Ratio (Relatives Risiko) |
| p-Wert | Signifikanzwert |
| Pla | Placebo |
| PP | Per Protocol |
| Pro | Probiotik |
| PUFA | Polyunsaturated fatty acids (mehrfachungesättigte Fettsäuren) |
| r | Korrelationskoeffizient |
| REF | Referenz |
| RSV | Respiratorisches-Synzytial-Virus |
| <i>S. thermophilus</i> | <i>Streptococcus thermophilus</i> |
| SD | Standard Deviation (Standardabweichung) |
| slgA | sekretorisches Immunglobulin A |
| Sign. | Signifikanz |
| SSW, vSSW | Schwangerschaftswoche, vollendete Schwangerschaftswoche |
| Tab. | Tabelle |
| U | Untersuchung |
| usw. | und so weiter |
| V | Visite |
| vgl. | vergleiche |
| vs. | versus |
| WHO | World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation) |
| z.B. | zum Beispiel |

1 EINLEITUNG

Als mittlerweile fünfthäufigster operativer Eingriff in Deutschland [1] stellt der Kaiserschnitt eine Standardprozedur dar, die viele Kinder das Licht der Welt erblicken lässt. Dennoch zeigt sich aufgrund der geschichtlichen und medizinischen Entwicklung dieser Entbindungstechnik eine Verschiebung von Nutzen und Risiko, die im Folgenden auch hinsichtlich der kurz- und langfristigen gesundheitlichen Auswirkungen auf die Säuglinge näher erläutert werden soll. Anschließend wird das Probiotikum *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* hinsichtlich der gastrointestinalen und klinischen Bedeutungen und Funktionen diskutiert, sowie die Zielstellung der vorliegenden Dissertation erläutert.

1.1 Der Kaiserschnitt im Wandel der Zeit

Der Ursprung des Begriffs „Kaiserschnitt“ ist bis heute unklar, die Ableitung vom römischen Kaiser Julius Caesar, der der Legende nach selbst per Schnittentbindung zur Welt gekommen sein soll, gilt als unwahrscheinlich. Der Wortherkunft nach geht der Kaiserschnitt möglicherweise aus dem Lateinischen *Caesura*, auf Deutsch „Einschnitt“, hervor, sodass im Laufe der Geschichte über mittellateinisch *Sectio Cesaria* wurde, der Kaiserschnitt, wie es im Englischen heute noch heißt („Cesarean Section“).

Den ersten Kaiserschnitt, den Mutter und Kind überlebten, soll der Schweinekastrator Jacob Nufer um das Jahr 1500 durchgeführt haben, nachdem seine Frau tagelang in den Wehen lag und sich kein Geburtsfortschritt abzeichnete. In letzter Verzweiflung, mit dem Grundwissen der Schnitttechnik und Wundversorgung seines Berufes und dem Segen des Prälaten führte er den Kaiserschnitt aus, bei dem Mutter und Kind überlebten. In den folgenden Jahren brachte seine Frau noch sechs weitere Kinder auf natürlichem Weg zur Welt, darunter sogar Zwillinge [2]. Der erste in Deutschland erfolgreich durchgeführte Kaiserschnitt erfolgte 1610 durch Jeremias Trautmann in Wittenberg [3].

War der Kaiserschnitt in der Geschichte eher eine sehr seltene Ausnahme, so nimmt die operative Entbindungstechnik heutzutage seit Jahrzehnten weltweit stark zu und liegt mittlerweile in vielen Ländern deutlich über den von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als adäquat eingeschätzten 10-15 % [4]. Dabei sind deutliche länder- und regionsspezifische Unterschiede von rund 4 % Kaiserschnitttrate in Zentral- und Westafrika verglichen mit einer zehnfach höheren Kaiserschnitttrate in Lateinamerika (44 %) zu beobachten [5]. Die Gründe für den weltweiten Anstieg von Sektio Geburten werden kontrovers diskutiert, im Allgemeinen werden dabei sowohl die steigende Zunahme an Krankenhausgeburten als auch die steigenden Kaiserschnitttraten innerhalb der Krankenhäuser angeführt [5]. Interessanterweise

konnte im Jahr 2015 keinerlei Reduktion von mütterlicher oder kindlicher Sterblichkeit bei Kaiserschnittraten von über 10 % festgestellt werden [6].

Auch in Deutschland sind die Entbindungen per Sektio deutlich angestiegen und haben sich in den letzten 25 Jahren verdoppelt. Lag der Anteil der Krankenhausgeburten 1991 mit 15,3 % Kaiserschnitten noch knapp im Rahmen der WHO-Empfehlung, sind diese innerhalb von zwei Jahrzehnten auf über 32 % gestiegen (vgl. Tab. 1.1) [7].

Tab. 1.1: Anzahl der Kaiserschnittentbindungen in deutschen Krankenhäusern von 1991-2017

| Jahr | Entbundene Frauen in deutschen Krankenhäusern | | |
|------|---|---------------------|-------------|
| | Anzahl | Anzahl Entbindungen | Anteil in % |
| | Insgesamt | durch Kaiserschnitt | |
| 1991 | 822 842 | 126 297 | 15,3 |
| 2001 | 715 136 | 161 548 | 22,6 |
| 2011 | 642 791 | 206 791 | 32,2 |
| 2017 | 762 343 | 232 505 | 30,5 |

Erst in den letzten sechs Jahren ist ein leichter Rückgang dieser Entwicklung zu beobachten. Im europäischen Vergleich liegt Deutschland oberhalb des Durchschnitts von rund 25 %, hingegen weisen die Niederlande und die skandinavischen Länder deutlich geringere Sektioraten auf [8]:

Tab. 1.2: Vergleich der Kaiserschnittraten ausgewählter europäischer Länder im Jahr 2010

| Land | Kaiserschnittrate in % |
|-------------|------------------------|
| Finnland | 16,8 |
| Niederlande | 17,0 |
| Norwegen | 17,1 |
| Schweden | 17,1 |
| Dänemark | 22,1 |
| England | 24,6 |
| Österreich | 28,8 |
| Deutschland | 31,3 |
| Schweiz | 33,1 |
| Polen | 34,0 |
| Italien | 38,0 |

Die Gründe für die teilweise hohen Kaiserschnittraten werden unter medizinischem Fachpersonal kontrovers diskutiert. Als Faktoren werden unter anderem das veränderte Risikoprofil bei steigendem maternalen Alter zum Zeitpunkt der Entbindung, wie auch ökonomische Faktoren (höhere Fallpauschale bei geringerem Zeitaufwand in den Kliniken) oder die Wahrnehmung des Kaiserschnittes als sichere, planbare und schmerzarme Entbindungsvariante vermutet [4, 9].

1.2 Gesundheitliche Folgen des Kaiserschnittes für Mutter und Kind

Trotz des in Notsituationen absolut indizierten Vorgehens zum Schutz des Lebens von Mutter und Kind sollte der Kaiserschnitt als operativer Eingriff aufgrund der kurz- und langfristigen Risiken nur in diesen lebensrettenden Umständen erfolgen und nicht als gleichwertige Alternative zur Spontangeburt bewertet werden [4, 10]. Dabei werden als absolute Indikationen für die Geburt per Kaiserschnitt unter anderem Lageanomalien des Kindes (Querlage), lebensbedrohliche Schwangerschaftsgestosen (z.B. Präeklampsie, HELLP-Syndrom), fetale Asphyxien (Sauerstoffmangelversorgung des Kindes), eine Uterusruptur oder eine Überlagerung des Muttermundes durch Plazentagewebe (Plazenta praevia) beschrieben [11].

Das Risiko für unerwünschte neonatologische Ereignisse, wie der respiratorischen Anpassungsstörung, und für die gesamte kindliche Morbidität steigt vor allem bei geplanten Kaiserschnitten [12]. Dabei erhöht sich das relative Risiko signifikant mit einem geringeren Gestationsalter (OR: 2,1 bei 37 SSW, OR: 1,5 bei 38 SSW vs. 39 SSW ($p < 0,001$)), sodass eine geplante Sektio aufgrund der damit verbundenen Risikoerhöhung nicht vor 39 vollendeten Schwangerschaftswochen stattfinden sollte [13].

Des Weiteren konnten in mehreren Studien langfristige negative Auswirkungen der kindlichen Gesundheit nach Kaiserschnittgeburt belegt werden. So steigt das Risiko für Asthma und Diabetes Typ 1 um jeweils 20 % [14, 15]. Außerdem erkrankten Kaiserschnittkinder häufiger an Gastroenteritis [16] und Diarrhoe [17] und zeigen ein erhöhtes relatives Risiko für die Entwicklung von allergischer Rhinitis [18], Zöliakie [19], Adipositas [20] und Lebensmittelallergien, vor allem bei familiärer Prädisposition [21].

Auch die mütterliche Morbidität ist aufgrund von möglichen Komplikationen, wie beispielsweise erhöhter Blutverlust, postnatale Infektionen, Organverletzungen und dem Risiko einer Uterusruptur bei einer Folgeschwangerschaft, erhöht [22, 23]. Dabei zeigte sich eine höhere Morbidität bei den sogenannten Notkaiserschnitten im Vergleich zu den geplanten Schnittentbindungen [24]. Eine aktuelle Metaanalyse ergab einerseits zwar ein reduziertes Risiko für Harninkontinenz nach einem Kaiserschnitt verglichen mit einer Vaginalgeburt, jedoch steigt auch das Risiko für eine Fehl- oder Totgeburt bei einer Folgeschwangerschaft

sowie für Plazentaprobleme, wie beispielsweise der pathologischen Verwachsung dieser mit der Gebärmuttermuskulatur oder der Plazenta praevia [25].

Letztlich ist auch die emotionale Mutter-Kind-Bindung durch das fehlende natürliche Geburtserlebnis signifikant verändert, sodass vor allem Mütter mit ungeplanten Kaiserschnitten häufiger Emotionen wie Trauer und Enttäuschung empfinden [26].

1.3 Konsequenzen für die neonatale Gastrointestinalbesiedlung und das Immunsystem

Der Darm des Menschen ist mit einer Vielzahl von Bakterien besiedelt, die im erwachsenen Gastrointestinaltrakt in der größten Anzahl im Kolon vorkommen und dabei Gesamtzahlen von bis zu 10^{12} koloniebildende Einheiten pro Gramm Fäzes erreichen [27]. Hauptvertreter sind dabei unter anderem die Gattungen *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* und *Clostridium* [27].

Diese Mikroorganismen im menschlichen Darmsystem besitzen viele verschiedene Funktionen, darunter die Fermentierung von unverdauten Nahrungsbestandteilen zur Energiegewinnung, die Verhinderung der Ansiedelung und des Wachstums von potentiellen Pathogenen, das Training des Immunsystems, die Produktion von Vitaminen und sie tragen zur sogenannten „oralen Toleranz“ bei [28, 29]. Letztere bezeichnet dabei die geringere Sensitivität gegenüber Antigenen, die den Verdauungstrakt passieren und somit Überreaktionen des Immunsystems vermeiden oder abschwächen [30].

Die Etablierung einer physiologischen Mikrobiota nach der Geburt trägt zu einer starken Stimulation der Reifung des sogenannten darmassoziierten lymphatischen Gewebes und der mukosalen Immunität bei [31]. Die Bedeutung dieser Interaktion von Darmbakterien und Darmgewebe wird aufgrund der Tatsache verdeutlicht, dass rund 80 % der gesamten immunologisch aktiven Zellen des menschlichen Körpers dort lokalisiert sind [32].

1.3.1 Bakterielle Kolonisierung des Gastrointestinaltraktes von Neugeborenen

Eine mögliche Ursache der unter 1.2 genannten immunologischen Erkrankungen von per Sektio geborenen Kindern ist die verzögerte mikrobielle Besiedlung des Gastrointestinaltraktes postnatal, da dies ein kritischer Zeitpunkt für die optimale Entwicklung und Reifung des Darm- und Immunsystems ist [33–36]. Während bei einer vaginalen Geburt die Bakterien aus dem mütterlichen Geburtskanal und der Rektalflora unwillkürlich vom Kind geschluckt werden, fehlt diese „Startkultur“ bei per Kaiserschnitt geborenen Kindern [37–39].

Trotz der ursprünglich allgemein angenommenen Sterilität des Fetus im Mutterleib, konnten mittlerweile in neueren Forschungen eine mikrobielle Besiedlung der Plazenta, des

Fruchtwassers und des Mekoniums nachgewiesen werden, sodass von einer mikrobiellen Erstbesiedlung bereits intrauterin ausgegangen werden kann [40–43]. Dennoch stellt der Entbindungsmodus einen der wichtigsten Faktoren für die Entwicklung der kindlichen Darmmikrobiota dar, da bei einer Spontangeburt die Darmbesiedlung zuerst von fakultativ anaeroben Bakterien, wie *Escherichia*, Enterokokken und Streptokokken erfolgt, die in den ersten Tagen den Sauerstoff verbrauchen und durch diese Milieuveränderung die Etablierung von anaeroben Bakterien, welche bei vaginal geborenen, voll gestillten Kindern hauptsächlich Bifidobakterien sind, begünstigen [44–46]. In mehreren Studien der letzten Jahre konnte so gezeigt werden, dass die deutlichsten Unterschiede von per Kaiserschnitt Geborenen in der geringeren Besiedlung von Bifidobakterien und *Bacteroides* und einem höheren Vorkommen von *E. coli*-Bakterien und von potentiellen Pathogenen (*Clostridium difficile*) begründet liegen sowie die Gesamtbakterienzahl deutlich verringert ist [39, 45, 47–49].

Weitere wichtige Faktoren der Mikrobiotabeeinflussung in den ersten Lebenswochen stellen unter anderem das Gestationsalter bei Entbindung, die Art der Ernährung (gestillt vs. formulaernährt), die maternale Antibiotikaeinnahme und familiäre Lebenssituationen (Vorhandensein von Geschwisterkindern, ländlicher oder städtischer Wohnort, Haustierkontakt, Ernährung usw.) dar [38, 42, 50–52]. Außerdem besteht auch ein Unterschied in der mikrobiellen Besiedlung von Kindern, die durch einen geplanten Kaiserschnitt zur Welt kamen. Da bei diesem im Vergleich zu einem Notkaiserschnitt definitiv keine vorzeitige Eröffnung der Fruchtblase und somit kein Kontakt zur Mikroflora des Geburtskanals stattfand, ergaben sich geringere Gesamtbakterienanzahlen für diese Kinder [52, 53].

1.3.2 Bedeutung der Muttermilch für die Mikrobiotaentwicklung und das Immunsystem

Ein weiterer Nachteil der Sektioentbindung ist die verzögerte Laktation und damit die spätere bzw. verringerte Versorgung des Neugeborenen mit Muttermilch auch aufgrund von Zugabe von Formulamilch in den ersten vier Lebenstagen [54]. So konnte in einer Metaanalyse gezeigt werden, dass es eine negative Assoziation zwischen der Kaiserschnittentbindung und dem frühen Stillstart nach der Geburt gibt. Nach einem gelungenen Stillstart hat der Geburtsmodus jedoch keinen Einfluss auf die Anzahl von gestillten Kindern nach sechs Monaten [55].

Muttermilch ist einzigartig und zeichnet sich neben dem für Säuglinge optimal zusammengesetzten Mineral- und Nährstoffgehalt durch das Vorkommen von immunologisch wirksamen Substanzen, wie beispielsweise Immunglobuline, Lysozym, ungesättigte langkettige Fettsäuren und Enzyme, aus [56]. Zusätzlich stellt Muttermilch eine Quelle von Bifidobakterien und weiteren Mikroorganismen dar, die zusammen mit den ebenfalls enthaltenen humanen Milcholigosacchariden (HMO) als einzigartiges Substrat für die Bifidoflora [57] in

synergistischem Effekt die intestinale Barrierefunktion erhöhen und zu den positiven Wirkungen der Bifidobakterien beitragen [58, 59]. Dabei bilden die HMO mit rund 10-20 g/l neben Laktose und Fett den drittgrößten Bestandteil der Muttermilch und sind aufgrund der hohen Konzentrationen und der strukturellen Komplexität einzigartig in menschlicher Milch [60]. Als präbiotischer Nahrungsbestandteil für die Bifidobakterien besitzen HMO eine große Bedeutung, da sie nutritiv dem Säugling nicht zur Verfügung stehen und unverdaut in den Dickdarm gelangen [61]. Dort werden diese Oligosaccharide selektiv als Substrat für das Bifidobakterienwachstum verwendet, was auf eine Koevolution von Mensch und dieser Bakterienspezies hinweist [62]. Darüber hinaus konnte in menschlichen Koloncarcinomzellen *in vivo* 2012 gezeigt werden, dass Bifidobakterien, die auf humanen Milcholigosacchariden gewachsen waren, höhere Adhäsionsraten sowie eine höhere Expression von Zellmembranglycoproteinen, Adhäsionsmolekülen und antiinflammatorischen Zytokinen zeigten [63]. Diese Mechanismen verdeutlichen die einzigartige und spezielle Beziehung zwischen HMO-gewachsenen Bifidobakterien und den intestinalen Epithelzellen, vor allem in der daraus resultierenden Senkung der Darmpermeabilität durch die Verstärkung der interzellularen Adhäsion.

Zusätzlich findet beim Stillen ein Austausch von Mikroorganismen zwischen der mütterlichen Hautoberfläche und dem Säugling statt, was zu einer zusätzlichen Exposition von Bakterien in der unmittelbaren Umgebung des Kindes führt [46].

Im Vergleich zu formulaernährten weisen gestillte Säuglinge ein geringes Infektionsrisiko für Magen-Darm-Erkrankungen und Infektionen der Atemwege auf [64]. Ebenfalls konnte eine Risikoreduktion in der Entwicklung von Asthma und allergischen Ekzemen in den ersten vier Lebensjahren beobachtet werden, wenn Kinder in den ersten drei bis vier Lebensmonaten mit Muttermilch ernährt wurden [65, 66]. Der Einfluss auf die Darmbarrierefunktion, die bei gestillten Säuglingen in den ersten Lebenstagen physiologisch abnimmt, ist bei formulaernährten Kindern verändert, sodass die intestinale Permeabilitätsverringering verzögert stattfindet [67]. Die Arbeitsgruppe um Penders konnte im Jahr 2005 außerdem zeigen, dass nicht gestillte Kinder eine signifikant höhere Prävalenz von potentiellen Pathogenen wie dem *Chlostridium difficile* aufweisen [68].

Zusammenfassend lässt sich in Abbildung 1.1 darstellen, dass hauptsächlich sowohl der physiologisch veränderte Start der Gastrointestinalbesiedlung durch eine Geburt per Kaiserschnitt als auch die verzögerte oder fehlende Muttermilchernährung als Hauptnahrungsquelle für die Mikrobiota die kurz- und langfristigen immunologischen und gastrointestinalen Konsequenzen von kaiserschnittgeborenen Kindern begünstigen [29, 69–71].

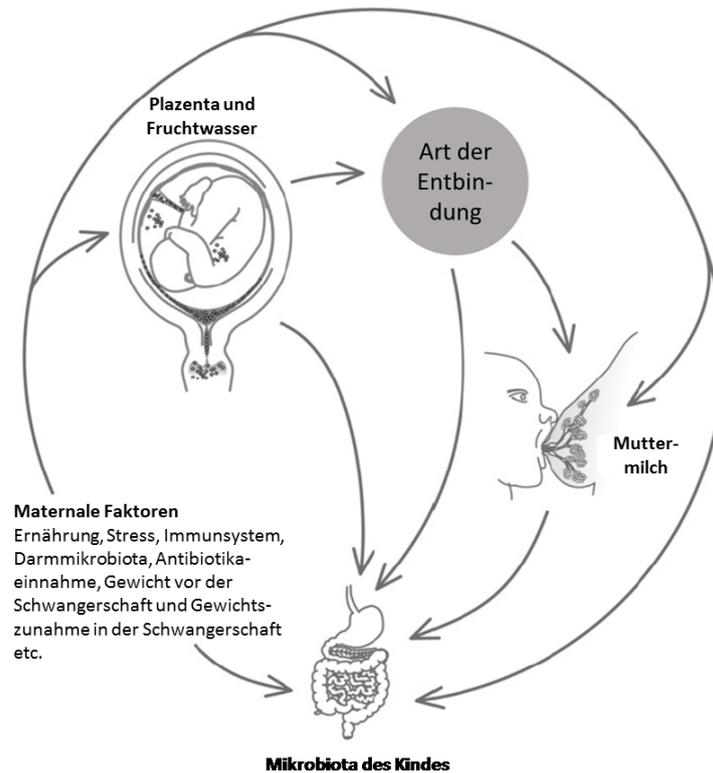


Abb. 1.1: Beeinflussung der kindlichen Mikrobiotaentwicklung (modifiziert nach [71])

Faktoren wie der Gewichts-, Ernährungs- und Immunsystemstatus der Mutter während der Schwangerschaft beeinflussen den ersten bakteriellen Kontakt des Kindes im Mutterleib. Ebenso bestimmen die Art der Entbindung und auch die Laktation maßgeblich die Entwicklung der intestinalen Mikrobiotazusammensetzung und damit den Gesundheitszustand des Kindes.

1.3.3 Mechanismen der postnatalen Immunsystemreifung

In einem 2013 erschienenen Review von Di Mauro *et al.* wurden die biologischen Zusammenhänge der frühen Darmbesiedlung mit dem Immunsystem zusammengefasst [72]. Dabei sind diese abhängig von der Interaktion zwischen dem Darmlumeninhalt, des intestinalen Epithels und den dendritischen Zellen des darmassoziierten lymphatischen Gewebes (vgl. Abb. 1.2):

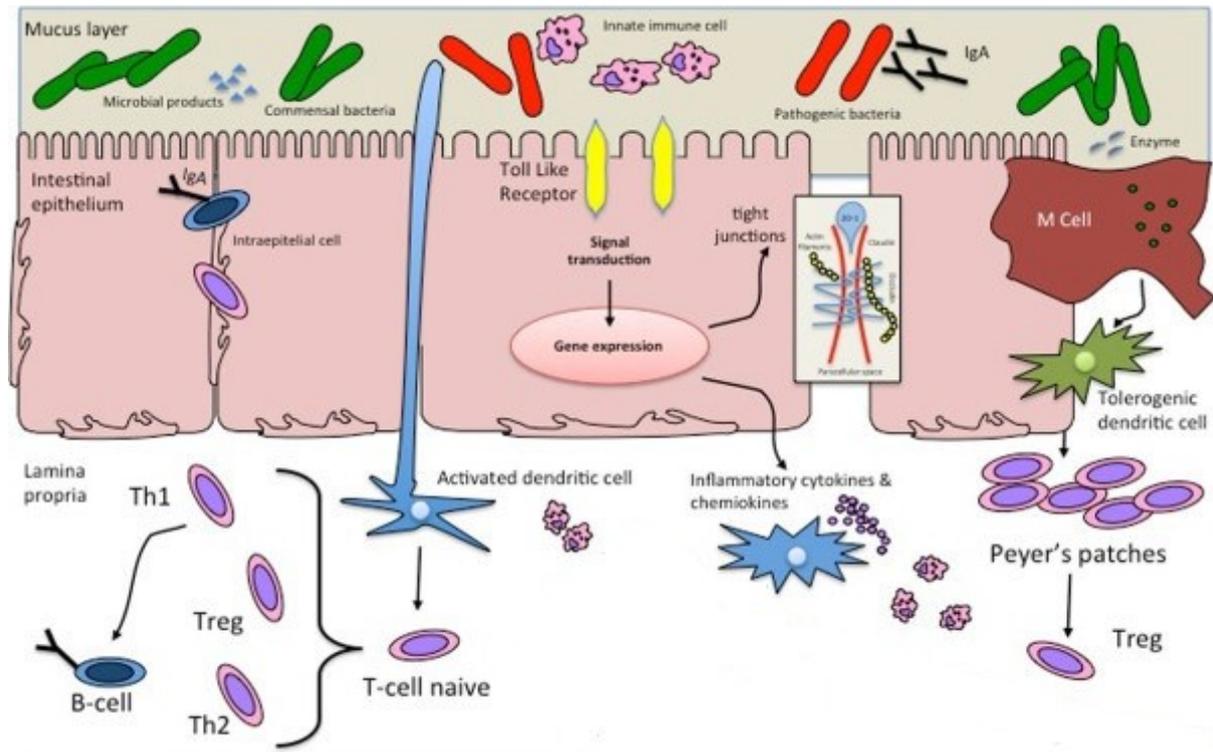


Abb. 1.2: Stimulation des Immunsystems durch die intestinale Mikrobiota (modifiziert nach [72])

Kommensale Bakterien des menschlichen Darmsystems aktivieren direkt und indirekt das Immunsystem über das darmassoziierte lymphatische Gewebe. Hauptmechanismen sind dabei die Aufnahme von Antigenen über die M-Zellen und die Ausläufer der dendritischen Zellen zur Antigenpräsentation in lymphatische Zellbereiche der Lamina propria. Daraufhin wird die T-Zellantwort sowie die B-Zell-Differenzierung induziert.

Das Darmlumen bzw. die Mukusschicht ist durch eine Epithelschicht von der Lamina propria getrennt. Spezialisierte M-Zellen, die über dem lymphatischen Gewebe (Peyer's Patch) lokalisiert sind, sind in der Lage, mikrobielle und Lebensmittelantigene aus dem Lumen durch das Epithel in die Lamina propria zu transportieren. Zusätzlich präsentieren die dendritischen Zellen die Antigene durch Aufnahme ihrer Ausläufer den naiven T-Zellen, die eine intestinale Immunantwort vermitteln [72]. Kommensale Bakterien, wie beispielsweise Bifidobakterien, können dabei die Differenzierung von B-Zellen in Immunglobulin A-produzierende Plasmazellen fördern, indem die M-Zellen die aufgenommenen Bakterien zu den B-Zellen in den Peyer-Plaques transportieren oder die dendritischen Zellen diese direkt ins Lumen transportieren [73].

Die T-Zell-Antwort verläuft hinsichtlich der Zytokinproduktion entweder auf zellvermittelter (Th1) oder humoraler (Th2) Ebene, beide Prozesse sind im gesunden System streng reguliert [72]. Da das unreife Immunsystem von Neugeborenen eine Th2-Verschiebung zeigt, begünstigt eine physiologische postnatale Darmbesiedlung mit vor allem Bifidobakterien eine Verlagerung zur Th1-Antwort, was in einer Balance dieser Systeme resultiert. Somit

verhindern Bifidobakterien eine T-Zell-Imbalance, die klinisch zu Erkrankungen bzw. überschießenden Immunreaktionen führen kann [74].

Bereits 1997 konnte durch Sudo *et al.* gezeigt werden, dass die Entwicklung der oralen Toleranz als wichtiger Schritt in der Reifung des Immunsystems abhängig von einer Besiedlung mit Bifidobakterien ist. Dabei konnte die immunologische Th2-Verschiebung in keimfreien Mäusen nach der Geburt durch die Besiedlung mit dem *Bifidobacterium infantis* ausbalanciert werden und eine orale Toleranz wiederhergestellt werden, jedoch ausschließlich in der Neonatalphase [75]. Jakobsson *et al.* konnten 2014 weiterhin zeigen, dass per Kaiserschnitt geborene Kinder eine geringere Bakteriendiversität sowie eine reduzierte Th1-Zellantwort in den ersten zwei Lebensjahren besaßen, sodass die Autoren schlussfolgerten, dass die frühen postnatalen Änderungen der Darmmikrobiota die spätere immunologische Sensitivität beeinflussen [36]. So besitzen prädispositionierte Kaiserschnittkinder ein deutlich höheres Risiko für die Entstehung von Nahrungsmittelallergien [21].

Die Entwicklung bzw. Aufrechterhaltung der oralen Toleranz durch das darmassoziierte lymphatische Gewebe im Zusammenspiel mit nützlichen natürlichen und probiotischen Bakterien sowie die Senkung der intestinalen Permeabilität durch balancierte inflammatorische Reaktionen sind demzufolge bedeutend in der postnatalen Immunsystemreifung und der Verhinderung von Nahrungsmittelallergien [30].

1.4 Probiotika als Interventionsmöglichkeit nach Kaiserschnitt

Eine Möglichkeit zur Intervention bei gastrointestinaler Dysbalance ist der Einsatz von Probiotika [70]. Definitionsgemäß sind Probiotika, abgeleitet aus dem lateinischen Wort „*pro*“ („für“) und dem griechischen Wort „*bios*“ („das Leben“), laut WHO „lebende Mikroorganismen, die in adäquat eingenommenen Mengen zu einer positiven Wirkung auf die Gesundheit des Wirtes beitragen“ [76]. Zu den am häufigsten untersuchten und als sicher eingestuften Probiotika zählen Bifidobakterien und Laktobazillen [77, 78]. Dabei sind die Wirkungen der einzelnen Bakterienstränge unterschiedlich und die individuellen Eigenschaften sollten vor dem Einsatz in klinischen Studien evaluiert werden [46]. Außerdem sollten Probiotika kontinuierlich zugeführt werden, da die Adhäsion an die Mukosazellen von endogen zugeführten Bakterien im menschlichen Darm fraglich ist [79].

Die wichtigsten Funktionen von Probiotika sind zusammenfassend schematisch in Abbildung 1.3 dargestellt:

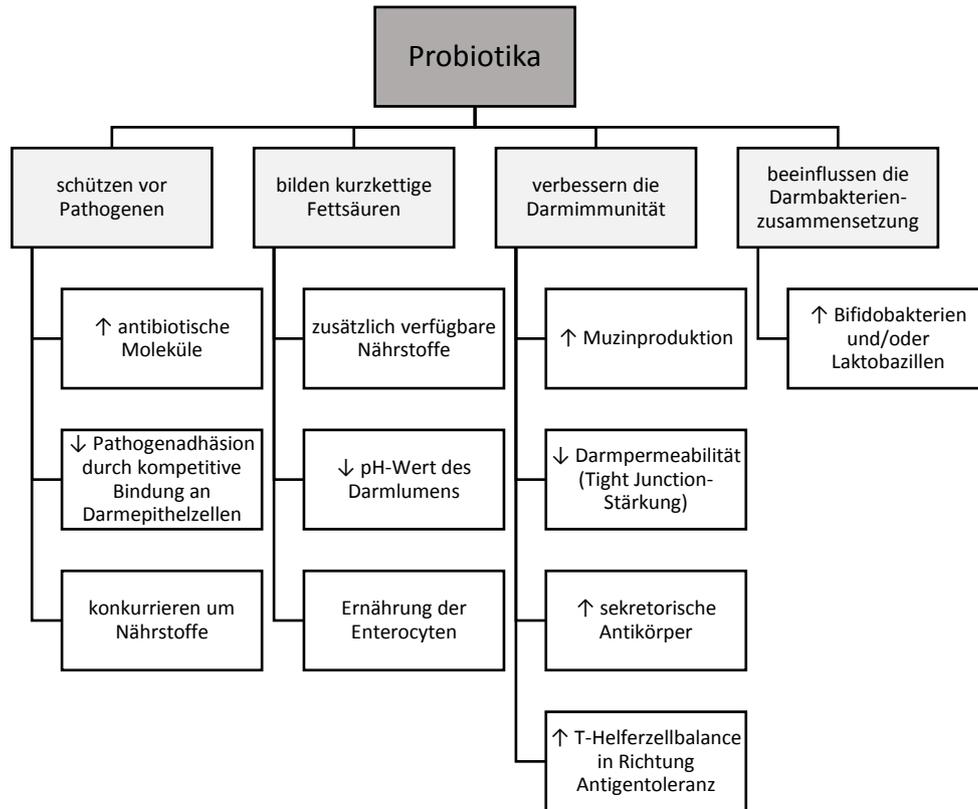


Abb. 1.3: Zusammenfassung beschriebener Wirkungen von Probiotika im Darm des Menschen (modifiziert nach [80, 81])

Dargestellt sind die Hauptfunktionsweisen, wie Probiotika im Gastrointestinaltrakt des Menschen wirken können. Neben der direkten Beeinflussung der Bakterienzusammensetzung durch Erhöhung der Anzahl von Bifidobakterien und/oder Laktobazillen und der Bildung von Fermentationsprodukten zur Energielieferung und Ansäuerung des Darmmilieus konnten indirekte Schutzmechanismen vor Pathogenen und die Verbesserung der Immunität des Darmsystems beschrieben werden.

Probiotika stärken somit auf der einen Seite die Mikrobiota und das Immunsystem des Wirtes und schützen andererseits gleichzeitig durch verschiedene Mechanismen und der kompetitiven Hemmung um Substrate und Bindungsstellen vor krankheitserregenden Bakterien (vgl. Abb. 1.3). Dies unterstreicht die Bedeutung von Probiotika in der möglichen Behandlung von gastrointestinalen Besiedlungsverzögerungen und darm- oder immunoassoziierten Erkrankungen.

1.4.1 Überblick der klinischen Einsatzmöglichkeiten von Probiotika

Die in Abbildung 1.3 dargestellten Mechanismen von Probiotika im menschlichen Organismus deuten auf die vielen klinischen Einsatzmöglichkeiten hin.

Die Wirkung von Probiotika in der Prävention bzw. der Behandlung von allergischen Erkrankungen bei Kindern wurde 2009 in einer großen Metaanalyse analysiert [82]. Dabei konnte gezeigt werden, dass in den meisten Studien positive Effekte des Probiotikaeinsatzes in der Behandlung von atopischen Ekzemen, vor allem bei Patienten mit Lebensmittelallergie, erzielt wurden. Ein Langzeiteffekt hinsichtlich der Reduktion von atopischen Ekzemen bei über 900 fünfjährigen Kindern konnte dabei unter den per Kaiserschnitt geborenen festgestellt werden, jedoch nicht in der Gesamtkohorte. Einige Studien zeigten keinen Effekt der Ekzemp- prävention, allerdings wurden keinerlei unerwünschte Ereignisse beobachtet. Da in den Untersuchungen unterschiedliche probiotische Stämme und Interventionsstrategien eingesetzt wurden, ist die Aussagekraft und Vergleichbarkeit allerdings reduziert zu bewerten [82].

Probiotika zeigen weiterhin eine deutliche Evidenz in der Behandlung von Durchfall- erkrankungen [78], vor allem in der Reduzierung des Risikos von *Chlostridium difficile*- assoziierten Durchfällen (60 % Reduktion im Vergleich zur Placebogruppe) [83].

Des Weiteren konnte in einer Studie mit Bifidobakterien und Laktobazillen gezeigt werden, dass diese die Inzidenz von Todesfällen und der nekrotisierenden Enterokolitis (NEC), eine schwere Darmentzündung, die vor allem frühgeborene Säuglinge betrifft, signifikant reduzierten [84]. Dies konnte auch in einer großen Metaanalyse mit insgesamt über 2000 Frühgeborenen, die ein sehr niedriges Geburtsgewicht hatten, bestätigt werden, da im Gesamteffekt eine Reduktion der NEC-Fälle um 30 % durch die Gabe von Probiotika erzielt werden konnte [85].

Außerdem konnten akute Infektionen und das Risiko von wiederkehrenden respiratorischen Infekten im ersten Lebensjahr in formulaernährten Kindern durch den Einsatz von probiotischen Bifidobakterien und Laktobazillen reduziert werden [86].

Auf laborparametrischer Ebene bewirken Probiotika eine Senkung des intestinalen pH-Wertes und eine Erhöhung der Gesamtanzahl von Bifidobakterien und Laktobazillen in den Fäzes [79] sowie eine positive Beeinflussung der Darmimmunität durch Erhöhung der Anzahl von Immunglobulin-sezernierenden Zellen [87].

Die Ergebnisse zeigen, dass Probiotika ein großes therapeutisches Potential in der Modulation der gastrointestinalen Mikrobiota und der Entzündungsaktivität bzw. der Immunantwort besitzen. Dennoch sind mehr Studien nötig, um eine größere klinische Evidenz zu erreichen

und adäquate Empfehlungen auszusprechen. Zu lösende Probleme sind dabei vor allem die Auswahl an probiotischen Stämmen, die Individualität der Wirkungsbereiche, die Unterschiede in synergistischen vs. individuellen Effekten von Bakterienstämmen und die Definierung der Wirtscharakteristika in den Studiengruppen (klinische Bedingungen, Startbedingungen der Darmmikrobiota, Ernährungsform, Umweltfaktoren etc.) [71].

1.4.2 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*

Eins der bis heute am besten untersuchten probiotischen Bakterien ist das *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (kurz *B. lactis*), welches in über 370 wissenschaftlichen Publikationen beschrieben wurde, wovon mehr als 180 klinische Studien sind (Stand Februar 2016) [88].

B. lactis ist ein gram-positives, unbewegliches, anaerobes Bakterium, welches seit 1983 in der Zellkulturbank der Firma Chr. Hansen, Dänemark, gelagert ist [89]. Technologisch ist es aufgrund der guten Stabilität, der hohen Sauerstofftoleranz, der Säuren- und Gallensalzstabilität und der Fermentationsaktivität als probiotisches Nahrungsergänzungsmittel geeignet [89]. Das Genom wurde 2004 vollständig entschlüsselt und im Jahre 2010 publiziert [90].

B. lactis besitzt eine gute Adhäsionsfähigkeit *in vitro* an humanen fäkalen Mukuszellen [91], überlebt die gesamte Magen-Darm-Passage [92] und lässt sich dosisabhängig in den Fäzes nachweisen [93]. Dies entspricht einer optimalen Voraussetzung für die Funktionsfähigkeit als Probiotikum.

Hinsichtlich der klinischen Relevanz konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Supplementation von Säuglingsformulanahrung mit *B. lactis* zusammen mit *Streptococcus thermophilus* von den Probanden gut toleriert wurde, sicher war, zu einem normalen Wachstum und zu einer geringeren Inzidenz von Koliken und dem Gebrauch von Antibiotika führte [94]. Außerdem kann *B. lactis* allein [95] oder in Kombination mit *Lactobacillus rhamnosus* GG [86] zu einer deutlichen Reduktion von respiratorischen Infekten im Kindesalter führen, sowie die Symptomatik von atopischen Ekzemen signifikant verbessern [96].

Bezüglich der Immunmarker im Stuhl lassen sich für die Supplementation von *B. lactis* in mehreren klinischen Studien zeigen, dass das sekretorische Immunglobulin A im Vergleich zur Placebosupplementation erhöht ist [97–100]. In der Studie von Mohan *et al.* aus dem Jahr 2008 konnte darüber hinaus analysiert werden, dass die Supplementation von *B. lactis* bei Frühgeborenen zu einer Absenkung des fäkalen pH-Wertes und einer Erhöhung der kurzkettigen Fettsäuren führte und auch die Konzentration von Calprotectin, einem fäkalen Entzündungsmarker, im Vergleich zur Placebointervention sank [99].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Bakterium *B. lactis* hinsichtlich seiner technofunktionellen, gesundheitsfördernden und immunverbessernden Eigenschaften ein

sicheres Probiotikum darstellt. Vor allem aufgrund der Tatsache, dass die Darmbesiedlung mit nützlichen Bifidobakterien von kaiserschnittgeborenen Kindern wie unter Abschnitt 1.3.1 beschrieben verzögert ist, stellt die prophylaktische Gabe von *B. lactis* eine vielversprechende Möglichkeit dar, die damit verbunden gastrointestinalen und immunologischen Folgen zu reduzieren.

1.5 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss des probiotischen Bakteriums *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* auf gesunde, reifgeborene Kaiserschnittkinder unter Berücksichtigung der Ernährungsweise (gestillt oder formulaernährt) zu analysieren. Dabei werden Daten einer Subgruppe einer klinischen Studie ausgewertet. Die jeweiligen Ernährungsgruppen sollen hinsichtlich der Entwicklung anthropometrischer Parameter, der Nahrungsverträglichkeit anhand von Stuhl- und Spuckfrequenz, der fäkalen Immun- und Entzündungsmarker zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten und der Erkrankungsinzidenz in den ersten vier Lebensmonaten in Abhängigkeit von einer *B. lactis*- oder Placebo-Supplementation untersucht und analysiert werden. Zusätzlich sollen die Ergebnisse mit einer studienunabhängigen Referenzgruppe aus gesunden, reifen, vaginal geborenen und voll gestillten Kindern verglichen werden.

2 PROBANDEN UND METHODEN

Die Studie wurde als eine prospektive, randomisierte, doppelblinde, placebokontrollierte, 12-monatige, multizentrische Parallelstudie mit 4 Ernährungsgruppen geplant (hypoallergene Formulanahrung + *B. lactis* vs. hypoallergene Formulanahrung + Placebo, sowie gestillt + *B. lactis* vs. gestillt + Placebo) und von der Ethikkommission der Landesärztekammer Brandenburg genehmigt.

Für die Dissertation wurden ausschließlich die Daten einer Subgruppe des Zentrums Potsdam verwendet. Die Auswertung der Probandendaten erfolgte bis zu einem Alter von vier Lebensmonaten.

2.1 Studienprobanden

Die Rekrutierung der für die Dissertation erforderlichen Probanden im Zentrum Potsdam erfolgte zwischen Januar 2014 und Juni 2015. Dabei kamen alle im Klinikum Westbrandenburg geborenen Kinder infrage, die folgende Kriterien erfüllten:

Tab. 2.1: Übersicht der Ein- und Ausschlusskriterien

| Einschlusskriterien | Ausschlusskriterien |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • schriftliche Einwilligungserklärung der Mutter bzw. Sorgeberechtigten • Alter der Mutter ≥ 18 Jahre • gesundes Neugeborenes • Geburt durch Kaiserschnitt • Einzelgeburt • Alter zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie < 72 h • Gestationsalter ≥ 37 vSSW und < 42 vSSW • Körpergewicht ≥ 10 % und ≤ 90 % Perzentile | <ul style="list-style-type: none"> • kongenitale Erkrankungen oder angeborene Fehlbildungen • Absehbarkeit, dass die Eltern Schwierigkeiten haben werden, das geplante Ernährungsregime einzuhalten • geplante Wiedereinweisung ins Krankenhaus innerhalb der ersten 14 Lebenstage • Behandlung mit Antibiotika zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie |

vSSW: vollendete Schwangerschaftswochen

Die Eltern der Probanden wurden umfassend mündlich und schriftlich aufgeklärt und hatten ausreichend Bedenkzeit für die Zustimmung zur Studienteilnahme. Eine Einwilligungserklärung wurde vor Studienbeginn von den Müttern bzw. Eltern unterzeichnet.

2.2 Randomisierung

Die Randomisierung der Probanden erfolgte entsprechend der Probandennummer fortlaufend und somit zufällig anhand einzeln versiegelter Randomisierungsumschläge, die nach der Unterzeichnung der Einwilligungserklärung geöffnet wurden. Entsprechend einem Verhältnis von 1 : 1 erfolgte die Zuteilung entweder zur Probiotik- oder zur Placebogruppe. Das Studienpersonal sowie die Eltern der Probanden blieben im gesamten Studienverlauf verblindet, sodass eine objektive Datenerfassung aufgrund des doppelblinden Designs gegeben war.

2.3 Studienprodukt

Bei dem in dieser Studie verwendeten Probiotikum handelt es sich um das *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* NCC 2818, CNCM I-3446 der Firma Chr. Hansen, Dänemark.

Im Verlauf der Studie wurden zwei unterschiedliche Dosierungsformen des Studienproduktes verwendet:

- Stickpacks mit $1 \cdot 10^{10}$ cfu (50 mg) *B. lactis* oder Placebo in 950 mg HA-Formulapulver
- 800 g-HA-Formula-Dosen supplementiert mit 10^8 cfu/g Pulver *B. lactis* oder Placebo

Bei dem Placebo handelte es sich um die entsprechende Menge HA-Formula. Die Zusammensetzung der sowohl in den Stickpacks als auch in den Dosen verwendeten hypoallergenen Säuglingsanfangsnahrung ist identisch mit der kommerziell erhältlichen BEBA HA Pre Nahrung der Firma Nestlé, Schweiz (Zutatenliste siehe Anhang).

2.4 Studienablauf

Der Studienablauf der ersten vier Lebensmonate der Probanden ist in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt:

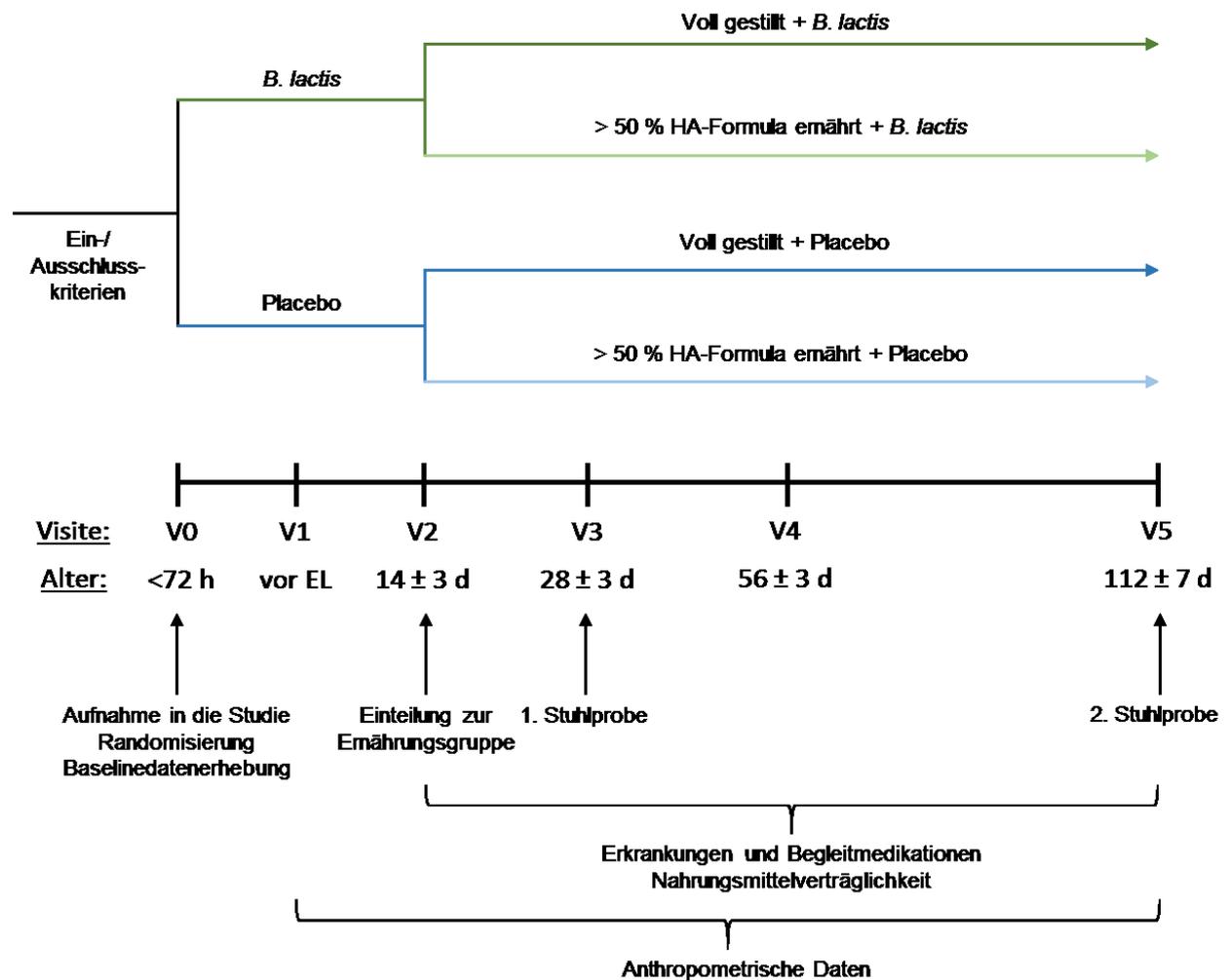


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Studienablaufes

Abgebildet sind die jeweiligen Visiten 0 bis 5 im zeitlichen Verlauf, das Alter der Probanden zu den jeweiligen Visiten und die Intervention bzw. Ernährungsform in den ersten vier Lebensmonaten. Die Aufnahme der Daten bzw. die Sammlung der Stuhlproben sind zu den entsprechenden Visiten gekennzeichnet.

EL = Entlassung, h = Stunden, d = Tage

Nach erfolgtem Screening hinsichtlich der Ein- und Ausschlusskriterien (vgl. Abschnitt 2.1) sowie der Einholung der schriftlichen Einwilligung der Eltern, wurden insgesamt sechs Studienvisiten (V0 bis V5) in den ersten vier Lebensmonaten der Probanden durchgeführt. Die Aufnahme in die Studie, sowie die Randomisierung und Erfassung der Baselineparameter erfolgte zur Visite 0. Die Einteilung zu der entsprechenden Ernährungsgruppe, die ausschließlich hinsichtlich der Entscheidung der Mutter (aktuelle Ernährungssituation des Kindes) erfolgte, fand zur Visite 2 nach 14 ± 3 Lebenstagen statt. Die anthropometrischen

Daten wurden an allen Studienvisiten erfasst. Die Nahrungsmittelverträglichkeit, sowie die Erkrankungen und Begleitmedikationen wurden zu den Studienterminen von den Eltern mittels auszufüllender Tagebücher an den Visiten 2 bis 5 abgefragt. Die Einsammlung der erforderlichen Stuhlproben fand an den Visiten 3 und 5 statt.

2.4.1 Dosierung des Studienproduktes

In den ersten 14 Lebenstagen erfolgte die Verabreichung des Studienproduktes unabhängig vom Ernährungsregime als orale Einmaldosis pro Tag (*B. lactis* $1 \cdot 10^{10}$ cfu/Tag oder Placebo in Stickpacks). Da die Gabe dessen bereits während des Krankenhausaufenthaltes begann, wurde den Müttern täglich bis zur Entlassung das Studienprodukt sowie 5 ml abgekochtes Wasser zur Verfügung gestellt. Anschließend konnten die Mütter individuell vor der nächsten Mahlzeit des Kindes den Inhalt des Stickpacks in das Wasser geben und dies vor dem Stillen als 5-ml-Portion verabreichen.

Alle Mütter wurden dazu angehalten, die ersten vier Monate ausschließlich zu stillen. Wenn das Stillen nicht möglich bzw. nicht gewollt war, wurde eine hypoallergene Formulanahrung zur Verfügung gestellt.

Wenn eine Mutter sich bereits vor Beginn der Studie zum Abstillen entschieden hatte, wurde der Inhalt des Stickpacks direkt mit der nächsten Flaschenmahlzeit verabreicht. Dabei handelte es sich um die entsprechende HA-Formulanahrung ohne Probiotikzusatz. Nach der Entlassung erfolgte die Studienproduktgabe einmal täglich zu Hause von den Eltern gemäß den Vorgaben.

Bei der Visite 2 (14 ± 3 d nach Entbindung) erfolgte die Zuordnung zu einer der beiden Ernährungsgruppen je nach aktueller Ernährung:

- Formulagruppe: (Nahrung > 50 % HA Säuglingsmilch)
- Stillgruppe: (100 % gestillt)

Die Stillgruppe erhielt weiterhin pro Tag eine orale Dosis des Studienproduktes bis zum Ende der Studie. Die Formulagruppe wechselte nach Tag 14 auf die HA-Formulanahrung (*B. lactis* $1 \cdot 10^8$ cfu/g Pulver oder Placebo), welches nach Packungsanweisung zubereitet wurde (ein Messlöffel pro 30 ml abgekochtem, auf Trinktemperatur abgekühltem Wasser) und nach Bedarf (ad libitum) gefüttert wurde.

Eine Übersicht der gesamten Studienprodukt dosierung im Verlauf ist in Tabelle 2.2 dargestellt:

Tab. 2.2: Dosierung des Studienproduktes

| | | Probiotikgruppe | | Placebogruppe | |
|---------|---|---|---|--|--|
| | | 1 Stickpack/Tag | | 1 Stickpack/Tag | |
| V0 - V2 | | (B. lactis 1·10 ¹⁰ cfu in 950 mg HA-Formula) | | (1000 mg HA-Formula) | |
| | | + Muttermilch/HA-Formula ad libitum | | + Muttermilch/HA-Formula ad libitum | |
| V2 - V5 | Stillgruppe | Formulagruppe | Stillgruppe | Formulagruppe | |
| | 1 Stickpack/Tag (B. lactis 1·10 ¹⁰ cfu in 950 mg HA-Formula) | 800g-Dosen (B. lactis 10 ⁸ cfu/g HA-Formula) | 1 Stickpack/Tag (1000 mg HA- Formula) | 800g-Dosen (HA-Formula) | |
| | + Muttermilch ad libitum | HA-Formula ad libitum | + Muttermilch ad libitum | HA-Formula ad libitum | |

Die durchschnittliche Trinkmenge der Formulagruppe beträgt laut Angaben auf der HA-Nahrung ab der 3. Lebenswoche ca. 675 ml pro Tag und steigert sich auf insgesamt ca. 1000 ml pro Tag am Ende des 4. Lebensmonates. Damit ist bei einer durchschnittlichen Einnahme von 850 ml pro Tag (zwischen 2 Wochen und 4 Monaten nach Geburt) eine tägliche Aufnahme von ca. 1,1·10¹⁰ cfu *B. lactis* gegeben, sodass von einer vergleichbaren Probiotikeinnahme in den beiden Ernährungsgruppen (Stillen und Formula) auszugehen ist.

Probanden, die nicht voll gestillt waren und deren Ernährung zur Visite 2 aus ≤ 50 % HA-Formula bestand, wurden von der weiteren Studienteilnahme aus administrativen Gründen ausgeschlossen.

2.4.2 Dokumentation der Studiendaten

Nach Studieneinschluss und Randomisierung der Probanden wurden zur Visite 0 (Baseline-Visite) folgende Daten notiert:

Tab. 2.3: Baselinedaten der Probanden

| Probandendaten | Daten der Mutter | Daten der Familie |
|---|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Geburtsdatum • Geburtszeit • Schwangerschaftswoche • Geburtsmodus (KS primär/sekundär) • Geburtsgewicht, -länge, -kopfumfang • Apgar-Score (1 + 5 min) • Geschlecht | <ul style="list-style-type: none"> • Alter zum Zeitpunkt der Entbindung • Rauchstatus vor der Schwangerschaft • Antibiotikaeinnahme unmittelbar vor Geburt | <ul style="list-style-type: none"> • Anzahl der im gleichen Haushalt lebenden Geschwister |

KS = Kaiserschnitt

Die Studienmütter wurden gebeten, während der gesamten Studiendauer alle Erkrankungen und Begleitmedikationen ihres Kindes in einem Tagebuch zu notieren. Außerdem sollten drei Tage vor den jeweiligen Studienvisiten (Visite 2 - 5) die Nahrungsmittelverträglichkeit als Stuhlfrequenz (pro 24 h) und Spuckhäufigkeit von den Eltern in ein separates Dokumentationsheft eingetragen werden.

Weiterhin erfolgte zu den Visiten 1 - 5 eine körperliche Untersuchung der Probanden sowie die Erfassung anthropometrischer Daten (Körpergewicht, Körperlänge und Kopfumfang). Es wurden die Tagebücher und Dokumentationshefte zur Nahrungsmittelverträglichkeit ausgegeben bzw. eingesammelt und Erkrankungen sowie Begleitmedikationen notiert. Außerdem wurden offene Fragen zu den einzelnen Punkten mit den Müttern besprochen und die Regelmäßigkeit der Studienprodukteinnahme abgefragt.

2.4.3 Stuhlprobensammlung

Zur Analyse von fäkalen Immun- und Entzündungsmarkern wurden die Mütter gebeten, zu den Studienvisiten 3 und 5 eine Stuhlprobe ihres Kindes mitzubringen. Dazu wurde an den Visiten 2 und 4 jeweils ein Stuhlsammlungskit, bestehend aus einem beschriftetem Stuhlröhrchen und einer verschließbaren Plastiktüte, ausgegeben. Mit dem im Röhrchen befestigten Löffel sollte eine Stuhlprobe am Visitentag bzw. am Vorabend aus der Windel entnommen werden und in der Tüte verschlossen bis zum Studientermin im Kühlschrank gelagert werden. Außerdem wurden Datum und Uhrzeit der Stuhlprobenentnahme von den Eltern notiert.

Nach Ankunft im Studienzentrum wurde der pH-Wert der Proben mittels pH-Meter (WTW pH538 mit Hamilton Biotrode SN 0020858 bzw. WTW pH3110 mit SenTix[®]Mic pH-Mikro-Elektrode, Weilheim, Deutschland) nach vorheriger Kalibration (Referenzpufferlösungen pH 4,00 und pH 7,00) gemessen und die Stuhlfarbe sowie –konsistenz notiert. Die Lagerung der Stuhlproben erfolgte in einem 2-ml-Reaktionsgefäß bei - 80 °C.

Zur weiteren Analyse wurden die Proben auf Trockeneis in das Auftragslabor Immundiagnostik AG (Bensheim, Deutschland) gesendet und dort weiterverarbeitet. Dazu wurden mittels des Stuhlaufbereitungssystems SAS 15 mg jeder Probe entnommen und in 1,5 ml Extraktionspuffer suspendiert. Anschließend erfolgte die Analyse der Proben mittels eines standardisierten ELISA-Verfahrens nach den entsprechenden Vorgaben der Kits. Die Messung der optischen Dichte nach Farbumschlag erfolgte bei 450 nm. Anhand von verschiedenen Standardkonzentrationen konnten mit Hilfe der Extinktionen die Konzentrationen der Parameter im Stuhl berechnet werden. Die ermittelten Werte wurden in mg/ml (slgA), µg/ml (Calprotectin) bzw. mg/dl (α1-AT) Frischmasse angegeben, wobei 1 ml = 1 g Stuhl entsprach. Gemessene Maximalwerte (slgA > 15 mg/ml, α1-AT > 225 mg/dl, Calprotectin > 2100 µg/ml) wurden vom Labor an definierten Referenzgeraden extrapoliert angegeben.

2.4.4 Erkrankungensinzidenzen und Begleitmedikationen

Die Auswertung der Erkrankungen erfolgte anhand der dokumentierten Einträge der Eltern in das Tagebuch sowie bei den Visiten. Dabei wurden Art und Dauer der Erkrankung notiert, sowie die eventuell benötigten Medikamente.

Die Unterteilung der Erkrankungensinzidenzen für diese Dissertation erfolgte in folgende Rubriken:

- Respiratorische Erkrankungen
- Koliken/Blähungen
- Augeninfektionen
- Hauterkrankungen im Windelbereich
- Durchfallerkrankungen
- Fieber
- Sonstige Erkrankungen

2.5 Referenzprobanden

Für diese Dissertation wurde eine studienunabhängige Referenzgruppe rekrutiert, die als Vergleichsgruppe hinsichtlich der Stuhlprobenanalyse und Erkrankungsinzidenz in den ersten vier Lebensmonaten diente und sich aus vaginal geborenen, gesunden, termingerechten, voll gestillten Kindern zusammensetzte. Die Bildung der Referenzgruppe wurde von der Ethikkommission der Landesärztekammer Brandenburg zustimmend bewertet.

Die Eltern der Probanden wurden umfassend mündlich und schriftlich aufgeklärt und hatten ausreichend Bedenkzeit für die Zustimmung zur Teilnahme an der Referenzgruppe. Die Einwilligungserklärung wurde vor Studienbeginn von den Müttern unterzeichnet.

Für die Referenzgruppe kamen alle im Klinikum Westbrandenburg geborenen Kinder infrage, die folgende Einschlusskriterien erfüllten:

- schriftliche Einwilligungserklärung der Mutter/der Sorgeberechtigten
- Alter der Mutter ≥ 18 Jahre
- gesundes Neugeborenes
- Vaginalgeburt
- Einzelgeburt
- Alter zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie < 11 Tage
- Gestationsalter ≥ 37 und < 42 vollendete Schwangerschaftswochen
- Körpergewicht ≥ 10 % und ≤ 90 % Perzentile

Außerdem sollten die Mütter beabsichtigen, das Kind in den ersten vier Lebensmonaten voll zu stillen.

Als Ausschlusskriterien der Referenzgruppe galten dieselben der unter Abschnitt 2.1 genannten Punkte der kaiserschnittgeborenen Kinder.

Da für die Referenzgruppe keine Studienvisiten und keinerlei körperliche Untersuchungen vorgesehen waren, wurden folgende Daten dieser Kinder erfasst:

- Daten des Untersuchungsheftes (U1 bis U4) im Alter von 4 Monaten
- Daten des Impfausweises im Alter von 4 Monaten
- ausgefüllter Erkrankungs- und Medikamentendokumentationsbogen im Alter von vier Monaten

Außerdem erfolgte die Baseline-Datenerfassung analog zur Visite 0 der Studienkinder (vgl. Tab. 2.3). Vor der Entlassung wurde den Müttern ein Stuhlsammlungskit sowie der Erkrankungs- und Medikamentendokumentationsbogen mitgegeben.

Die Stuhlprobensammlung erfolgte entsprechend zu den Zeitpunkten der Studienkinder (28 ± 3 Tage und 112 ± 7 Tage nach Entbindung). Die Mütter wurden telefonisch am Vorabend benachrichtigt, eine Stuhlprobe einzusammeln und diese im Kühlschrank zu lagern. Die Probe wurde am nächsten Tag abgeholt und sofort im Studienzentrum verarbeitet (siehe 2.4.3).

2.6 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm SPSS 24 (IBM Analytics) verwendet. Es erfolgte eine Auswertung der normalverteilten Daten mittels ANOVA-Analyse, nicht normalverteilte bzw. nicht varianzhomogene Daten wurden mittels des nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Tests durchgeführt. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden zur Lokalisierung des statistischen Unterschiedes mittels Post-Hoc-Analyse (Dunn-Bonferroni-Test) ermittelt. Nominale Daten wurden mittels des exakten Tests nach Fisher analysiert. Bei verbundenen, nicht normalverteilten Stichproben erfolgte die statistische Analyse mittels Wilcoxon-Test.

Die Korrelationsanalysen für metrische, nicht normalverteilte Daten wurden mittels Spearman-Rho-Analyse ausgewertet sowie für nominale und metrische Daten mittels ETA-Koeffizienten dargestellt und gemäß den Kriterien nach Cohen (1992) in schwache ($r < 0.3$), moderate ($0.3 < r < 0.5$) oder starke ($0.5 < r < 1.0$) Effekte eingeteilt [101].

Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde für alle Datenanalysen auf 5 % festgelegt, somit wurden Unterschiede als statistisch signifikant gewertet, wenn $p < 0,05$ bzw. hoch signifikant, wenn $p < 0,01$ ermittelt wurde.

3 ERGEBNISSE

Im Rahmen der Studie konnten 82 Probanden bis Juni 2015 rekrutiert werden. Davon wurden 40 der Probiotikgruppe und 42 der Placebogruppe zugeordnet. Für diese Dissertation wurden die Daten bis zum Alter von vier Monaten der Probanden (bis einschließlich Visite 5) verwendet, da in diesem Zeitraum eine ausschließliche Milchernährung bei allen Probanden erfolgte und somit eine Vergleichbarkeit der Gruppen gewährleistet wurde. Für die Referenzgruppe konnten 11 Probanden rekrutiert werden.

3.1 Vergleich der basalen Gruppencharakteristika

Die Ergebnisse der analysierten Baseline-Daten, die zur Visite 0 erhoben wurden, sind in Tabelle 3.1 dargestellt:

Tab. 3.1: Charakterisierung der Intention-To-Treat-(ITT)-Gruppen hinsichtlich der Baseline-Daten

| | Probiotik n = 40 | Placebo n = 42 | Referenz n = 11 | Signifikanz |
|--|---------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| Geschlecht | | | | |
| männlich n (%) | 22 (55,0) | 25 (59,5) | 6 (54,5) | n.s. |
| Gestationsalter (M ± SD) | | | | |
| vSSW | 39,2 ± 1,0 | 39,2 ± 1,2 | 39,5 ± 1,1 | n.s. |
| Entbindungsmodus | | | | |
| prim. Sektio n (%) | 13 (32,5) | 10 (23,8) | 0 (0,0) | n.s. ^Δ |
| spontan n (%) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 11 (100) | |
| Anthropometrische Geburtsdaten (M ± SD) | | | | |
| Körpergewicht (kg) | 3,46 ± 0,38 | 3,48 ± 0,39 | 3,41 ± 0,29 | n.s. |
| Körperlänge (cm) | 49,43 ± 2,14 | 49,86 ± 1,89 | 49,64 ± 1,12 | n.s. |
| Kopfumfang (cm) | 35,28 ± 1,28 | 35,36 ± 1,06 | 35,55 ± 1,01 | n.s. |
| Apgar-Score nach Geburt (M ± SD) | | | | |
| 1 min | 8,4 ± 1,3 | 8,4 ± 1,5 | 8,9 ± 0,3 | n.s. |
| 5 min | 9,2 ± 0,8 | 9,3 ± 0,7 | 9,9 ± 0,3 | * |
| Alter der Mutter bei Geburt (M ± SD) in Jahren | 31,2 ± 5,1 | 32,5 ± 4,3 | 30,6 ± 4,7 | n.s. |
| Antibiose i.v. der Mutter unmittelbar vor Geburt | | | | |
| n (%) | 5 (12,5) | 7 (16,7) | 1 (9,1) | n.s. |
| mindestens ein Geschwisterkind im gleichen Haushalt lebend | | | | |
| n (%) | 19 (47,5) | 16 (38,1) | 3 (27,3) | n.s. |
| mütterlicher Rauchstatus vor der Schwangerschaft | | | | |
| Raucher n (%) | 9 (22,5) | 14 (33,3) | 6 (54,6) | n.s. |

M = Mean (Mittelwert), SD = Standard Deviation (Standardabweichung), vSSW = vollendete Schwangerschaftswochen, prim. = primär, i.v. = intravenös

^Δ Signifikanzaussage bezieht sich ausschließlich auf den Vergleich zwischen Probiotik- und Placebogruppe
* p = 0,01; Unterschied in Referenzgruppe begründet, Post-Hoc-Analyse paarweise Vergleiche der Gruppen: Probiotik vs. Placebo p = 1,000 (n.s.), Probiotik vs. Referenz p = 0,009 (**), Placebo vs. Referenz p = 0,019 (*)
n.s. = nicht signifikant

In der Probiotikgruppe waren 55,0 % der rekrutierten Probanden männlich, verglichen mit 59,5 % in der Placebo- und 54,5 % in der Referenzgruppe. Der Unterschied in der Verteilung ist nach Anwendung des exakten Fisher's Test nicht signifikant. Ebenso kein signifikanter Unterschied ($p = 0,735$) ließ sich in dem Gestationsalter (vollendete Schwangerschaftswochen, vSSW) zum Zeitpunkt der Geburt in den einzelnen Gruppen feststellen (Probiotik $39,2 \pm 1,0$ vSSW vs. Placebo $39,2 \pm 1,2$ vSSW vs. Referenz $39,5 \pm 1,1$ vSSW). In den Studiengruppen kamen 32,5 % (Probiotik) bzw. 23,8 % (Placebo) der Probanden per primärer Sektio zur Welt, der Unterschied ist nicht signifikant ($p = 0,381$). Alle anderen Studienprobanden kamen demnach per sekundärer Sektio zur Welt. Da die Referenzgruppe aus ausschließlich vaginal geborenen Kindern besteht, liegt der signifikante Unterschied der Gruppenverteilung ausschließlich im Vergleich der Probiotik- bzw. Placebogruppe mit der Referenzgruppe begründet, dieser Unterschied ist aufgrund des „Goldstandard“-Charakters der Referenzgruppe so forciert.

In den anthropometrischen Daten der Geburtsmaße lassen sich keine signifikanten Unterschiede beim Körpergewicht ($p = 0,668$), der Körperlänge ($p = 0,532$) und des Kopfumfangs ($p = 0,866$) zwischen den drei Gruppen feststellen. Gleiches gilt für das maternale Alter zum Zeitpunkt der Geburt ($p = 0,275$), sowie die Apgar-Werte 1 Minute nach der Geburt der Probanden ($p = 0,460$). Im Vergleich dazu besteht ein signifikanter Unterschied bei den Apgar-Werten 5 Minuten nach Geburt der Probanden ($p = 0,010$). Die Lokalisierung des statistischen Unterschieds liegt ausschließlich in der Referenzgruppe begründet, da die Post-Hoc-Analyse (paarweise Vergleiche der Gruppen) keinen Unterschied zwischen den Studiengruppen nachweisen konnte ($p = 1,000$), jedoch zwischen den Sektio- und vaginal geborenen Probanden (PRO vs. REF: $p = 0,009$ (**)) bzw. PLA vs. REF: $p = 0,019$ (*)).

Eine intravenöse Antibiotikabehandlung unmittelbar vor der Geburt erhielten 12,5 % der Mütter der Probiotikgruppe, sowie 16,7 % der Mütter der Placebogruppe und 9,1 % der Mütter der Referenzgruppe. Dieser Unterschied ist nicht signifikant. Ebenso keine signifikanten Unterschiede ließen sich für das Vorhandensein von mindestens einem Geschwisterkind, welches im gleichen Haushalt lebt, sowie für den maternalen Raucherstatus vor Beginn der Schwangerschaft feststellen.

3.2 Studienpopulation nach Drop-outs und Ausschlüssen

Die Aufteilung der gesamten Studienpopulation ist schematisch in Abbildung 3.1 dargestellt. Es ergaben sich nach Einteilung in der für diese Dissertation als "Per-Protocol"-definierten Gruppen mit konkreten Ernährungsregimes (vgl. Abschnitte 3.1.1-3.1.3) Stichprobengrößen von 8 bis 13 Probanden pro Gruppe.

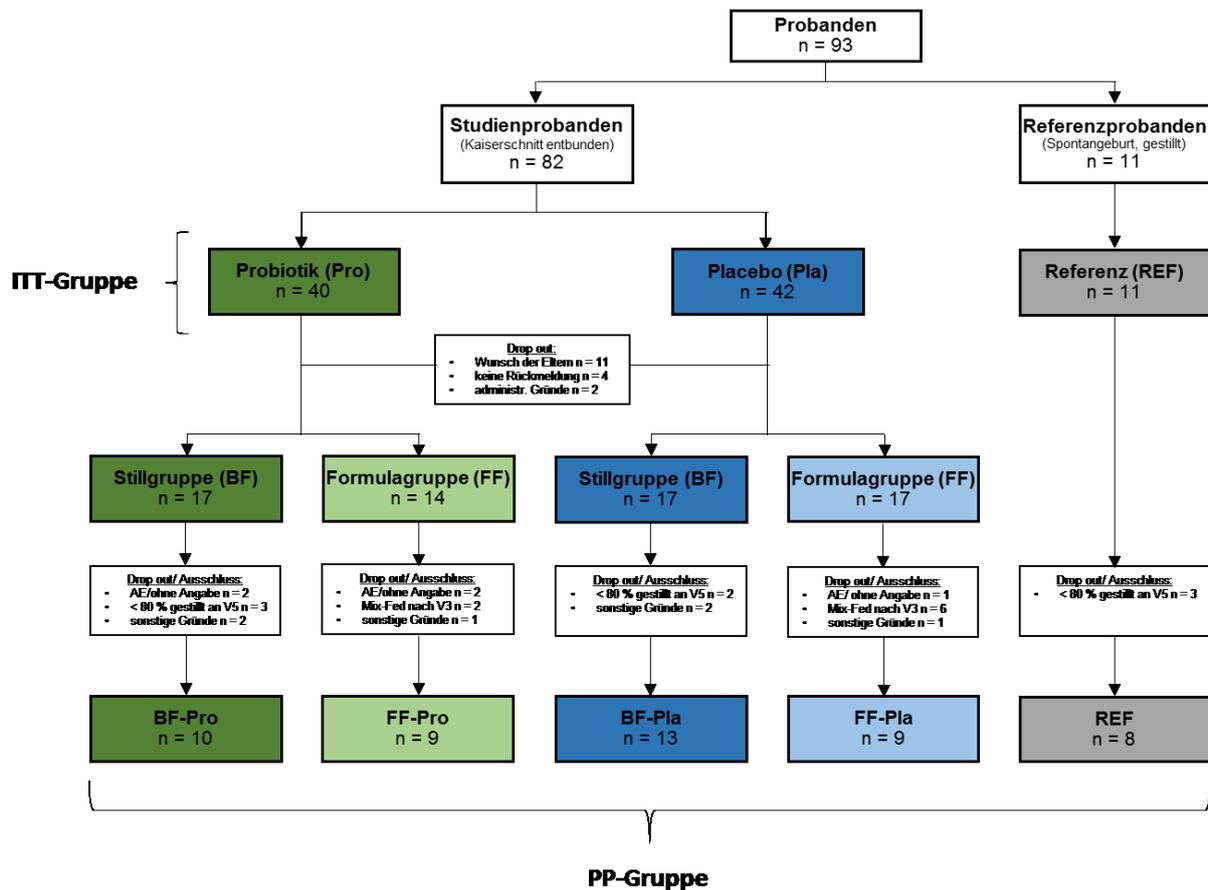


Abb. 3.1: Gesamtdarstellung der Studienpopulation

Dargestellt sind die gesamtrekrutierte Intention-To-Treat-Gruppe (ITT) sowie die nach Drop-out und Ausschluss gebildete Per-Protocol-Gruppe (PP), die in die Analyse mit einbezogen wurden.

n = Probandenanzahl, Pro = Probiotik (*B. lactis*)-supplementiert, Pla = Placebo-supplementiert, BF = Breastfed (gestillt), FF = Formulafed (formulaernährt), Mix-fed = Zwiemilchernährt (sowohl gestillt als auch formulaernährt), REF = Referenzgruppe, AE = Adverse Event (unerwünschtes Ereignis)

Zwei Wochen nach Studieneinschluss erfolgte zur Visite 2 die Einteilung in eine der beiden Ernährungsgruppen entsprechend der zu diesem Zeitpunkt aktuellen Ernährung des Probanden. Dabei wurden 34 Probanden in die Stillgruppe und 31 in die Formulargruppe eingeteilt. 15 Probanden schieden bereits vor Visite 2 auf Wunsch der Eltern (n = 11) oder ohne Rückmeldung (n = 4) aus. Zwei Probanden wurden aus administrativen Gründen am Visitermin 2 aus der Studie ausgeschlossen (Anteil Muttermilch < 100 % und > 50 %). Sechs Probanden wurden aufgrund eines lieferbedingten Problems nicht in die Auswertung

mit einbezogen. Nach der Visite 2 schieden weiterhin fünf Probanden aufgrund von unerwünschten Ereignissen (Schreiphasen, Änderung der Stuhlkonsistenz) bzw. ohne Rückmeldung aus.

3.2.1 Subgruppenbildung der Stillgruppen

Hinsichtlich der Ernährungssituation erfolgte für die Auswertung der Dissertation eine weitere Aufspaltung in Subgruppen, da aus unterschiedlichen Gründen das vorgegebene Ernährungsregime nicht von allen Müttern bis zur Visite 5 eingehalten werden konnte. So waren in den beiden Stillgruppen 19 Probanden bis zum Alter von vier Monaten voll gestillt. Zwei Probanden wurden in diese Gruppe miteinbezogen, da der Anteil der Ersatznahrung als vernachlässigbar gewertet wurde und zu beiden Zeitpunkten der Stuhlproben die Probanden mindestens 24 Stunden vorher ausschließlich Muttermilch erhielten und somit laut WHO als voll gestillt gelten [102]. Weitere vier Probanden waren in diesem Zeitraum zu mindestens 80 % gestillt und erhielten nach mindestens einem bzw. drei vollgestillten Monaten entweder tageweise oder weniger als täglich eine Mahlzeit als Flaschennahrung. Dabei wurde jedoch sichergestellt, dass es sich dabei um eine probiotikafreie Säuglingsnahrung handelte.

Fünf Probanden wurden vor Visite 5 komplett abgestillt oder waren an Visite 5 weniger als 80 % gestillt. Diese wurden aus der Auswertung ausgeschlossen.

3.2.2 Subgruppenbildung der Formulagruppen

Auch die Formulagruppe wurde für die Auswertung der Dissertation in weitere Untergruppen aufgeteilt. Insgesamt 15 Mütter aus beiden Supplementationsgruppen hatten sich bis zur Visite 2 entschieden, komplett abzustillen und zu 100 % die Studiennahrung zu verwenden. Drei Probanden wurden nach Visite 2 nur geringfügig mit Muttermilch ernährt und waren bis vor Visitendatum 3 komplett abgestillt. Dadurch war auch bei diesen Probanden gewährleistet, dass die Stuhlprobensammlung bei definierter Milchernährung (100 % Formula) stattfand.

Acht Probanden wurden sowohl mit Muttermilch, als auch mit Formulanahrung ernährt (MF= Mix-fed). Da zu unterschiedlichen Zeitpunkten (zwischen V3 und V5) die Muttermilchernährung eingestellt wurde und somit keine Gruppenhomogenität bestand, wurden diese Probanden aus der Auswertung ausgeschlossen.

3.2.3 Referenzgruppe

Für die Referenzgruppe konnten 11 Probanden rekrutiert werden. Davon schieden drei Probanden aus der Auswertung aus (n = 1 weniger als 80 % gestillt, n = 2 abgestillt vor Ende des 4. Lebensmonat). Die übrigen acht Probanden bildeten die Referenzgruppe, wovon sechs Probanden bis zum Alter von vier Monaten zu 100 % gestillt waren und zwei Probanden nach drei voll gestillten Monaten weniger als täglich maximal eine Flaschenmahlzeit erhielten und somit mindestens zu 80 % gestillt waren (vgl. Abschnitt 3.2.1). Auch hierbei wurde sichergestellt, dass es sich um eine probiotikafreie Säuglingsnahrung handelte.

3.3 Anthropometrische Daten

In die statistische Auswertung wurden nur Probanden einbezogen, die wie unter 3.2 beschrieben einer definierten Ernährungsgruppe zugeordnet und von denen bis zur Visite 5 alle notwendigen Daten erfasst wurden („Per-Protocol“-Gruppe). Es werden folgende Abkürzungen für die einzelnen Gruppen verwendet:

- BF-Pro (Probiotik (*B. lactis*) -supplementierte Stillgruppe)
- BF-Pla (Placebo-supplementierte Stillgruppe)
- FF-Pro (Probiotik (*B. lactis*) -supplementierte Formulagruppe)
- FF-Pla (Placebo-supplementierte Formulagruppe)
- REF (Referenzgruppe)

Bei allen Visiten wurden die anthropometrischen Körpermaße (Gewicht, Länge und Kopfumfang) ermittelt. Die Daten der Referenzgruppe wurden den ärztlichen Untersuchungsheften der empfohlenen Vorsorgeuntersuchungen entnommen und in zeitlichem Bezug zu den Visiten gesetzt. Dabei entsprachen die U1 der Visite 0 (Baseline-Daten der Geburt), die U2 der Visite 1 (vor Entlassung), die U3 der Visite 3 (1 Monat alt) und die U4 der Visite 5 (4 Monate alt). Um eine Vergleichbarkeit der Gruppen bezüglich der Referenzgruppe zu gewährleisten, wurden nur die anthropometrischen Daten dieser Visiten (0,1, 3 und 5) der Studienkinder verwendet.

3.3.1 Körpergewicht

Die ermittelten Daten der Körpergewichte in Kilogramm (kg) der einzelnen Gruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten sind in Abbildung 3.2 dargestellt:

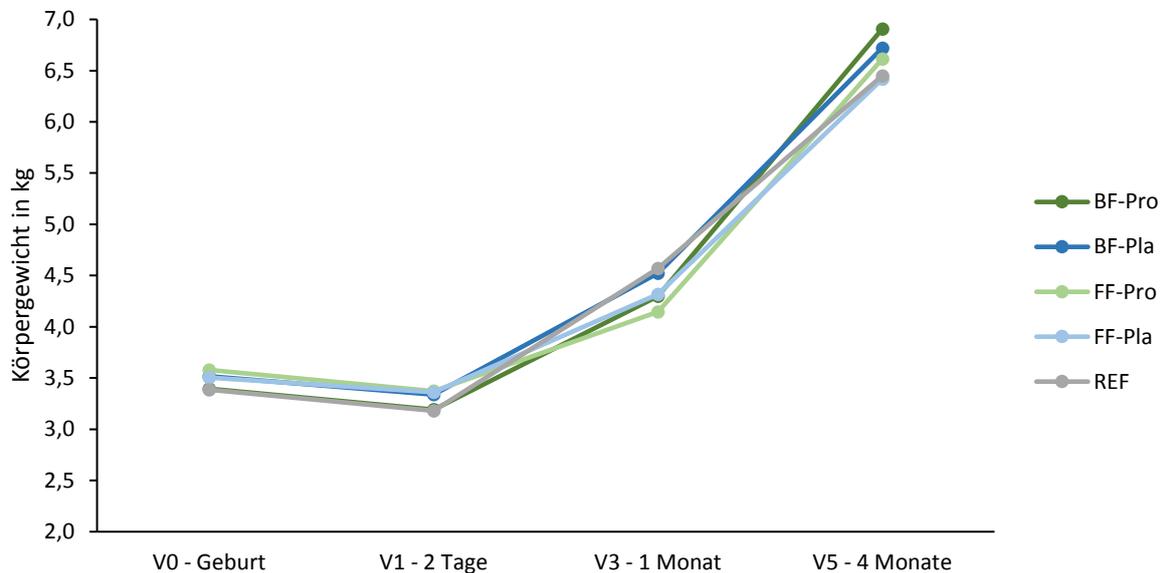


Abb. 3.2: Gewichtsentwicklung der Studien- und Referenzgruppen in den ersten vier Lebensmonaten

Abgebildet sind die jeweiligen Mittelwerte der zu den Visiten 0, 1, 3 und 5 ermittelten Körpergewichte der vier Behandlungsgruppen BF-Pro (n = 10), BF-Pla (n = 13), FF-Pro (n = 9), FF-Pla (n = 9) sowie der Referenzgruppe REF (n = 8). Die Standardabweichungen sind nicht dargestellt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die tabellarischen Daten der Mittelwerte und Standardabweichungen sind dem Anhang zu entnehmen.

Im Vergleich der einzelnen Zeitpunkte ergaben sich in den jeweiligen Gruppen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Körpergewichte. Die physiologische Gewichtsabnahme zum Zeitpunkt vor der Entlassung (V1) ist in allen Gruppen gleichermaßen erkennbar und beträgt durchschnittlich $187,1 \pm 84,2$ g ($M \pm SD$). Dies entspricht einer durchschnittlichen Gewichtsabnahme von $5,4 \pm 2,3$ % vom Geburtsgewicht.

Auch im Endgewicht zum Zeitpunkt nach 4 Monaten (V5) ergeben sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen (BF-Pro: $6,9 \pm 1,1$ kg; BF-Pla: $6,7 \pm 0,8$ kg; FF-Pro: $6,6 \pm 0,7$ kg; FF-Pla: $6,4 \pm 0,7$ kg; REF: $6,5 \pm 0,5$ kg).

Zur Analyse der Gewichtszunahmen in den ersten vier Lebensmonaten wurde außerdem die Gewichtsänderung als Zunahme in Gramm pro Tag (g/d) berechnet und grafisch dargestellt:

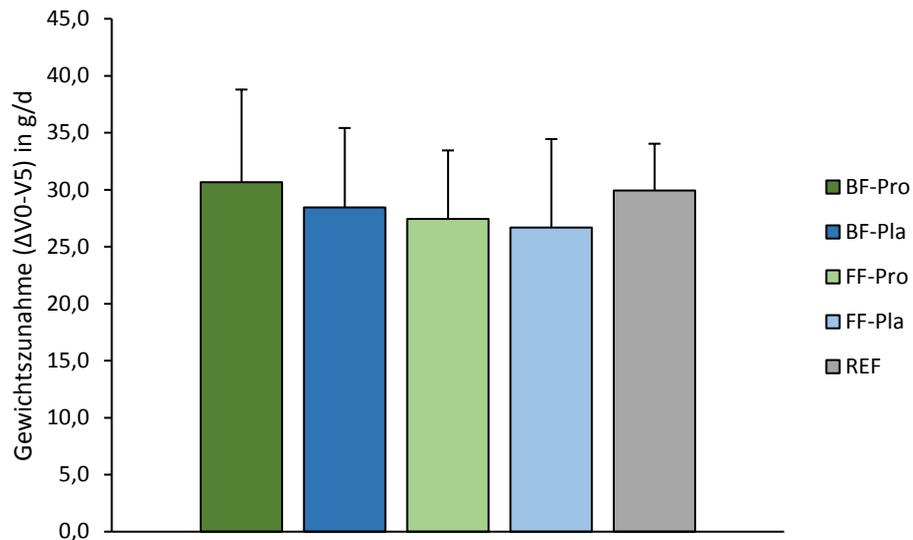


Abb. 3.3: Durchschnittliche tägliche Gewichtszunahme der Studien- und Referenzgruppen in den ersten vier Lebensmonaten

Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte der durchschnittlichen täglichen Gewichtszunahme zwischen den Visiten 0 und 5 der vier Behandlungsgruppen sowie der Referenzgruppe. Die Standardabweichungen der einzelnen Gruppen sind als Fehlerbalken dargestellt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die durchschnittliche Gewichtszunahme pro Tag beträgt in den Gruppen BF-Pro: $30,7 \pm 8,1$ g; BF-Pla: $28,4 \pm 7,0$ g; FF-Pro: $27,4 \pm 6,0$ g; FF-Pla: $26,7 \pm 7,8$ g und in der Referenzgruppe REF: $29,9 \pm 4,1$ g). Die Unterschiede in den Gruppen sind nicht signifikant ($p = 0,729$). Die gleichmäßigste Gewichtszunahme innerhalb der Gruppen ist aufgrund der geringeren Standardabweichung in der Referenzgruppe erkennbar. Eine leicht höhere Gewichtszunahme pro Tag ist in den Stillgruppen insgesamt (BF-Pro, BF-Pla und REF) im Vergleich zu den Formulagruppen (FF-Pro und FF-Pla) erkennbar, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant ($p = 0,214$).

3.3.2 Körperlänge

Die ermittelten Daten der Körperlängen in Zentimeter (cm) zu den verschiedenen Zeitpunkten sind in Abbildung 3.4 dargestellt:

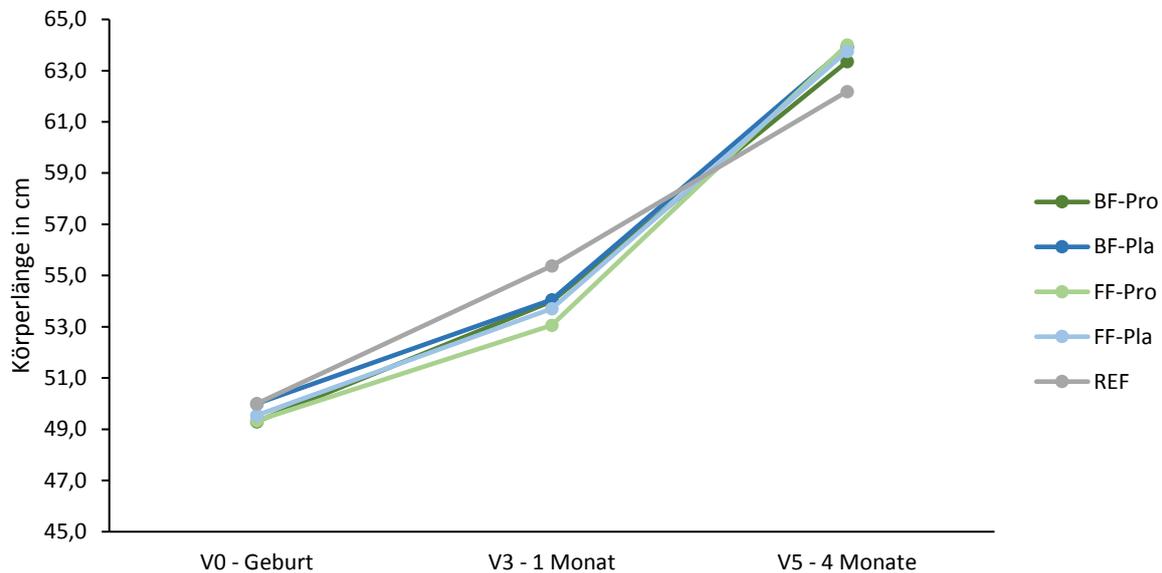


Abb. 3.4: Entwicklung der Körperlängen der Studien- und Referenzgruppen in den ersten vier Lebensmonaten

Abgebildet sind die jeweiligen Mittelwerte der zu den Visiten 0, 3 und 5 ermittelten Körperlängen der vier Behandlungsgruppen BF-Pro (n = 10), BF-Pla (n = 13), FF-Pro (n = 9), FF-Pla (n = 9) sowie der Referenzgruppe REF (n = 8). Die Standardabweichungen sind nicht dargestellt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die tabellarischen Daten der Mittelwerte und Standardabweichungen sind dem Anhang zu entnehmen.

Zum Zeitpunkt V1 (2 - 3 Tage nach der Geburt) sind keine Werte dargestellt, da diese aufgrund der kurzen Zeitspanne nicht erneut gemessen wurden.

Im Gruppenvergleich bezüglich der Körperlängen ergaben sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede. Die Körperlängen betragen nach vier Lebensmonaten in den Gruppen: BF-Pro: $63,4 \pm 3,5$ cm; BF-Pla: $63,9 \pm 4,8$ cm; FF-Pro: $64,0 \pm 2,6$ cm; FF-Pla: $63,8 \pm 1,9$ cm; REF: $62,2 \pm 2,7$ cm (M \pm SD).

3.3.3 Kopfumfang

Die ermittelten Daten zu den Kopfumfängen in Zentimeter (cm) zu den verschiedenen Zeitpunkten sind in Abbildung 3.5 dargestellt:

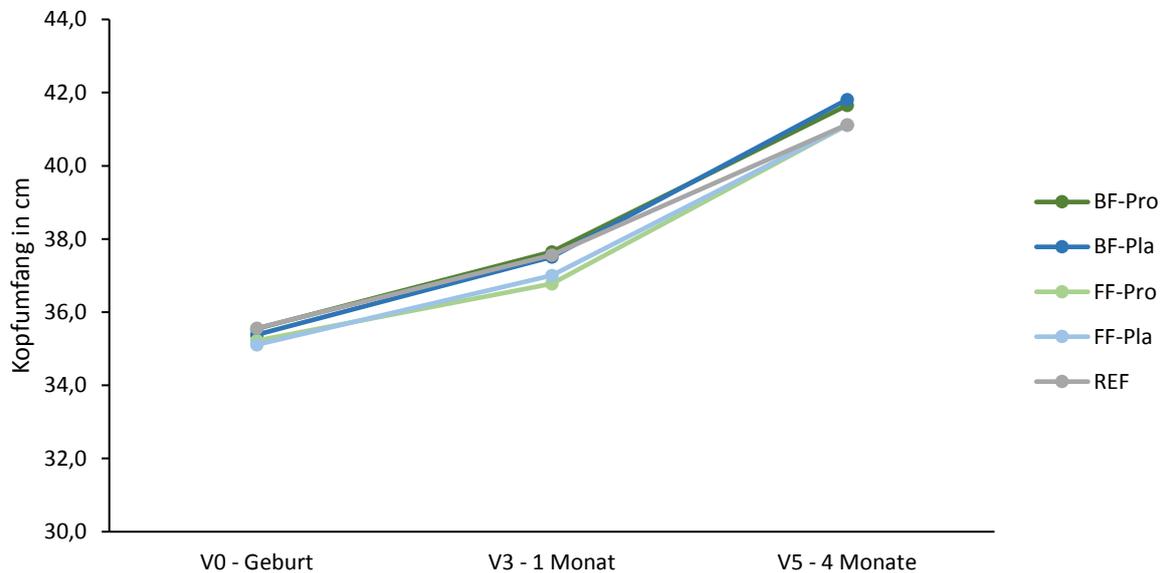


Abb. 3.5: Entwicklung der Kopfumfänge der Studien- und Referenzgruppen in den ersten vier Lebensmonaten

Abgebildet sind die jeweiligen Mittelwerte der zu den Visiten 0, 3 und 5 ermittelten Kopfumfänge der vier Behandlungsgruppen BF-Pro (n = 10), BF-Pla (n = 13), FF-Pro (n = 9), FF-Pla (n = 9) sowie der Referenzgruppe REF (n = 8). Die Standardabweichungen sind nicht dargestellt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die tabellarischen Daten der Mittelwerte und Standardabweichungen sind dem Anhang zu entnehmen.

Zum Zeitpunkt V1 (2 - 3 Tage nach der Geburt) sind vergleichbar mit der Körperlänge keine Werte dargestellt, da diese aufgrund der kurzen Zeitspanne nicht erneut gemessen wurden.

Es ergaben sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede der gemessenen Kopfumfänge innerhalb der 5 Gruppen. Zur Visite 5 wurden folgende Werte ermittelt: BF-Pro: $41,7 \pm 1,8$ cm; BF-Pla: $41,8 \pm 1,1$ cm; FF-Pro: $41,1 \pm 1,2$ cm; FF-Pla: $41,1 \pm 1,3$ cm; REF: $41,1 \pm 1,0$ cm (M \pm SD).

3.4 Nahrungsmittelverträglichkeit

Anhand der von den Eltern notierten Daten über Spuckhäufigkeit und Stuhlfrequenz der Probanden jeweils drei Tage vor einer Visite, können Rückschlüsse auf die Verträglichkeit des Probiotikums *B. lactis* gezogen werden. Da in der Referenzgruppe keinerlei Behandlung erfolgte, wurden diese Daten dort nicht erhoben. Der Vergleich bezieht sich somit ausschließlich auf die vier Studiengruppen (BF-Pro, BF-Pla, FF-Pro und FF-Pla). Die

Zeitpunkte der Dokumentation entsprechen für V2 zwei Wochen, für V3 einen Monat, für V4 zwei Monate und für V5 vier Monate nach Geburt.

3.4.1 Stuhlfrequenz

In Tabelle 3.2 sind die durchschnittlichen Stuhlhäufigkeiten pro Tag angegeben (Summe der Anzahl der Stühle pro Tag geteilt durch drei Beobachtungstage vor der jeweiligen Visite).

Tab. 3.2: Durchschnittliche Stuhlfrequenz pro Tag

| Stuhlfrequenz (M ± SD) | BF-Pro n = 10 | BF-Pla n = 13 | FF-Pro n = 9 | FF-Pla n = 9 | Signifikanz* |
|---------------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|--------------|
| V2 | 5,9 ± 1,3 | 5,4 ± 2,2 | 2,3 ± 0,9 | 3,0 ± 1,3 | n.s. |
| V3 | 5,0 ± 1,3 | 4,2 ± 2,4 | 1,9 ± 1,3 | 1,7 ± 0,6 | n.s. |
| V4 | 3,5 ± 1,8 | 2,6 ± 1,8 | 1,3 ± 0,3 | 1,3 ± 0,7 | n.s. |
| V5 | 2,6 ± 1,8 | 1,8 ± 2,0 | 0,9 ± 0,3 | 0,9 ± 0,4 | n.s. |

M = Mean (Mittelwert), SD = Standard Deviation (Standardabweichung)

* Signifikanzaussagen nur für den Vergleich der jeweils entsprechenden, gleichen Ernährungssubgruppen angegeben (BF-Pro vs. BF-Pla, FF-Pro vs. FF-Pla), n.s. = nicht signifikant

Anhand der Daten ist erkennbar, dass Probanden der Stillgruppe zu allen Zeitpunkten eine größere durchschnittliche Anzahl von Stuhlgängen pro Tag absetzten als formulaernährte Probanden. Dies entspricht der physiologischen Erwartung aufgrund der durchschnittlich häufigeren Stillmahlzeiten im Vergleich zu Flaschenkindern. Dabei sind die Unterschiede zwischen der BF-Pro-Gruppe mit jeweils beiden FF-Gruppen (Pro und Pla) an V2 und V3 statistisch signifikant ($p < 0,05$). Da auch bei den Stillkindern die Stuhlfrequenz mit zunehmendem Alter sinkt, ist dieser Unterschied zu den Zeitpunkten der Visiten 4 und 5 nicht mehr signifikant.

Da für die Bewertung der Nahrungsmittelverträglichkeit der Unterschied zu den jeweiligen korrespondierenden Ernährungsgruppen (BF-Pro vs. BF-Pla und FF-Pro vs. FF-Pla) wichtig ist, sind die ermittelten Signifikanzen in der Tabelle nur für den Vergleich Probiotik vs. Placebo angegeben. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

3.4.2 Spuckfrequenz

In Tabelle 3.3 sind die durchschnittlichen Spuckhäufigkeiten pro Tag angegeben (Summe der Anzahl der Spuckereignisse pro Tag geteilt durch drei Beobachtungstage vor der jeweiligen Visite).

Tab. 3.3: Durchschnittliche Spuckfrequenz pro Tag

| Spuckfrequenz (M ± SD) | BF-Pro n = 10 | BF-Pla n = 13 | FF-Pro n = 9 | FF-Pla n = 9 | Signifikanz |
|---------------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-------------|
| V2 | 2,5 ± 2,8 | 2,7 ± 2,2 | 3,0 ± 2,2 | 3,8 ± 2,4 | n.s. |
| V3 | 2,6 ± 2,4 | 3,4 ± 2,8 | 3,0 ± 3,2 | 3,5 ± 2,2 | n.s. |
| V4 | 2,4 ± 2,3 | 2,3 ± 2,0 | 2,4 ± 2,3 | 2,6 ± 1,9 | n.s. |
| V5 | 2,3 ± 2,4 | 1,8 ± 2,1 | 2,2 ± 2,3 | 3,2 ± 2,0 | n.s. |

M = Mean (Mittelwert), SD = Standard Deviation (Standardabweichung), n.s. = nicht signifikant

Hinsichtlich der Spuckfrequenzen pro Tag konnten keinerlei signifikante Unterschiede sowohl innerhalb der korrespondierenden Ernährungsgruppen als auch über die Gruppen insgesamt ermittelt werden.

3.5 Stuhlprobenanalyse

Für die Analyse der Immun- und Entzündungsmarker wurden die Stuhlproben wie unter Abschnitt 2.4.3 beschrieben gesammelt und analysiert. Aus unterschiedlichen Gründen konnten nicht von allen Probanden zu den definierten Zeitpunkten analysierbare Stuhlproben eingesammelt werden (Stuhl zu flüssig, keine Möglichkeit der Entnahme aus der Windel, zu wenig Probenmaterial, kein Stuhlgang des Probanden im vorgesehenen Zeitfenster, private Gründe der Probandeneltern).

Für die Stuhlprobenanalysen wurden nur komplette Probensätze (vorhandene und auswertbare Stuhlproben an V3 und V5) verwendet, da aufgrund der geringeren Gruppenstärken individuelle Effekte somit besser ausgewertet werden können.

Ein Proband der BF-Pla-Gruppe wurde aus der Stuhlprobenanalyse ausgeschlossen, da die Probe an V3 sowohl phänotypisch als auch anhand der Messwerte einen Ausreißer darstellte.

Daraus ergaben sich für die Analysen der Stuhlproben folgende Gruppenstärken:

Tab. 3.4: Gruppenstärken der auswertbaren Stuhlproben

| Gruppe | BF-Pro | BF-Pla | FF-Pro | FF-Pla | REF |
|---|--------|--------|--------|--------|-------|
| Anzahl Probanden gesamt | n = 10 | n = 13 | n = 9 | n = 9 | n = 8 |
| Anzahl auswertbarer Stuhlproben (V3 und V5) | n = 9 | n = 10 | n = 7 | n = 9 | n = 7 |

Die durchschnittliche Lagerzeit der Proben in den Probandenhaushalten bei 4 - 8 °C bis zur Analyse betrug für die Stuhlproben an V3 $9,1 \pm 6,3$ Stunden und war innerhalb der Gruppen nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,560$). Die Lagerzeit der Stuhlproben an V5 betrug durchschnittlich $11,0 \pm 8,4$ Stunden und zeigte ebenso innerhalb der Gruppen keinen statistischen Unterschied ($p = 0,398$). Messbare Effekte in den Zielparametern aufgrund der unterschiedlichen Lagerzeit können somit ausgeschlossen werden.

3.5.1 pH-Wert

Die Ergebnisse der pH-Wert-Messung der Stuhlproben zu den Zeitpunkten V3 (1 Monat) und V5 (4 Monate) sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst:

Tab. 3.5: Ergebnisse der pH-Wert-Messung

| pH-Wert (M \pm SD) | BF-Pro n = 9 | BF-Pla n = 10 | FF-Pro n = 7 | FF-Pla n = 9 | REF n = 7 | Sign. |
|----------------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------|
| V3 | $5,85 \pm 0,58$ | $5,44 \pm 0,33$ | $6,48 \pm 0,89$ | $6,66 \pm 0,48$ | $5,42 \pm 0,80$ | ** |
| V5 | $5,00 \pm 0,29$ | $5,57 \pm 0,88$ | $6,56 \pm 0,64$ | $6,33 \pm 0,68$ | $4,95 \pm 0,44$ | *** |

M = Mean (Mittelwert), SD = Standard Deviation (Standardabweichung)

Die durchschnittlichen pH-Werte der gestillten Probanden sind niedriger als bei den formulaernährten Kindern, sowohl an Visite 3 als auch an Visite 5.

Dabei wurde zur Visite 3 in der FF-Pla-Gruppe der höchste Stuhl-pH-Wert von $6,66 \pm 0,48$ ermittelt. Leicht niedriger ist der pH-Wert in der *B. lactis*-supplementierten Formulagruppe ($6,48 \pm 0,89$). Die pH-Werte in den Studienstillgruppen sind deutlich niedriger (BF-Pro $5,85 \pm 0,58$ und BF-Pla $5,44 \pm 0,33$), den niedrigsten pH-Wert weist jedoch die Referenzgruppe mit $5,42 \pm 0,80$ auf. Die Verteilung der pH-Werte über die Gruppen an Visite 3 nach Analyse mittels Kruskal-Wallis-Test ist nicht identisch ($p = 0,001$). Zur Lokalisierung der statistischen Unterschiede wurden anschließend paarweise Vergleiche (Post-Hoc-Tests) durchgeführt. Ein

signifikanter Unterschied besteht dabei zwischen der formulaernährten Placebogruppe und der Referenzgruppe ($p = 0,023$), sowie zwischen der formulaernährten Placebogruppe und der gestillten Placebogruppe ($p = 0,003$). Alle anderen Gruppen sind statistisch nicht voneinander verschieden.

Nach viermonatiger Studienphase ist der Unterschied zwischen den Gruppen noch deutlicher ($p = 0,000$). Der durchschnittliche pH-Wert der Referenzgruppe ist dabei weiterhin der niedrigste mit $4,95 \pm 0,44$, was einer deutlichen Absenkung im Vergleich zu V3 entspricht. Vergleichbar damit ist der pH-Wert der gestillten Probiotik-Gruppe (BF-Pro $5,00 \pm 0,29$). Die höchsten pH-Werte sind entsprechend in den Formulagruppen gemessen worden (FF-Pro $6,56 \pm 0,64$ und FF-Pla $6,33 \pm 0,68$).

Auch hier wurden paarweise Vergleiche durchgeführt. Dabei ergaben sich die signifikanten Unterschiede jeweils für die Referenzgruppe im Vergleich mit beiden Formulagruppen (FF-Pro vs. REF: $p = 0,008$ (**)) und FF-Pla vs. REF: $p = 0,013$ (*)), als auch für die *B. lactis*-supplementierte Stillgruppe (BF-Pro) mit beiden Formulagruppen (BF-Pro vs. FF-Pro: $p = 0,007$ (**)) und BF-Pro vs. FF-Pla: $p = 0,012$ (*)).

Zur Verdeutlichung der Effekte zwischen den Gruppen und den Zeitpunkten sind die Ergebnisse in Abbildung 3.6 dargestellt:

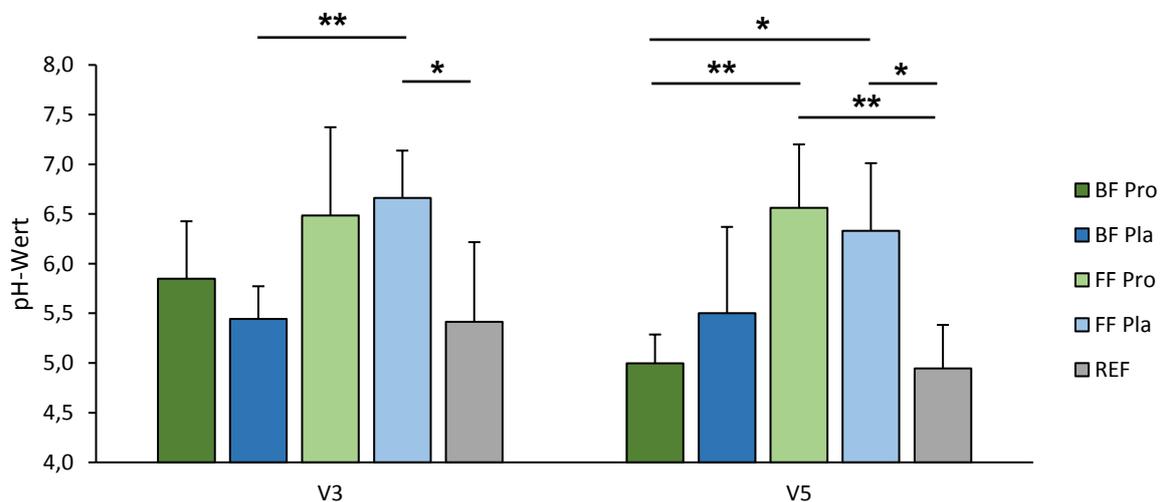


Abb. 3.6: Stuhlproben-pH-Werte zu den Visiten 3 und 5

Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen pH-Werte der an Visite 3 (1 Monat) und 5 (4 Monate) eingesammelten Stuhlproben. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt. Die vier Behandlungsgruppen sowie die Referenzgruppe sind insgesamt hinsichtlich ihrer pH-Werte statistisch voneinander verschieden. Die entsprechenden Signifikanzen sind als * in der Grafik abgebildet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Ein Effekt der Probiotikaeinnahme zwischen den korrespondierenden Ernährungsgruppen ist statistisch nicht signifikant (BF-Pro vs. BF-Pla sowie FF-Pro vs. FF-Pla: $p = 1,000$). Dennoch zeigt sich eine deutliche Absenkung des pH-Wertes im Verlauf der Zeit in der *B. lactis*-supplementierten Stillgruppe (BF-Pro). Der Unterschied der pH-Werte in dieser Gruppe ist zwischen Visite 3 ($5,85 \pm 0,58$) und Visite 5 ($5,00 \pm 0,29$) bei Anwendung des Wilcoxon-Tests für verbundene Stichproben signifikant ($p = 0,015$). Dieser Effekt der pH-Wert-Reduktion ist in diesem Maß in keiner der weiteren Studiengruppen nachweisbar. Für die Referenzgruppe ergibt sich ein statistischer Trend für den Unterschied zwischen den Werten an Visite 3 und Visite 5 ($p = 0,091$). Auch hier reduziert sich der pH-Wert im Verlauf der ersten vier Lebensmonate.

Um den Einfluss des Stillens und der Probiotikaeinnahme auf die pH-Wert-Reduktion sowie den Effekt der intraindividuellen Unterschiede in den einzelnen Gruppen zu verdeutlichen, wurden die einzelnen Probanden der Behandlungs- und Referenzgruppen hinsichtlich ihrer pH-Werte grafisch in Abbildung 3.7 dargestellt.

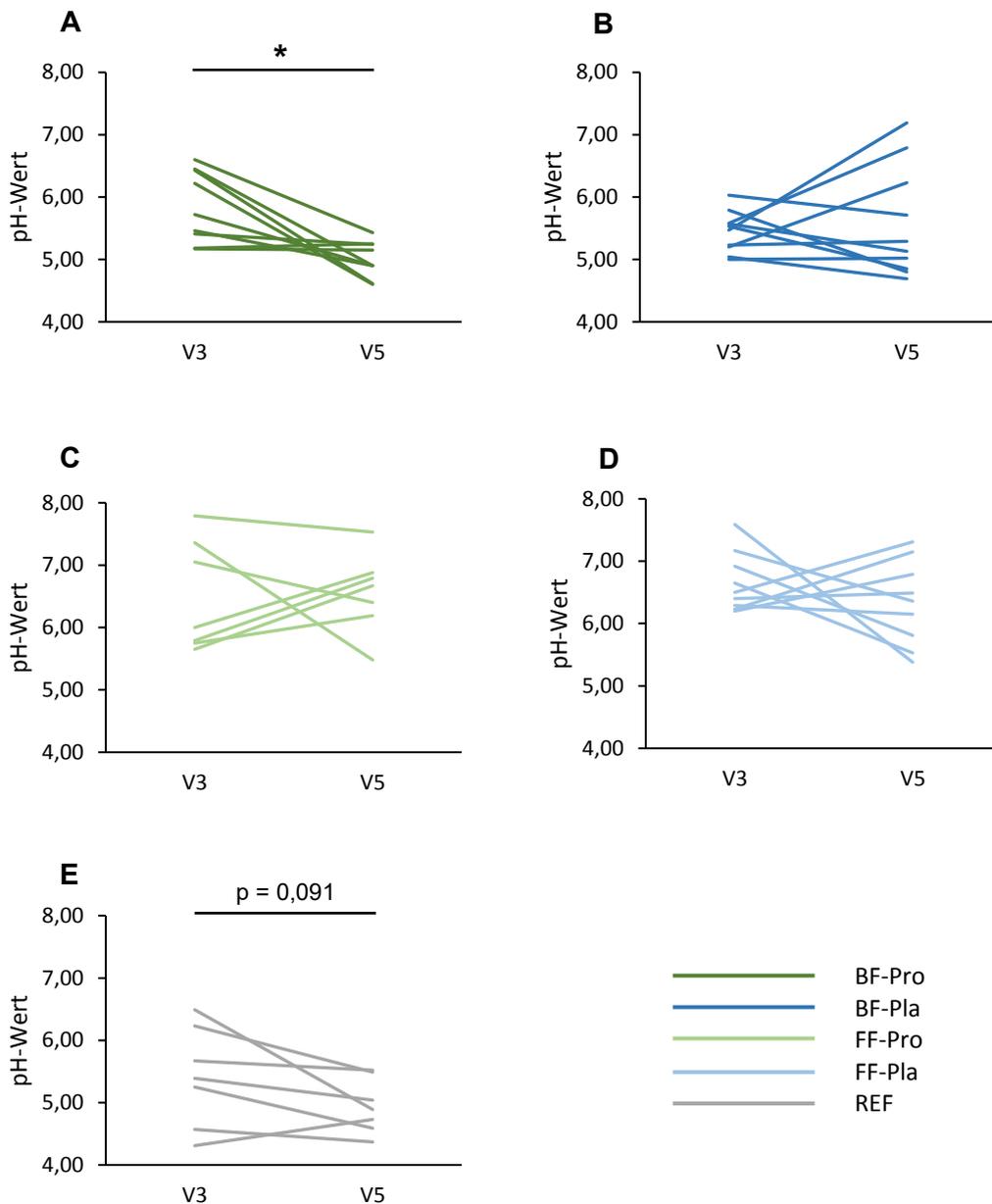


Abb. 3.7: Separierte Darstellung der zeitlichen pH-Wert-Verläufe der Probanden

Dargestellt sind für die einzelnen Probanden die jeweiligen pH-Wert-Verläufe in den Behandlungsgruppen BF-Pro (A), BF-Pla (B), FF-Pro (C), FF-Pla (D) und der Referenzgruppe REF (E) von V3 (1 Monat) zu V5 (4 Monate). Die entsprechende Signifikanz ist als * in der Grafik abgebildet (* $p < 0,05$).

Im Vergleich der Stillgruppen miteinander zeigt sich deutlich, dass in der *B. lactis*-Stillgruppe (A) die pH-Werte der einzelnen Probanden an V3 einer größeren individuellen Schwankungsbreite unterliegen (Minimum 5,17 bis Maximum 6,60), was sich auch in der größeren Standardabweichung erkennen lässt. Dennoch zeigt sich bei fast allen Probanden eine deutliche Senkung des pH-Wertes im Verlauf bis V5. In der Stillgruppe mit Placebo-Supplementierung (B) ergibt sich nach 4 Monaten eine deutlich größere Spannbreite an pH-Werten und eine größere Anzahl von Probanden mit steigendem pH-Wert.

Innerhalb der Formulagruppen (C und D) sind die Probandenunterschiede deutlich divergenter. Sowohl pH-Wert-Senkungen als auch -Steigerungen lassen sich gleichermaßen feststellen, wobei kein einheitlicher Trend feststellbar ist und die Spannbreiten sowohl an V3 als auch an V5 größer ausfallen als in der BF-Pro-Gruppe.

In der Referenzgruppe (E) zeigt sich im zeitlichen Verlauf eine Senkung und Angleichung des pH-Wertes. Bei fast allen Probanden kommt es zu einer Reduktion des pH-Wertes um durchschnittlich 0,6 Einheiten.

Zusammenfassend lassen sich pH-Wert-Änderungen sowohl hinsichtlich der errechneten Mittelwerte als auch grafisch anhand der einzelnen Probandendaten nur für die *B. lactis*-supplementierte Stillgruppe (BF-Pro) und die Referenzgruppe (REF) nachweisen.

3.5.2 Sekretorisches Immunglobulin A

Die Ergebnisse der Stuhlprobenauswertung bezüglich der Konzentrationen des sekretorischen Immunglobulin A (sIgA) sind in Tabelle 3.6 dargestellt:

Tab. 3.6: Ergebnisse der sIgA-Messung

| sIgA in mg/ml (M ± SD) | BF-Pro n = 9 | BF-Pla n = 10 | FF-Pro n = 7 | FF-Pla n = 9 | REF n = 7 | Sign. |
|------------------------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|--------------|-------|
| V3 | 28,4 ± 10,8 | 23,6 ± 9,6 | 5,1 ± 4,3 | 3,0 ± 1,9 | 22,0 ± 7,2 | *** |
| V5 | 27,4 ± 20,0 | 14,2 ± 8,8 | 4,4 ± 2,2 | 4,0 ± 3,6 | 11,9 ± 8,2 | *** |

M = Mean (Mittelwert), SD = Standard Deviation (Standardabweichung)

Zur Visite 3 sind die sIgA-Werte in den Gruppen mit gestillten Probanden deutlich höher. Dabei ist die Stuhlkonzentration in der *B. lactis*-Stillgruppe (BF-Pro) mit durchschnittlich 28,4 mg/ml am höchsten. Den niedrigsten Gehalt an sIgA mit 3,0 ± 1,9 mg/ml ließ sich für die Formula-Placebo-Gruppe (FF-Pla) ermitteln. Die Verteilung der sIgA-Werte über die Gruppen an V3 nach Analyse mittels Kruskal-Wallis-Test ist nicht identisch (p = 0,000). Zur Lokalisierung der statistischen Unterschiede wurden paarweise Vergleiche (Post-Hoc-Tests) durchgeführt. Diese ergaben, dass die Formulagruppen verglichen mit den jeweiligen Stillgruppen nicht identisch sind (FF-Pla vs. BF-Pro, BF-Pla und REF: p < 0,05 sowie FF-Pro vs. BF-Pro und BF-Pla: p < 0,05).

Die sIgA-Werte der *B. lactis*-supplementierten Stillgruppe (BF-Pro) liegen durchschnittlich um 29 % über den Werten der Referenzgruppe und um 20 % über den Werten der entsprechenden

Placebo-Stillgruppe (BF-Pla). Dieser Unterschied innerhalb der Stillgruppen ist jedoch statistisch nicht signifikant (BF-Pro vs. BF-Pla, BF-Pro vs. REF und BF-Pla vs. REF: $p = 1,000$). Gleiches gilt für den Vergleich der Formulagruppen untereinander (FF-Pro vs. FF-Pla: $p = 1,000$).

Vergleichbar mit den Ergebnissen zu Visite 3 bleiben die slgA-Werte an Visite 5 in den Stillgruppen deutlich über den der Formulagruppen. Die Verteilung über die Gruppen ist nach statistischer Auswertung ebenfalls hoch signifikant ($p = 0,000$) verschieden und liegt nach Anwendung der paarweisen Vergleiche in den Parameterunterschieden der *B. lactis*-Stillgruppe mit den Formulagruppen begründet (BF-Pro vs. FF-Pro: $p = 0,005$ und BF-Pro vs. FF-Pla: $p = 0,000$).

In der Referenzgruppe zeigt sich ein deutliches Absinken der slgA-Konzentration um rund 46 % im Verlauf der Zeit ($22,0 \pm 7,2$ mg/ml an V3 vs. $11,9 \pm 8,2$ mg/ml an V5). Der Unterschied ist nach Anwendung des Wilcoxon-Tests für verbundene Stichproben signifikant ($p = 0,018$). Eine vergleichbare Reduktion von ca. 40 % ist in der BF-Pla-Gruppe erkennbar ($23,6 \pm 9,6$ mg/ml an V3 vs. $14,2 \pm 8,8$ mg/ml an V5). Der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant ($p = 0,114$). Demgegenüber steht jedoch eine gleichbleibend hohe slgA-Konzentration von $28,4 \pm 10,8$ mg/ml (V3) vs. $27,4 \pm 20,0$ mg/ml (V5) in der *B. lactis*-supplementierten Stillgruppe (BF-Pro). In den Formulagruppen lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den slgA-Konzentrationen der unterschiedlichen Zeitpunkte feststellen.

Aufgrund der hohen interindividuellen Unterschiede der Probanden innerhalb einer Gruppe, die sich durch vergleichsweise hohe Standardabweichungen vom Mittelwert erkennen lassen, erfolgte die grafische Auswertung der Daten mittels Darstellung über Boxplots, die sowohl die Mediane als auch den Interquartilsbereich (Spannbreite der Daten zwischen 25 % und 75 %) und die Ausreißer erkennbar machen.

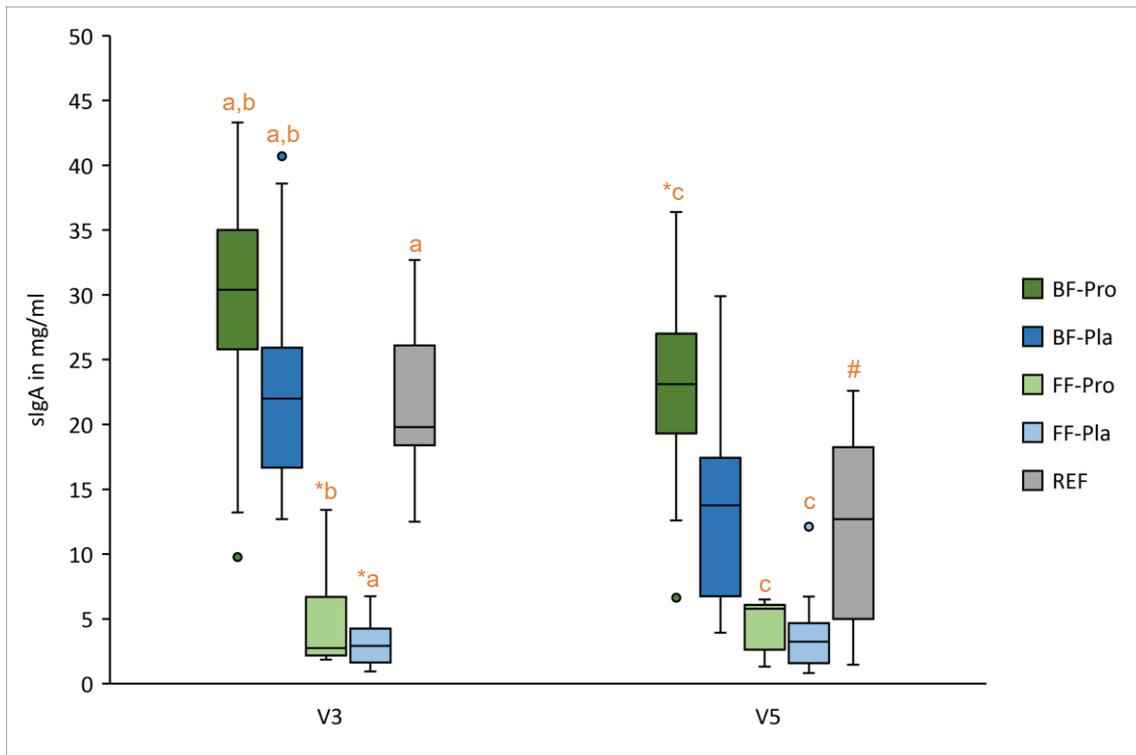


Abb. 3.8: Konzentrationen an sekretorischem Immunglobulin A zu den Visiten 3 und 5

Dargestellt sind die Interquartilsbereiche der gemessenen fäkalen sIgA-Werte an V3 (1 Monat) und V5 (4 Monate). Die Spannweiten der Minimal- bzw. Maximalwerte sind als Antennen dargestellt. Die Ausreißerwerte sind als Punkte außerhalb markiert. Für die Gruppe BF-Pro ist der Ausreißerwert an V5 nicht dargestellt (75,9 mg/ml).

*a, *b, *c sind jeweils signifikant verschieden von a, b, c ($p < 0,05$), # zeigt den signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) der verbundenen Stichproben zwischen V3 und V5.

Die Boxplot-Grafik zeigt unterschiedliche Verteilungen der einzelnen Gruppen zu den zwei Untersuchungszeitpunkten V3 und V5. Die Stillgruppen (BF-Pro, BF-Pla und REF) besitzen deutlich größere Interquartilsbereiche als die Formulagruppen (FF-Pro und FF-Pla). Die Mediane der gestillten Placebo-Gruppe (BF-Pla) und der Referenzgruppe (REF) sind zu beiden Zeitpunkten ähnlich zu den in Tabelle 3.6 aufgeführten Mittelwerte. Vergleichsweise höher liegt dabei sowohl der Median, als auch der Interquartilsbereich, also die Menge der mittleren 50 % der Daten, der gestillten *B. lactis*-Gruppe (BF-Pro). Dieser Effekt ist zur Visite 5 noch deutlicher erkennbar als an Visite 3. Der nicht signifikante Unterschied liegt in den restlichen Daten mit großer Streubreite begründet.

Die Kastengrafiken der Formulagruppen lassen erkennen, dass die Medianwerte an Visite 3 fast identisch sind (FF-Pro 2,8 mg/ml vs. FF-Pla 2,9 mg/ml), der Median der *B. lactis*-Gruppe zur Visite 5 hingegen fast doppelt über dem Median der korrespondierenden Placebo-Gruppe liegt (FF-Pro 5,8 mg/ml vs. FF-Pla 3,2 mg/ml). Dieser Effekt liegt darin begründet, dass in der FF-Pro-Gruppe mehr als die Hälfte (57 %) der Probanden Werte von über 5 mg/ml erreichen, in der FF-Pla-Gruppe hingegen nur 22 % der Probanden diesen Wert übersteigen. Der Median

stellt hinsichtlich der großen Gruppenschwankungen einen genaueren Vergleichsparameter dar.

3.5.3 Alpha-1-Antitrypsin

Die Ergebnisse der Stuhlprobenauswertung bezüglich der Konzentrationen von Alpha-1-Antitrypsin (α 1-AT) sind in Tabelle 3.7 dargestellt:

Tab. 3.7: Ergebnisse der α 1-AT-Messung

| α 1-AT in mg/dl (M \pm SD) | BF-Pro n = 9 | BF-Pla n = 10 | FF-Pro n = 7 | FF-Pla n = 9 | REF n = 7 | Sign. |
|---|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|--------------------|-------|
| V3 | 25,8 \pm 18,9 | 24,2 \pm 14,8 | 155,2 \pm 165,1 | 431,8 \pm 553,6 | 12,1 \pm 10,2 | *** |
| V5 | 53,0 \pm 58,4 | 30,5 \pm 39,1 | 585,4 \pm 557,0 | 435,6 \pm 268,8 | 22,1 \pm 12,7 | *** |

M = Mean (Mittelwert), SD = Standard Deviation (Standardabweichung)

Zur Visite 3 wurde die niedrigste durchschnittliche α 1-AT-Konzentration in der Referenzgruppe mit $12,1 \pm 10,2$ mg/dl ermittelt. Doppelt so hohe Werte wurden in den Studienstillgruppen (BF-Pro $25,8 \pm 18,9$ mg/dl sowie BF-Pla $24,2 \pm 14,8$ mg/dl) gemessen, wohingegen die höchste Konzentration in der formulaernährten Placebogruppe (FF-Pla) mit $431,8 \pm 553,6$ mg/dl analysiert wurde. Die Verteilung der Gruppenparameter ist nicht identisch ($p = 0,000$). Der Unterschied liegt ausschließlich in der vergleichsweise sehr hohen Konzentration der FF-Pla-Gruppe im Vergleich mit den Stillgruppen begründet (FF-Pla vs. BF-Pro: $p = 0,008$ (**); FF-Pla vs. BF-Pla: $p = 0,012$ (*) und FF-Pla vs. REF: $p = 0,000$ (***)).

Nach viermonatiger Studienzeit ist in allen Gruppen ein Anstieg der α 1-Antitrypsin-Konzentrationen erkennbar. Auffallend dabei sind die jeweils rund doppelt so hohen Werte in der Referenz- und gestillten *B. lactis*-Gruppe und eine ca. 3,7-fache Konzentrationserhöhung in der formulaernährten *B. lactis*-Gruppe (FF-Pro). Dieser Unterschied zwischen den Zeitpunkten ist nach Anwendung des statistischen Tests für verbundene Stichproben für die Referenzgruppe ($p = 0,043$) und für die FF-Pro-Gruppe ($p = 0,018$) statistisch signifikant.

Nur leichte Konzentrationsanstiege ließen sich in den durchschnittlichen fäkalen α 1-AT-Mengen für die Placebo-supplementierten Gruppen (BF-Pla und FF-Pla) ermitteln.

Um die Unterschiede der Zeitpunkte und zwischen den einzelnen Gruppen grafisch zu veranschaulichen, wurden diese in folgender Boxplot-Abbildung dargestellt:

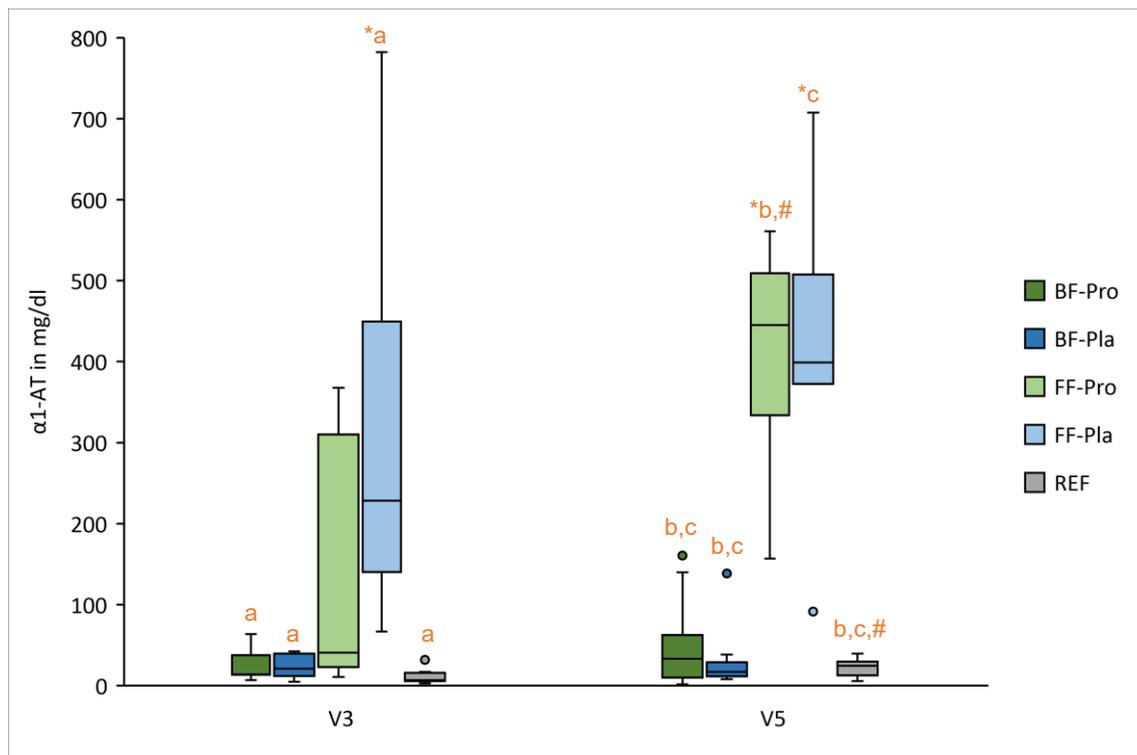


Abb. 3.9: Alpha-1-Antitrypsin-Konzentrationen zu den Visiten 3 und 5

Dargestellt sind die Interquartilsbereiche der gemessenen fäkalen α 1-AT-Werte an V3 (1 Monat) und V5 (4 Monate). Die Spannweiten der Minimal- bzw. Maximalwerte sind als Antennen dargestellt. Die Ausreißerwerte sind als Punkte außerhalb markiert und für Werte über 800 mg/dl nicht abgebildet (FF-Pro V5: 1810,0; FF-Pla V3: 1778,3; FF-Pla V5: 942,8). Die fünf Gruppen sind statistisch voneinander verschieden, jedoch nicht hinsichtlich der korrespondierenden Ernährungsgruppen (jeweils Pro vs. Pla im Vergleich).

*a, *b, *c sind jeweils signifikant verschieden von a, b, c ($p < 0,05$), # zeigt den signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) der verbundenen Stichproben zwischen V3 und V5

In Abbildung 3.9 werden die hohen Standardabweichungen vor allem in den Formulargruppen deutlich. Die interindividuellen Unterschiede sind in diesen Gruppen sehr hoch, was sich anhand der Spannweiten (Bereich zwischen Minimum und Maximum) darstellen lässt:

- FF-Pro: Spannweiten von 357,2 (V3) bis 1653,0 (V5)
- FF-Pla: Spannweiten von 1711,5 (V3) bis 851,4 (V5)

Dies zeigt, dass es in diesen Gruppen Probanden mit sehr geringen und Probanden mit sehr hohen Konzentrationen an α 1-AT gab. Im Vergleich dazu sind die individuellen Schwankungen in den Stillgruppen hinsichtlich der α 1-AT-Konzentrationen relativ stabil.

Für die Gruppenvergleiche an Visite 5 lässt sich weiterhin feststellen, dass die Verteilung der α 1-AT-Konzentrationen nicht identisch ist ($p = 0,000$). Die paarweise Vergleichsanalyse ergab dabei die Lokalisierung des statistischen Unterschiedes zwischen den Stillgruppen und den Formulargruppen (BF-Pro vs. FF-Pro und FF-Pla: $p < 0,05$ (*); BF-Pla vs. FF-Pro und FF-Pla: $p < 0,01$ (**); REF vs. FF-Pro und FF-Pla: $p < 0,01$ (**)). Zwischen den einzelnen Still- bzw.

Formulargruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der α 1-AT-Konzentrationen.

3.5.4 Calprotectin

Die Ergebnisse der Stuhlprobenauswertung bezüglich der fäkalen Calprotectinkonzentrationen sind in Tabelle 3.8 dargestellt:

Tab. 3.8: Ergebnisse der Calprotectin-Messung

| Calprotectin in $\mu\text{g/ml}$ (M \pm SD) | BF-Pro n = 9 | BF-Pla n = 10 | FF-Pro n = 7 | FF-Pla n = 9 | REF n = 7 | Sign. |
|---|----------------------|----------------------|------------------------|----------------------|----------------------|-------|
| V3 | 245,5 \pm 135,0 | 269,7 \pm 109,7 | 1240,8 \pm 1553,8 | 712,3 \pm 653,7 | 197,1 \pm 112,9 | n.s. |
| V5 | 368,0 \pm 302,0 | 212,0 \pm 135,3 | 758,9 \pm 654,5 | 319,3 \pm 142,3 | 220,4 \pm 227,8 | * |

M = Mean (Mittelwert), SD = Standard Deviation (Standardabweichung), n.s. = nicht signifikant

Zur Visite 3 ergab sich die geringste Calprotectinkonzentration in der Referenzgruppe mit durchschnittlich $197,1 \pm 112,9 \mu\text{g/ml}$. Die höchste Konzentration wurde in der *B. lactis*-supplementierten Formulargruppe (FF-Pro) mit $1240,8 \pm 1553,8 \mu\text{g/ml}$ ermittelt. Die hohe Standardabweichung zeigt bereits, dass in dieser Gruppe eine deutliche Schwankungsbreite an gemessenen Konzentrationen existiert, da zwei Probanden sehr hohe Calprotectinkonzentrationen ($3049,9 \mu\text{g/ml}$ und $3910,2 \mu\text{g/ml}$) aufwiesen im Vergleich zum restlichen Gruppenschnitt ($\bar{\emptyset} 345,1 \mu\text{g/ml}$). Die Auswertung erfolgte daher anhand der grafisch besser darstellbaren Median- und Interquartilsberechnung (Abb. 3.10):

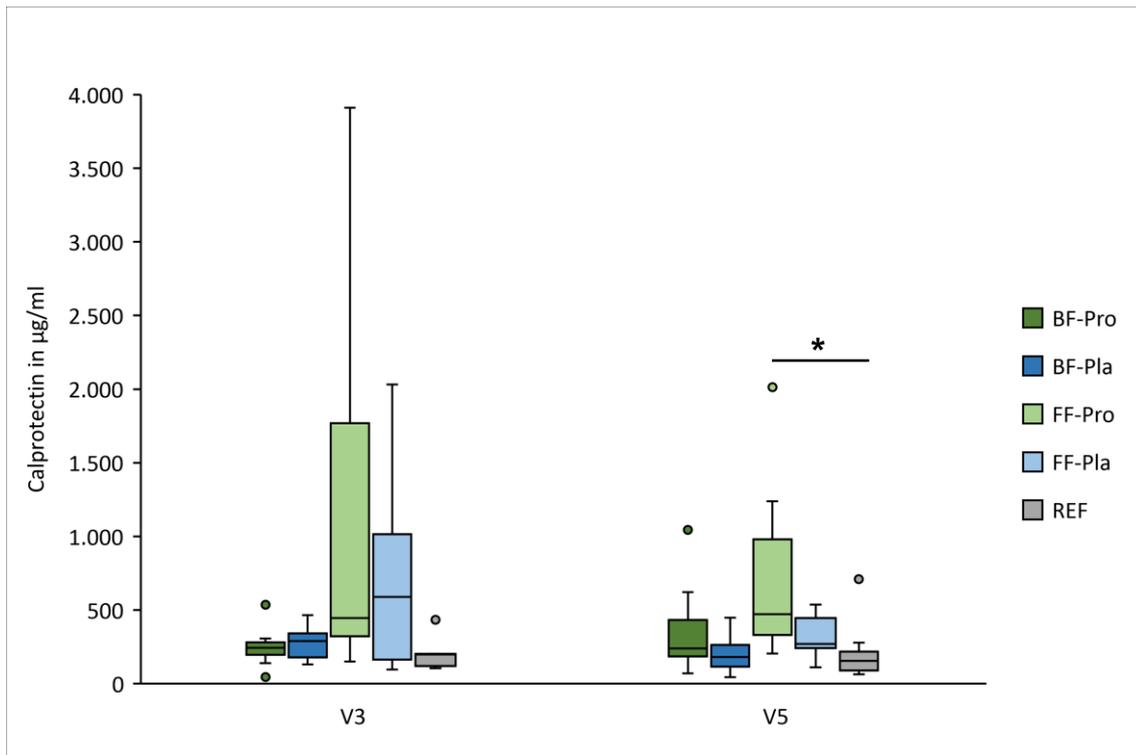


Abb. 3.10: Calprotectinkonzentrationen zu den Visiten 3 und 5

Dargestellt sind die Interquartilsbereiche der gemessenen fäkalen Calprotectinwerte an V3 (1 Monat) und V5 (4 Monate). Die Spannweiten der Minimal- bzw. Maximalwerte sind als Antennen dargestellt. Die Ausreißerwerte sind als Punkte außerhalb markiert. Die fünf Gruppen sind statistisch nur an V5 voneinander verschieden, jedoch nicht hinsichtlich der korrespondierenden Ernährungsgruppen (jeweils Pro vs. Pla im Vergleich). Die entsprechende Signifikanz ist als * in der Grafik abgebildet (* $p < 0,05$).

In dieser Abbildung wird darstellbar, dass an Visite 3 der Median der FF-Pro-Gruppe mit einem Wert von 446,5 µg/ml im vergleichbaren Bereich mit den anderen Studiengruppen liegt. Der Median der FF-Pla-Gruppe ist mit 588,3 µg/ml etwas höher, wohingegen die Stillgruppen die geringsten Medianwerte aufweisen (BF-Pro 244,6 µg/ml, BF-Pla 288,5 µg/ml und REF 197,5 µg/ml). Der Unterschied zwischen den Gruppen ist dabei statistisch nicht signifikant, auch wenn ein Trend erkennbar ist ($p = 0,074$).

Zur Visite 5 zeigt sich deutlich, dass der Interquartilsbereich der FF-Pro-Gruppe aufgrund der geringeren Streubreite der Einzeldaten kleiner wird. Damit wird auch die Standardabweichung geringer, wenngleich diese verhältnismäßig hoch bleibt. Die biologische Diversität ist in allen Gruppen erkennbar und einzelne Ausreißerwerte der BF-Pro-, FF-Pro- und der REF-Gruppe liegen deutlich über den Durchschnittsbereichen. Der Median der Referenzgruppe ist mit 154,4 µg/ml weiterhin der niedrigste und ähnlich dem der BF-Pla-Gruppe (181,4 µg/ml). Die Gruppen BF-Pro und FF-Pla zeigen vergleichbare Konzentrationen (240,1 µg/ml bzw. 270,0 µg/ml). Der höchste Wert ergab sich für die formulaernährte *B. lactis*-Gruppe (FF-Pro) mit 472,5 µg/ml, darin liegt auch die nicht identische Verteilung der Gruppen begründet ($p = 0,032$), denn einzig der paarweise Vergleich zwischen der Referenzgruppe und der FF-Pro-Gruppe ergab einen signifikanten Unterschied ($p = 0,046$). Die Verteilung der

anderen vier Gruppen ist demnach nicht verschieden. Auch hinsichtlich des zeitlichen Verlaufes ergab sich für keine Gruppe ein signifikanter Unterschied zwischen den Visiten 3 und 5 ($p > 0,05$).

3.6 Erkrankungsinzidenz

Anhand der von den Müttern bzw. Eltern der Probanden ausgefüllten Tagebücher (Studiengruppen) bzw. Dokumentationsbögen zu Erkrankungen und Medikamenteneinnahme (Referenzgruppe), wurden die Erkrankungen im Folgenden analysiert.

3.6.1 Zusammenfassung und Einteilung der aufgetretenen Erkrankungen

Aufgrund der in den ersten vier Lebensmonaten geringen Prävalenzen wurden für diese Dissertation die Erkrankungen in folgende Gruppen zusammengefasst:

- Respiratorische Erkrankungen: alle Erkrankungen bzw. Beschwerden der oberen und unteren Atemwege, deren Symptome länger als 24 h anhielten (Husten, Schnupfen, Halsinfektionen, Bronchitis, allgemeine Erkältungsbeschwerden, grippale Infekte, RSV-Infektionen)
- Behandelte Blähungen/Koliken: Aufgrund der stark unterschiedlichen subjektiven Wahrnehmung von Blähungen und Verdauungsbeschwerden als Ursache von Koliken bzw. der klinischen Ausprägung wurden Blähungen bzw. Koliken für diese Dissertation nur dann als solche bewertet, wenn eine medikamentöse Behandlung des Kindes mit einem oder mehreren Präparaten zur Abschwächung der Beschwerden eingesetzt wurde.
- Augeninfektionen: diagnostizierte Konjunktivitis oder unspezifische Augeninfektionen
- Hautinfektionen im Windelbereich: Windeldermatitis und/oder Windelsoor bzw. wunde, behandelte Hautstellen im Windelbereich
- Fieber: alle fieberhaften Infekte (ausgenommen kurzfristige Fieberepisoden als definierte und alleinige Impfreaktion, da dies keiner Infektion als solcher entspricht sondern als normale Nebenwirkung einzuschätzen ist)
- Durchfall: wässrige Stühle, die bedeutend von der normalen Konsistenz in Häufigkeit und/oder Menge abweichen (ausgenommen wurden Durchfallerkrankungen als Nebenwirkungen aufgrund von Antibiotikaeinnahmen (der stillenden Mutter oder des Probanden selbst) oder Impfungen, wenn sonst keinerlei weitere klinische Symptomatik ersichtlich war)

Die Inzidenzen der Erkrankungen Fieber und Durchfall wurden aufgrund der geringen Fallzahlen (3 bzw. 4 bei insgesamt 49 Probanden in 5 Gruppen) nicht explizit ausgewertet.

Weitere unerwünschte Erkrankungen, die innerhalb der Gesamtpopulation auftraten, wurden ebenfalls aufgrund der geringen Inzidenzen (≤ 4 Fälle) nicht ausgewertet (Atopische Dermatitis, Erbrechen, Hypothyreose, Neugeborenenakne, Neugeborenenengelbsucht, Obstipation, Virusexanthem, Zyste im Mund).

3.6.2 Erkrankungsinzidenzen der ersten vier Lebensmonate

Die analysierten Erkrankungsinzidenzen sind in Tabelle 3.9 dargestellt. Dabei wurde auch ausgewertet, bei wie vielen Probanden keinerlei unerwünschte Ereignisse im Sinne der oben definierten Erkrankungen auftraten und somit die ersten vier Lebensmonate als infektionsfrei gewertet werden können. Aufgrund der Mehrfachtestung der Gruppen untereinander mittels des exakten Tests nach Fisher erfolgte eine Adjustierung des Signifikanzniveaus zur Vermeidung systematischer Fehlerakkumulationen. Da für jeden Gruppenvergleich fünf Merkmalsvergleiche erfolgten, wurde der p-Wert auf 0,01 (0,05 : 5 Testungen) angepasst.

Tab. 3.9: Erkrankungsinzidenz der ersten vier Lebensmonate

| | BF-Pro n = 10 | BF-Pla n = 13 | FF-Pro n = 9 | FF-Pla n = 9 | REF n = 8 | Signifikanz |
|-----------------------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|--------------|-------------|
| Respiratorische Erkrankungen | 2 (20) | 6 (46) | 4 (44) | 4 (44) | 3 (38) | n.s. |
| Blähungen/Koliken | 4 (40) | 8 (62)* | 3 (33) | 7 (78)* | 0 (0)* | * |
| Augeninfektionen | 2 (20) | 3 (23) | 1 (11) | 2 (22) | 2 (25) | n.s. |
| Hauterkrankungen (Windelbereich) | 0 (0) | 2 (15) | 0 (0) | 2 (22) | 1 (13) | n.s. |
| Keinerlei unerwünschte Ereignisse | 5 (50) | 2 (15) | 3 (33) | 0 (0) | 3 (38) | n.s. |

* p < 0,01 (adjustiert) für REF vs. BF-Pla und REF vs. FF-Pla, n.s. = nicht signifikant

Bezüglich der Inzidenz von respiratorischen Erkrankungen ist deutlich erkennbar, dass in der gestillten *B. lactis*-Gruppe (BF-Pro) nur rund halb so viele Fälle auftraten im Vergleich zu allen anderen Gruppen (20 % vs. 46/44/44/38 %). Der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant ($p > 0,01$).

Ein signifikanter Unterschied ließ sich jedoch in der Inzidenz der behandelten Blähungen bzw. Koliken zwischen den Placebogruppen und der Referenzgruppe ermitteln, da sowohl in der entsprechenden Stillgruppe (BF-Pla), als auch in der Formulagruppe (FF-Pla) mehr als zwei Drittel der Kinder betroffen waren, verglichen mit keinem Probanden in der Referenzgruppe. Der Unterschied ist nach Anwendung des exakten Fisher's Test und p-Wert-Adjustierung

signifikant (BF-Pla vs. REF: $p = 0,007$; FF-Pla vs. REF: $p = 0,002$). Ein Vergleich der Behandlungsgruppen untereinander zeigt, dass sowohl in den Still- als auch in den Formulagruppen deutlich mehr Kinder der Placebointervention an Blähungen und/oder Koliken litten, als die entsprechenden *B. lactis*-behandelten Probanden. Der Unterschied ist in den Formulagruppen größer, jedoch statistisch nicht signifikant (BF-Pro vs. BF-Pla: 40 % vs. 62 %; FF-Pro vs. FF-Pla: 33 % vs. 78 %, $p > 0,01$).

Augeninfektionen treten in jeder Gruppe auf, jedoch sind die Inzidenzen in den einzelnen Gruppen eher gering (11 % bis maximal 25 %) und auch vergleichbar ($p > 0,01$).

Bei den Hauterkrankungen im Windelbereich gab es in den Gruppen BF-Pla sowie FF-Pla jeweils zwei betroffene Probanden, was einer Inzidenz von 15 % bzw. 22 % entspricht, wohingegen keine Probanden in den jeweiligen *B. lactis*-supplementierten Gruppen (BF-Pro und FF-Pro) diese Symptomatik in den ersten vier Lebensmonaten zeigten. In der Referenzgruppe wurde ein Fall an Windelsoor dokumentiert. Der Unterschied ist zwischen den Gruppen jedoch nicht signifikant ($p > 0,01$).

Der Vergleich von erkrankungsfreien Probanden innerhalb der Gruppe (keine unerwünschten Ereignisse in den ersten vier Lebensmonaten) zeigt, dass mit einer Auftretenswahrscheinlichkeit von 50 % in der BF-Pro-Gruppe, diese die meisten gesunden Probanden beinhaltet, gefolgt von der REF-Gruppe mit 38 %. Demgegenüber gibt es keinen Probanden in der FF-Pla-Gruppe, der erkrankungsfrei im Studienzeitraum blieb. Der Unterschied zwischen den Gruppen ist statistisch jedoch nicht signifikant.

3.6.3 Dauer der Atemwegserkrankungen und der behandelten Blähungen/Koliken

Um die in den ersten vier Lebensmonaten am häufigsten auftretenden Erkrankungen (respiratorische Infekte und behandelte Blähungen und/oder Koliken) genauer zu analysieren, wurden sowohl die Inzidenzen als auch die durchschnittlichen Erkrankungstage grafisch ausgewertet:

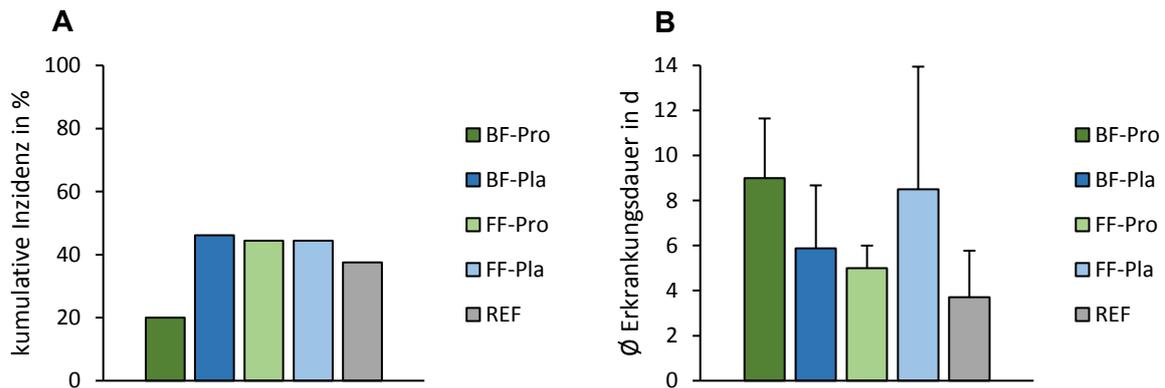


Abb. 3.11: Kumulative Inzidenz und durchschnittliche Erkrankungsdauer der Atemwegserkrankungen

Dargestellt ist die Erkrankungshäufigkeit (A) der Referenz- und Behandlungsgruppen in den ersten vier Lebensmonaten sowie die durchschnittliche Erkrankungsdauer in Tagen (B). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Die rund 50%ige Reduktion der kumulativen Inzidenz der respiratorischen Erkrankungen zwischen der gestillten *B. lactis*-Gruppe (BF-Pro) und allen anderen Gruppen zeigen sich deutlich in der grafischen Darstellung (vgl. Abb. 3.11), wohingegen die Auswertung der durchschnittlichen Erkrankungsdauer zeigt, dass in dieser Gruppe und in der formulaernährten Placebogruppe (FF-Pla) die Infekte durchschnittlich 3 - 4 Tage länger bis zur Genesung andauern. Die kürzeste Erkrankungsdauer zeigte sich in der Referenzgruppe mit durchschnittlich $3,7 \pm 2,1$ Tagen pro Erkrankung. Eine statistische Beurteilung war aufgrund der geringen Fallzahlen nicht möglich, sodass die Auswertung rein deskriptiv erfolgte.

Für die behandelten Blähungen und Koliken ist die analog erfolgte Auswertung in Abb. 3.12 dargestellt:

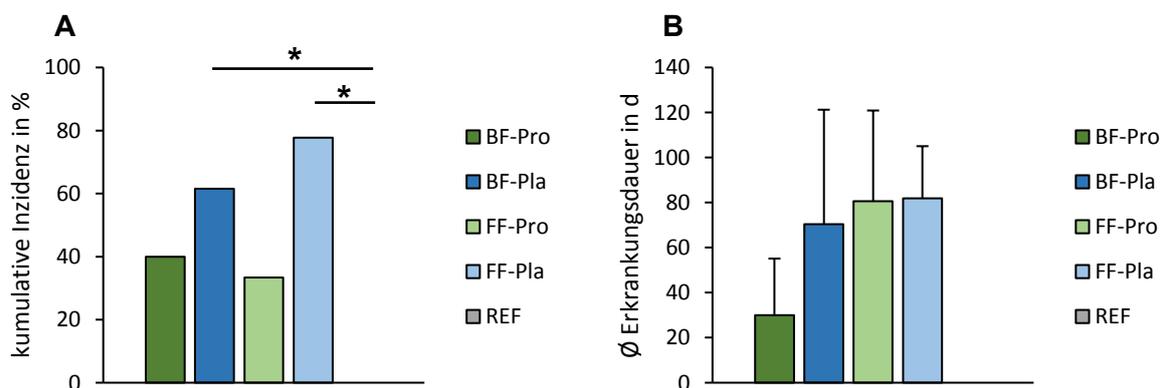


Abb. 3.12: Kumulative Inzidenz und durchschnittliche Erkrankungsdauer der behandelten Blähungen und Koliken

Dargestellt ist die Erkrankungshäufigkeit (A) der Referenz- und Behandlungsgruppen in den ersten vier Lebensmonaten sowie die durchschnittliche Erkrankungsdauer in Tagen (B). Es ergaben sich signifikante Unterschiede in der kumulativen Inzidenz zwischen den Placebogruppen (BF-Pla und FF-Pla) mit der Referenzgruppe. *p < 0,001 (adjustiert)

Dabei zeigt sich die bereits erwähnte Reduktion der kumulativen Inzidenz der *B. lactis*-supplementierten Gruppen im Vergleich mit den jeweiligen korrespondierenden Placebo-supplementierten Ernährungsgruppen deutlich. Bezogen auf die Erkrankungsdauer ist ein deutlicher Effekt in der gestillten *B. lactis*-Gruppe (BF-Pro) erkennbar, da diese mit durchschnittlich $30,0 \pm 25,1$ Tagen die geringste Beschwerdedauer aufwies verglichen mit mehr als doppelt so langen Zeiträumen in den weiteren Gruppen (BF-Pla: $70,4 \pm 50,9$ Tage, FF-Pro: $80,7 \pm 40,2$ Tage, FF-Pla: $81,9 \pm 23,2$ Tage). Ein Unterschied zwischen den formulaernährten Gruppen ist in der Dauer nicht erkennbar. Auch hier erfolgte die Auswertung auf rein deskriptiver Ebene, da eine statistische Analyse aufgrund der geringen Fallzahlen nicht möglich war.

3.7 Korrelationsanalysen

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der unter 3.5.1 bis 3.5.4 analysierten Ergebnisse der Stuhlprobenauswertungen wurden Korrelationsanalysen nach Spearman durchgeführt. Dabei werden Zusammenhänge zwischen den einzelnen Parametern deutlich.

In Tabelle 3.10 sind die signifikanten Korrelationskoeffizienten der Stuhlprobenergebnisse der Visite 3 dargestellt.

Tab. 3.10: Korrelationskoeffizienten r der Stuhlprobenparameter an Visite 3

| V3 (n = 42) | α 1-AT | Calprotectin | pH-Wert |
|---------------|---------------|--------------|-----------|
| slgA | - 0.502** | n.s. | - 0.632** |
| α 1-AT | | 0.581** | 0.482** |

** $p < 0,01$, n.s. = nicht signifikant

Stark negative Zusammenhänge sind zwischen den gemessenen slgA-Werten und den α 1-AT-Werten analysiert worden, d.h. je höher die fäkalen Werte des sekretorischen Immunglobulin A im Stuhl nachweisbar sind, desto geringer sind die α 1-Antitrypsin-Werte ($p = 0,001$). Gleiches gilt für den Zusammenhang zwischen slgA- und pH-Werten ($p = 0,000$). Die Korrelationen sind dabei statistisch hoch signifikant ($p < 0,01$).

Weiterhin sind stark positive Korrelationen ($r = 0.581$) zwischen den α 1-AT-Werten mit den Calprotectinspiegeln ermittelt worden, dieser Zusammenhang ist statistisch hoch signifikant ($p = 0,000$). Eine moderate Korrelation besteht außerdem zwischen den α 1-AT- und den pH-Werten ($r = 0.482$, $p = 0,001$).

Die Korrelationen konnten dabei ebenso für die Proben an Visite 5 nachgewiesen werden und sind in Tabelle 3.11 dargestellt.

Tab. 3.11: Korrelationskoeffizienten r der Stuhlprobenparameter an Visite 5

| V5 (n = 42) | α 1-AT | Calprotectin | pH-Wert |
|---------------|---------------|--------------|-----------|
| slgA | - 0.485** | n.s. | - 0.477** |
| α 1-AT | | 0.531** | 0.660** |

** p < 0,01, n.s. = nicht signifikant

Die an Visite 3 noch stark negativen Korrelationen zwischen slgA und α 1-AT sowie dem pH-Wert sind an Visite 5 leicht abgeschwächt in ihrer Ausprägung ($r > 0.3$). Die Korrelationen bleiben jedoch statistisch hoch signifikant ($p = 0,001$). Im Vergleich dazu steigt der Effekt zwischen α 1-AT und dem pH-Wert an Visite 5 von einem mittleren zu einem starken Effekt.

Zur Untersuchung der Zusammenhänge zwischen den aufgetretenen Erkrankungen sowie der unter Abschnitt 3.2 dargestellten nominalen Baseline-Parameter mit den analysierten Stuhlprobenparametern wurden diese mittels des ETA-Koeffizienten analysiert. Dieses Zusammenhangsmaß gibt dabei keine Signifikanzen an, lässt jedoch Korrelationen zwischen nominalen und metrischen Variablen darstellen. Dabei wurden nur die Korrelationen bewertet, die einen mindestens moderaten Effekt ($r > 0.3$) aufzeigten.

Die Analyse des ETA-Koeffizienten konnte nur wenige Zusammenhänge aufgrund der Stichprobengröße und des explorativen Charakters dieser Studiauswertung aufzeigen.

Ein moderat positiver Zusammenhang konnte zwischen dem Auftreten von Hauterkrankungen im Windelbereich und den gemessenen α 1-AT-Werten an Visite 3 analysiert werden ($r = 0.417$). Des Weiteren ist ein moderater Effekt zwischen dem Vorhandensein von mindestens einem Geschwisterkind im gleichen Haushalt und den Calprotectinwerten, sowohl an Visite 3 als auch an Visite 5 erkennbar ($r = 0.328$ (V3) und $r = 0.357$ (V5)). Der deutlichste moderate Zusammenhang konnte zwischen der Erkrankungsfreiheit (keine unerwünschten Ereignisse in den ersten vier Lebensmonaten) und dem slgA-Spiegel an V5 ermittelt werden ($r = 0.424$).

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Dissertation wurde der Einfluss des probiotischen Bakteriums *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (*B. lactis*) auf fäkale Immun- und Entzündungsmarker sowie auf die Erkrankungsinzidenz von gesunden, reifgeborenen Säuglingen untersucht, die per Kaiserschnitt zur Welt kamen. Dabei wurden Subgruppendaten der ersten vier Lebensmonate der Probanden einer klinischen Studie ausgewertet.

Die Randomisierung der Studienpopulation in Probiotik- und Placebogruppe ergab eine Vergleichbarkeit der Gruppen, da sie hinsichtlich der einzelnen Baseline-Parameter nicht voneinander verschieden sind. Die rekrutierte Referenzgruppe ist ebenfalls kongruent zu den Studiengruppen, da sich außer für den Apgar-Wert nach 5 Minuten keinerlei signifikante Unterschiede ergeben. Dieses von Virginia Apgar 1953 entwickelte standardisierte Bewertungssystem beschreibt dabei fünf wichtige Funktionen 1, 5 und 10 Minuten nach der Geburt (Atmung, Puls, Muskelspannung, Durchblutung der Haut und Reflexe) [103]. Vaginal geborene Kinder erholten sich aufgrund der durchschnittlich höheren 5-Minuten-Apgar-Werte in dieser Studie somit schneller als per Sektio geborene Kinder, die ein größeres Risiko für respiratorische Anpassungsstörungen haben [12]. Dies scheint vor allem aufgrund der Tatsache, dass auch Notsektios in den Studiengruppen vorhanden waren als nachvollziehbar, da der Geburtsstress für diese Kinder deutlich größer ist und eine signifikante Assoziation zwischen operativer Entbindung im Notfall und geringeren Apgar-Werten besteht [104]. Aufgrund der jedoch insgesamt auch in den Kaiserschnittstudiengruppen hohen Apgar-Werten von $9,2 \pm 0,8$ (Probiotik) sowie $9,3 \pm 0,7$ (Placebo) ist eine Beeinflussung der weiteren Ergebnisse als unwahrscheinlich zu bewerten.

Einfluss von *B. lactis* auf den Verlauf der Wachstumsparameter sowie die Nahrungsmittelverträglichkeit

Zur Ermittlung des Einflusses einer *B. lactis*-Supplementation auf die Sicherheitsparameter Wachstum und Nahrungsmittelverträglichkeit wurden die anthropometrischen Daten Körpergewicht, Körperlänge und Kopfumfang sowie die Stuhl- und Spuckhäufigkeit der Probanden zu den jeweilig vorgesehenen Visiten ermittelt und innerhalb der Gruppen miteinander verglichen.

Die in dieser Studie gemessenen Körpergewichte in den ersten vier Lebensmonaten der Probanden zeigen, dass alle vier Studiengruppen unabhängig von der Art der Ernährung oder der Studienproduktsupplementation (*B. lactis* oder Placebo) gleichmäßig an Gewicht zunahmten und nicht voneinander verschieden waren. Auch der physiologische Gewichtsverlust in den ersten Lebenstagen lag mit durchschnittlich $5,4 \pm 2,3$ % im Rahmen

der Empfehlung von höchstens 7 % bei gestillten Neugeborenen [105]. Die Körpergewichte nach vier Lebensmonaten entsprachen mit durchschnittlich $6,9 \pm 1,1$ kg, $6,7 \pm 0,8$ kg, $6,6 \pm 0,7$ kg, $6,4 \pm 0,7$ kg und $6,5 \pm 0,5$ kg (BF-Pro, BF-Pla, FF-Pro, FF-Pla und REF) den Empfehlungen der WHO für gesunde, gestillte Säuglinge, wonach diese im Mittel nach vier Monaten 6,7 kg wiegen [106]. In allen Gruppen konnte eine Gewichtszunahme von mindestens 26,7 g bis maximal 30,7 g pro Tag ermittelt werden, was sich mit der Empfehlung von einer minimalen Zunahme von 20 g täglich in den ersten Lebenswochen deckt [107]. Es ist daher von einer gleichmäßigen Gewichtszunahme pro Tag, unabhängig vom Entbindungsmodus, des Ernährungsregimes und der Probiotikabehandlung auszugehen.

Auch für die Entwicklung des Längenwachstums und der Zunahme der Kopfumfänge konnten sowohl innerhalb der Gruppen als auch im Bezug zu den durchschnittlichen Werten der WHO (63,0 cm Körperlänge und 41,1 cm Kopfumfang im Alter von vier Monaten) keine Unterschiede ermittelt werden [106].

Die Gabe des Probiotikums *B. lactis* ergab somit keine Diskrepanz im Wachstum von gesunden per Kaiserschnitt geborenen Kindern, weder bei formulaernährten noch bei gestillten Probanden. Alle Ergebnisse waren vergleichbar mit der Referenzgruppe aus vaginal geborenen, gestillten Säuglingen, die keinerlei Supplementation erhalten hatten.

Hinsichtlich der Stuhlhäufigkeit konnte gezeigt werden, dass gestillte Säuglinge häufiger Stuhl ausscheiden als formulaernährte Säuglinge. Sowohl in der *B. lactis*-supplementierten Stillgruppe als auch in der Placebo-Stillgruppe konnten Stuhlhäufigkeiten von anfangs $5,9 \pm 1,3$ bzw. $5,4 \pm 2,2$ zur Visite 2 ermittelt werden, die im Verlauf der ersten vier Lebensmonate in der Häufigkeit abnahmen. Ein Unterschied hinsichtlich der Probiotiksupplementation konnte nicht errechnet werden. Die Ergebnisse sind kongruent mit denen der Arbeitsgruppe um Çamurdan *et al.*, die 2015 zeigten, dass gestillte Kinder in den ersten Lebensmonaten signifikant häufiger Stuhl absetzten als formulaernährte Kinder und der Unterschied mit zunehmendem Alter abnimmt [108].

Die Spuckhäufigkeit war innerhalb der Gruppen zu keinem Zeitpunkt voneinander verschieden, sodass insgesamt gezeigt werden konnte, dass weder in den Stillgruppen noch in den Flaschengruppen die Stuhl- oder Spuckfrequenz von der Studienprodukteinnahme beeinflusst wurde.

Die Supplementation des Probiotikums *B. lactis* kann somit zusammenfassend hinsichtlich der Analyse der Wachstumsparameter und der Nahrungsverträglichkeit als sicher bewertet werden, da sich keinerlei Unterschiede in den korrespondierenden Ernährungsgruppen nachweisen ließen und auch im Vergleich mit den Daten der WHO ein normales Wachstum der Probanden erreicht wurde. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit der Studie von Saavedra

et al., die im Jahr 2004 die Verträglichkeit und Sicherheit von zwei Formulanahrungen untersuchten, die unterschiedlich hoch dosierte *B. lactis*- und *S. thermophilus*-Konzentrationen enthielten [94]. Nach einer durchschnittlichen Formulaeinnahme von 210 Tagen konnten keinerlei Unterschiede in der Verträglichkeit, Sicherheit oder im Wachstum festgestellt werden. Auch die Untersuchung von Radke *et al.* zeigte 2017 bei der Verwendung von einer *B. lactis*-supplementierten Formulanahrung keinerlei Unterschiede hinsichtlich der Verträglichkeit und des Wachstums in den ersten zwölf Lebensmonaten zur Kontrollgruppe, sodass diese als sicher bewertet werden konnte [100]. Einzig die Stuhlfrequenz war in der *B. lactis*-Gruppe in den ersten drei Monaten höher als in der Kontrollgruppe, zeigte jedoch dabei nur die Angleichung zur Referenzgruppe aus gestillten Säuglingen. Der Unterschied war nach sechs Lebensmonaten nicht mehr signifikant.

Einfluss von *B. lactis* auf die fäkalen Immun- und Entzündungsmarker

Zur Untersuchung des Einflusses der *B. lactis*-Supplementation auf die fäkalen Immun- und Entzündungsmarker wurden zu zwei Zeitpunkten Stuhlproben der Probanden eingesammelt und analysiert. Dabei fand die Abgabe der ersten Stuhlprobe nach einem Lebensmonat statt (28 ± 3 Tage nach Geburt = V3) und die Zweite nach vier Lebensmonaten (112 ± 7 Tage nach Geburt = V5). Da ausschließlich Proben von Probanden verwendet wurden, die sowohl an V3 als auch an V5 eine ausreichend analysierbare Menge abgegeben hatten, konnten auch zeitliche Bezüge hinsichtlich der Verlaufparameter statistisch ausgewertet und Ergebnisbeeinflussungen aufgrund von unterschiedlichen Startwerten ausgeschlossen werden. Es wurden folgende Parameter analysiert: der pH-Wert, das sekretorische Immunglobulin A, Alpha-1-Antitrypsin und Calprotectin.

pH-Wert

Der pH-Wert von voll gestillten Kindern liegt bei ungefähr 5,0 und damit im sauren Bereich [109]. Aufgrund der geringeren Pufferkapazität der Formulanahrungen verschiebt sich bei nicht gestillten Kindern der pH-Wert in den Bereich des neutralen Milieus, was das Wachstum von potentiellen Pathogenen begünstigt [109]. Die Ernährung von Säuglingen hat einen großen Effekt auf die Darmmikrobiotazusammensetzung, so sind gestillte Säuglinge im Alter von einem Monat hauptsächlich mit Bifidobakterien kolonisiert [45]. Die Arbeitsgruppe um Rinne *et al.* konnte im Jahr 2005 weiterhin zeigen, dass auch im Alter von sechs Monaten formulaernährte Kinder geringere Mengen von Bifidobakterien im Stuhl aufwiesen als voll gestillte Kinder [110].

Bifidobakterien und somit auch das Probiotikum *B. lactis* begünstigen die Ansäuerung des Darmlumens durch Fermentation von unverdaulichen Kohlenhydraten zu kurzkettigen

Fettsäuren und tragen somit zum Schutz des Darm- und Immunsystems bei. Mohan *et al.* veröffentlichten im Jahr 2008 eine placebokontrollierte Studie zur Untersuchung des Effekts einer *B. lactis*-Gabe bei 69 frühgeborenen Kindern. Dabei konnte analysiert werden, dass *B. lactis*-behandelte Säuglinge höhere Acetat- und Lactatkonzentrationen und folglich einen signifikant geringeren pH-Wert aufwiesen [99].

Die Untersuchung der Stuhlproben in der vorliegenden Arbeit bezüglich des pH-Wertes ergab innerhalb der Gruppen, dass die formulaernährten Kinder sowohl in der *B. lactis*- als auch in der Placebo-supplementierten Gruppe zu beiden Untersuchungszeitpunkten (V3 und V5) die höchsten pH-Werte aufwiesen. Diese lagen mit durchschnittlich $6,56 \pm 0,64$ (FF-Pro) und $6,33 \pm 0,68$ (FF-Pla) nach vier Lebensmonaten weiterhin im schwach sauren, fast neutralen Bereich. Der Unterschied dieser Gruppen war dabei hinsichtlich der Referenzgruppe aus vaginal geborenen, voll gestillten Kindern als „Goldstandard“ mit einem durchschnittlichen pH-Wert von 4,95 statistisch signifikant ($p = 0,008$ und $p = 0,013$). Auffällig dabei ist jedoch die Tatsache, dass nach einem Lebensmonat (V3) ausschließlich die Placebo-Formulagruppe statistisch von der Referenzgruppe, als auch von der entsprechenden Stillgruppe (BF-Pla) verschieden ist ($p = 0,023$ und $p = 0,003$), nicht jedoch die *B. lactis*-behandelte Formulagruppe. Diese zeigte zwar im Mittel höhere Konzentrationen, da es jedoch in dieser Gruppe auch Probanden mit deutlich geringeren pH-Werten gab, ist ein statistischer Unterschied zu allen anderen, auch gestillten, Gruppen nicht nachweisbar. Der Einfluss der Probiotikaeinnahme scheint somit die pH-Erhöhung in den formulaernährten Kindern etwas zu verzögern bzw. aufzuhalten. Nach vier Lebensmonaten ist diese Gruppe ebenso wie die Placebo-Formulagruppe statistisch von den Stillgruppen verschieden. Der Einfluss der Ernährung wird im zunehmenden Alter auch aufgrund der steigenden Nahrungsmenge größer, sodass dann die pH-Absenkung durch die Bildung der kurzkettigen Fettsäuren durch die Bifidobakterien nicht mehr ausreicht, um einen statistischen Effekt zu erzielen.

Für die gestillten Kaiserschnittkinder in den Behandlungsgruppen konnten nach einem Lebensmonat Werte von $5,85 \pm 0,58$ (BF-Pro) bzw. $5,44 \pm 0,33$ (BF-Pla) gemessen werden, die sich im zeitlichen Verlauf jedoch gegensätzlich entwickelten. Interessanterweise war der durchschnittliche pH-Wert der gestillten Placebogruppe (BF-Pla) nach einem Lebensmonat der Probanden vergleichbar mit dem der Referenzgruppe (5,44 vs. 5,42), wohingegen die gestillte *B. lactis*-Gruppe einen höheren Wert aufwies (5,85). Nach vier Lebensmonaten jedoch verringerte sich der durchschnittliche pH-Wert dieser Gruppe deutlich auf 5,00 und lag damit im Bereich der Referenzgruppe (4,95). Dieser zeitliche Unterschied innerhalb einer Behandlungsgruppe war nur bei den *B. lactis*-supplementierten, gestillten Probanden signifikant ($p = 0,015$). Die Placebo-Stillgruppe hingegen zeigte keine pH-Wert-Änderung zwischen V3 und V5. Dabei wird in der Einzelbetrachtung der pH-Wert-Verläufe (vgl. Abb. 3.7)

deutlich ersichtlich, dass das Studiendesign hinsichtlich der verbundenen Stichproben wichtig zur Auswertung und Interpretation ist. Da für jeden einzelnen Probanden beide Stuhlprobenauswertungen vorlagen, konnte das genaue Maß des Probiotikeinflusses ermittelt werden. Aufgrund der individuellen Startbedingungen, die bei jedem Säugling verschieden ausgeprägt sind (durch Entbindungsmodus, Laktationsstart, Antibiotikaeinnahme der Mutter usw.), können sich bei unverbundenen Stichproben bzw. unterschiedlichen Stichproben-größen die nachweisbaren Probiotikeffekte aufgrund des Studiendesigns abschwächen. So sind die V3-Werte der Placebo-Stillgruppe scheinbar besser, dennoch erhöht sich im Vergleich zur *B. lactis*-Einnahme der pH-Wert bei deutlich mehr Probanden.

Eine natürliche pH-Wert-Senkung war auch in der Referenzgruppe sichtbar, wenn auch der Unterschied aufgrund der schon geringeren Startwerte an V3 keine Signifikanz, aber einen statistischen Trend zeigte ($p = 0,091$).

Der Einfluss der *B. lactis*-Einnahme auf den pH-Wert und damit auch auf das Darmmilieu zeigt somit besonders bei gestillten Säuglingen nach Kaiserschnittgeburt einen signifikanten Effekt. Das Darmsystem wird in den ersten vier Lebensmonaten deutlich saurer und erreicht vergleichbare Werte zur Referenzgruppe als „Goldstandard“ aus vaginal geborenen, gestillten Kindern. Somit ist ein synergistischer Effekt aus Muttermilchernährung und Probiotikaeinnahme erkennbar, da sich das Stillen per se zwar schon deutlich auf die Ansäuerung des Darmlumens auswirkt, der Einfluss durch zusätzliche Gabe von Bifidobakterien jedoch deutlich verstärkt wird (vgl. BF-Pla vs. BF-Pro).

Es scheint dabei auch einen Unterschied im Geburtsmodus zu geben. Während die Referenzgruppe verglichen mit der Placebo-Stillgruppe (BF-Pla) nach einem Lebensmonat noch ähnliche pH-Werte zeigt, so steigt dieser bei den per Sektio geborenen Kindern im Mittel über den Zeitverlauf bis vier Lebensmonate an, wohingegen bei den spontan geborenen Kindern eine Abnahme über diese Zeit im pH-Wertverlauf erkennbar ist. Der Unterschied ist an Visite 5 zwar nicht signifikant, zeigt aber dennoch einen Trend hinsichtlich des Einflusses der unterschiedlichen Darmbesiedlung in diesen Gruppen. Dieser wird durch die *B. lactis*-Supplementation in der BF-Pro-Gruppe aufgehoben, da sich diese Werte denen der Referenzgruppe deutlich angleichen.

Ein Einfluss auf formulaernährte Kinder bezüglich der pH-Wert-Änderung zwischen dem ersten und vierten Lebensmonat bzw. auch im Vergleich der Formulargruppen untereinander ist nicht erkennbar. Die pH-Werte sind in beiden Gruppen und zu beiden Untersuchungszeitpunkten deutlich erhöht im Vergleich zu den gestillten Probanden und der Referenzgruppe. Dennoch wird eine verzögerte pH-Wert-Erhöhung der *B. lactis*-behandelten Gruppe deutlich, da erst nach vier Lebensmonaten ein statistischer Unterschied zu den Stillgruppen gezeigt werden konnte. Die Ernährungsform hat daher eine wesentliche Wirkung auf die Entwicklung

des Darmmilieus und kann bei nicht gestillten Säuglingen auch durch die Einnahme von probiotischen Bifidobakterien nicht revidiert, sondern maximal leicht verzögert werden. Vergleichbare Ergebnisse konnte die Arbeitsgruppe um Holscher *et al.* 2012 feststellen, die signifikant niedrige pH-Werte in gestillten Probanden verglichen mit formulaernährten ermitteln konnte, jedoch keinen Einfluss einer Bifidobakteriensupplementation auf den pH-Wert von nicht gestillten Säuglingen, unabhängig vom Geburtsmodus, nachweisen konnte [111].

Sekretorisches Immunglobulin A

Das sekretorische Immunglobulin A (sIgA) ist ein Antikörper, der von Plasmazellen in der Lamina propria des darmassoziierten lymphatischen Gewebes produziert und in das Darmlumen sezerniert wird [112]. Dort verhindert es die Adsorption von potentiellen Pathogenen, neutralisiert Toxine und trägt damit zu einer Kontrolle der epithelialen Kolonisation von Mikroorganismen und zum Schutz der mukosalen Oberfläche bei [30, 73, 113]. Dabei spielt die Mikrobiota eine zentrale Rolle in der Stimulation von sIgA-bildenden Zellen und somit zur Entwicklung des noch unreifen Darm- und Immunsystems von Neugeborenen, da vor allem kommensale oder probiotische Bifidobakterien die sIgA-Produktion über die Stimulation von Plasmazellen beeinflussen [73]. Es konnte bereits 1998 durch Fukushima *et al.* gezeigt werden, dass die gastrointestinale sIgA-Produktion durch Gabe von *B. lactis* in Kleinkindern stimuliert wurde und folglich zu einer größeren Verfügbarkeit von sIgA im Darmsystem führte [97].

Für die in dieser Dissertation ausgewerteten sIgA-Konzentrationen zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den gestillten (BF-Pro und BF-Pla) und den formulaernährten Behandlungsgruppen (FF-Pro und FF-Pla), wonach für letztere deutlich niedrigere Werte ermittelt wurden und der Unterschied bezüglich der Stillgruppen signifikant ist ($p < 0,05$). Da Muttermilch selbst eine Quelle an sekretorischem IgA darstellt, liegt dieser Unterschied einerseits in der Ernährungsform begründet, da es eine signifikante Korrelation zwischen den IgA-Konzentrationen in der Muttermilch und den Fäzeskonzentrationen der Neugeborenen gibt [114]. Weiterhin stimulieren auch, wie eingangs erwähnt, die gastrointestinalen Bakterien, dabei vor allem Bifidobakterien, die endogene sIgA-Bildung, was die fäkalen Konzentrationen zusätzlich erhöht. Da formulaernährte Säuglinge mit deutlich weniger Bifidobakterien in den ersten Lebensmonaten kolonisiert sind [115], stehen dadurch auch weniger Immunglobulin-Produzenten zur Verfügung.

Da in der Auswertung der Daten deutliche interindividuelle Unterschiede erkennbar sind, die sich durch große Spannweiten der einzelnen Konzentrationen zeigen, stellt der Median ein stabileres Durchschnittsmerkmal dar. Hinsichtlich der Formlagruppen zeigt sich dabei auf deskriptiver Ebene, dass die Mediane der sIgA-Konzentrationen nach einem Lebensmonat (V3) nahezu identisch sind (FF-Pro 2,8 mg/ml vs. FF-Pla 2,9 mg/ml), dieser nach vier

Lebensmonaten in der *B. lactis*-supplementierten Gruppe jedoch fast doppelt so hoch ausfällt wie in der Placebogruppe (5,8 mg/ml vs. 3,2 mg/ml). Die Probiotikbehandlung trägt also zu einer Erhöhung der sIgA-Konzentration bei formulaernährten Säuglingen bei, die jedoch statistisch aufgrund der großen Probandenunterschiede und der geringen Stichprobenanzahl nicht signifikant ist. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Untersuchungen von Holscher *et al.*, die den Einfluss einer *B. lactis*-supplementierten Formulanahrung bei gesunden, zwei bis sechs Wochen alten Säuglingen über einen Zeitraum von sechs Wochen in einer doppelblinden, randomisierten Studie untersuchten [111]. Als Referenzgruppe wurden voll gestillte Säuglinge miteinbezogen. Es konnte ein signifikanter Unterschied in der fäkalen sIgA-Konzentration zwischen gestillten und formulaernährten Säuglingen festgestellt werden, jedoch zeigte die *B. lactis*-Behandlung im Vergleich zur Placebogruppe keinen Unterschied. Die Einzelanalyse der vaginal geborenen Kinder zeigte eine signifikante sIgA-Erhöhung in den Fäzes, was die unterschiedlichen Startbedingungen hinsichtlich der Mikrobiota- und Immunsystementwicklung weiter bekräftigt. Die Autoren schlussfolgern, dass die bifidodominierende Mikrobiota bei vaginal geborenen Kindern, verglichen mit Kaiserschnittkindern, durch die zusätzliche Gabe von *B. lactis* zu einer Verstärkung der sIgA-Bildung führt [111]. Folglich holen Kaiserschnittkinder diese verzögerte Startbesiedlung auch durch zusätzliche Bifidobakterien-supplementation nach sechs Wochen nicht auf. Die verabreichte Menge an probiotischen Bifidobakterien lag jedoch mit $1 \cdot 10^6$ cfu/g Formulanahrung deutlich unter der in dieser Dissertation verwendeten Konzentration von $1 \cdot 10^8$ cfu/g Formula. Außerdem wurden die Probanden erst zwischen der zweiten und sechsten Lebenswoche rekrutiert. Der Einfluss einer Probiotikintervention scheint daher auch in formulaernährten Kindern beginnend in den ersten Lebenstagen sinnvoller, vor allem wenn die postnatale Darmbesiedlung durch eine Geburt per Kaiserschnitt schon verzögert stattfindet.

Bezogen auf die in dieser Arbeit analysierten Stillgruppen ist auffällig, dass die Placebogruppe (BF-Pla) nahezu identische Konzentrationen an sIgA im Vergleich zur Referenzgruppe aufweist (22,0 mg/ml vs. 19,8 mg/ml), die *B. lactis*-supplementierte Gruppe hingegen eine deutlich höhere Konzentration zeigt (30,4 mg/ml). Der Unterschied zwischen diesen Gruppen ist nicht signifikant, aber aufgrund der höher gelegenen Interquartilsbereiche grafisch ersichtlich. Die Ähnlichkeit der Placebo-Stillgruppe mit der Referenzgruppe bleibt nach vier Lebensmonaten nahezu vollständig bestehen, da es in beiden Gruppen zu einer anscheinend physiologischen Absenkung der sIgA-Konzentrationen kommt. Diese ist anhand der sinkenden Interquartilsbereiche und Antennenspannweiten zwischen V3 und V5 in der grafischen Boxplotdarstellung (vgl. Abb. 3.8) auf deskriptiver Ebene, sowie anhand des statistischen Unterschiedes der Referenzgruppe (V3 vs. V5: $p = 0,018$) nachweisbar. Bei Betrachtung der Interquartilsbereiche in der *B. lactis*-Stillgruppe fällt die Konzentrationsabsenkung deutlich geringer aus bzw. bleibt nahezu konstant über diesen dreimonatigen Zeitraum.

Diesbezüglich interessante Ergebnisse lieferte 2005 die Arbeitsgruppe um Rinne [116]. In dieser placebokontrollierten Studie wurde schwangeren Frauen vier Wochen vor Entbindungstermin $1 \cdot 10^{10}$ cfu *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) pro Tag oder ein Placebo verabreicht und nach Entbindung entsprechend der Randomisierung den Neugeborenen für sechs Monate. Die Autoren konnten zeigen, dass Säuglinge, die mindestens drei Monate voll gestillt waren, deutlich mehr nachweisbare Mengen an Bifidobakterien in den Fäzes hatten, als nur teilweise gestillte Säuglinge, unabhängig von der Probiotik- oder Placebointervention. Außerdem konnte ein signifikanter Anstieg an Immunglobulin A-sezernierenden Zellen in Blutproben der Säuglinge nachgewiesen werden, wenn diese ebenfalls mindestens drei Monate voll gestillt waren und das Probiotikum erhielten. Dies beweist eine signifikante Interaktion zwischen Probiotikintervention und Muttermilchernährung in den ersten Lebensmonaten. Die Autoren schlussfolgern daraus, dass diese synergistischen Effekte einen initialen Schritt für die gesunde Reifung des adaptiven Immunsystems bedeuten. Dies liegt vor allem laut Rinne *et al.* darin begründet, dass die orale Gabe von LGG zusammen mit den in der Muttermilch enthaltenen humanen Milchligosacchariden das Bifidobakterienwachstum stimulieren und so die Reifung des Darmimmunsystems positiv beeinflussen [116].

Zusammenfassend zeigen die in dieser Arbeit ausgewerteten Daten der sIgA-Konzentrationen, dass formulaernährte Kinder deutlich weniger fäkale Immunglobuline aufweisen, als gestillte Kinder. Der Unterschied hinsichtlich der Ernährungsgruppen ist dabei signifikant. Eine Probiotikbehandlung mit *B. lactis* führt bei kaiserschnittgeborenen Säuglingen zu einer Konzentrationserhöhung sowohl bei formulaernährten als auch bei gestillten Kindern, wobei der Unterschied in der Stillgruppe deutlicher ausfällt, vor allem im Bezug zur Referenzgruppe (2,3-fach höhere Konzentrationen an V5). Die Unterschiede innerhalb der korrespondierenden Ernährungsgruppen sind dabei jedoch nicht signifikant. Ein Einfluss des Geburtsmodus ist anhand der Daten nicht erkennbar, da sich sowohl zu den Untersuchungszeitpunkten als auch im zeitlichen Verlauf die Placebo-Stillgruppe statistisch und deskriptiv nicht von der Referenzgruppe unterscheidet und beide Gruppen ausschließlich hinsichtlich des Geburtsmodus voneinander verschieden sind.

Alpha-1-Antitrypsin

Alpha-1-Antitrypsin (α 1-AT) ist ein Serumprotein, das resistent gegenüber enzymatischer Proteolyse ist und in den Fäzes nachgewiesen werden kann [117]. Es wird hauptsächlich in der Leber, jedoch auch in Makrophagen und den Darmepithelzellen gebildet und besitzt eine wichtige Funktion in der Inhibition von Proteasen [118]. Bereits 1977 konnte durch Crossley die fäkale α 1-AT-Messung als eine Möglichkeit zur nichtinvasiven Diagnostik des intestinalen Proteinverlustes und der damit einhergehenden erhöhten Darmschleimhautpermeabilität beschrieben werden [119]. Die Diagnostik hinsichtlich chronisch entzündlicher Darm-

erkrankungen anhand der fäkalen Exkretionsmengen wird jedoch kontrovers diskutiert [118]. Im Vergleich zu gesunden Erwachsenen (α 1-AT < 80 mg/dl) zeigen Neugeborene drastisch erhöhte α 1-AT-Konzentrationen in den ersten Lebenstagen, die durch große interindividuelle Schwankungsbreiten gekennzeichnet sind [120]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die α 1-AT-Konzentrationen bei gestillten Kindern innerhalb des ersten Lebensmonats niedriger sind im Vergleich zu formulaernährten Kindern und diese in beiden Gruppen nach sechs Lebensmonaten signifikant sinken, sodass das Alter als auch die Ernährung einen entscheidenden Einfluss auf die α 1-AT-Konzentrationen besitzen und damit die Änderungen der gastrointestinalen Funktion im Säuglingsalter widerspiegeln [121].

Die in dieser Dissertation ausgewerteten Daten der fäkalen α 1-AT-Konzentrationen zeigen deutliche inter- und intraindividuelle Gruppenunterschiede zwischen den gestillten und formulaernährten Kindern. Dabei ist die *B. lactis*-supplementierte Formulagruppe nach einem Lebensmonat mit einem Median von 40,9 mg/dl statistisch nicht verschieden von den Stillgruppen, jedoch ist der Unterschied in dieser als auch in der Placebo-supplementierten Formulagruppe nach vier Monaten zu allen anderen Gruppen aufgrund der deutlich höheren α 1-AT-Werte signifikant. Der Anstieg in der FF-Pro-Gruppe zwischen den Zeitpunkten V3 und V5 ist mit einem Faktor von 3,7 sehr deutlich und statistisch signifikant ($p = 0,018$). Ein Unterschied der Formulagruppen untereinander ist aufgrund der deutlichen Probandenunterschiede statistisch nicht ersichtlich, jedoch für die Visite 3 deskriptiv anhand des geringeren Medianwertes der FF-Pro-Gruppe abbildbar (40,9 mg/dl vs. 228,3 mg/dl).

Ähnliche Effekte konnte die Arbeitsgruppe um Kukkonen 2010 zeigen. Sie untersuchten den Einfluss einer Mischung aus vier probiotischen Bakterien und Galaktooligosacchariden auf allergieprädispositionierte Säuglinge in den ersten sechs Lebensmonaten [122]. Dabei konnte ein signifikanter Anstieg der α 1-AT-Konzentrationen in der Probiotika-supplementierten Gruppe gezeigt werden. Diese Konzentrationserhöhung korrelierte positiv mit der Menge an sIgA, woraufhin die Autoren schlussfolgerten, dass Probiotika zu einer subtilen, aber nicht klinisch relevanten Inflammation des Gastrointestinaltraktes führten [122]. Dies ist möglicherweise die physiologische Antwort der Etablierung der kommensalen Darmbakterien und zeigt die Bedeutung dieser für das Immunsystem. Kritisch angemerkt werden muss jedoch in dieser Studie, dass keine Differenzierung hinsichtlich des Geburtsmodus erfolgte und auch der Einfluss des Stillens der Probanden nur hinsichtlich eines Confounders, nicht jedoch als grundlegende Trennung der Gruppen, berechnet wurde.

Innerhalb der Stillgruppen dieser Arbeit zeigen sich keine signifikanten Einflüsse der *B. lactis*-Behandlung auf die fäkalen α 1-AT-Konzentrationen. Sowohl nach einem als auch nach vier Lebensmonaten besteht sowohl zwischen den Behandlungsgruppen (BF-Pro und BF-Pla) als auch im Vergleich mit der Referenzgruppe kein statistischer Unterschied. Dennoch zeigt sich

im zeitlichen Verlauf der Gruppen, dass es in der *B. lactis*-supplementierten Gruppe zu einer Erhöhung der α 1-AT-Konzentration kommt (V3: 13,9 mg/dl, V5: 33,1 mg/dl). Dieser Anstieg scheint einer physiologischen Änderung zu entsprechen, da dieser auch in der Referenzgruppe nachweisbar und hinsichtlich der zwei Zeitpunkte (V3: 6,8 mg/dl und V5: 24,4 mg/dl) sogar statistisch signifikant ist ($p = 0,043$). In der Placebo-Stillgruppe lässt sich keine zeitliche Konzentrationsänderung feststellen, sodass anzunehmen ist, dass eine Bifidobakteriensupplementation in den ersten vier Lebensmonaten bei kaiserschnittgeborenen Kindern zu einer Stärkung der immunologischen Reaktionen vergleichbar zu vaginal geborenen Säuglingen führt. Eine erhöhte Darmdurchlässigkeit ist dabei eher unwahrscheinlich, da eine normale Gastrointestinalmikrobiota bei gestillten Säuglingen zu einer Stabilisierung der Darmpermeabilität in den ersten Lebensmonaten führt [67]. Auch Muttermilch ist eine Quelle von zusätzlichem α 1-AT und trägt hinsichtlich des steigenden Nahrungsvolumens möglicherweise zu einer Beeinflussung der fäkalen Konzentrationen bei gestillten Säuglingen bei und stellt nicht zwangsläufig einen erhöhten Proteinverlust dar [114, 123]. Weiterhin nimmt die Stuhlhäufigkeit mit der Zeit bei allen Kindern ab, was vor allem in den Stillgruppen möglicherweise zu einer Konzentrierung der α 1-AT-Werte beitragen kann. Dieser Einfluss scheint jedoch eher minimal aufgrund der gleichzeitig sinkenden slgA-Werte, soll jedoch als möglicher Faktor berücksichtigt werden.

Da die Konzentrationen an α 1-AT in den Formulagruppen stark über den Werten der Stillgruppen liegen, ist die verzögerte Permeabilitätsstärkung des Darmepithels in diesen Gruppen am wahrscheinlichsten. Der Unterschied zwischen der *B. lactis*- und Placebo-intervention ist sehr gering und nur deskriptiv erkennbar und zeigt, dass Bifidobakterien den wichtigen Einfluss der Ernährung nicht abfangen, jedoch zeitlich etwas aufhalten können. Dies steht im Bezug zu den Ergebnissen von Stratiki *et al.* aus dem Jahr 2007, die die Wirkung von einer *B. lactis*-angereicherten Formulanahrung auf die intestinale Permeabilität von Frühgeborenen untersuchten [124]. Nach einem Monat der Nahrungsintervention konnten sowohl ein Anstieg von Bifidobakterien als auch eine signifikant geringere Darmdurchlässigkeit mittels Zuckerabsorptionstest nachgewiesen werden. Da jedoch die immunmodulierende Wirkung der Bakterien wahrscheinlich einen positiven, subtilen inflammatorischen Prozess zur Immunsystemreifung begünstigt, der sich in den höheren Werten der α 1-AT-Konzentrationen nach vier Lebensmonaten im Vergleich zur Placebogruppe äußert, sind diese zwei Mechanismen überlagert und anhand von fäkalen Konzentrationsmessungen nicht separierbar.

Calprotectin

Calprotectin ist ein Calcium- und Zink-bindendes Protein, das rund 60 % des löslichen zytosolischen Proteins in menschlichen neutrophilen Granulozyten darstellt [125]. Hinsichtlich der biologischen Aktivität besitzt Calprotectin antimikrobielle Eigenschaften, was zusätzlich zur Fähigkeit, Calcium zu binden, zur Namensgebung dieses Proteins geführt hat [126]. Große Bedeutung besitzt Calprotectin als nichtinvasiver Biomarker im Bereich der Gastroenterologie, da es bei inflammatorischen Darmerkrankungen, wie beispielsweise Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa, zu einem nachweisbaren fäkalen Konzentrationsanstieg kommt, welcher routinemäßig zur Diagnose und als klinischer Verlaufsparemeter bei diesen Erkrankungen ermittelt wird [127]. Im Vergleich zu Erwachsenen und Kindern weisen gesunde Neugeborene und Säuglinge in den ersten Lebensmonaten signifikant höhere fäkale Calprotectinkonzentrationen auf, die durch eine hohe Variabilität gekennzeichnet sind [128].

In der für diese Dissertation untersuchten Calprotectinkonzentrationen in den Stuhlproben der Studien- und Referenzprobanden konnten nach einem Monat (V3) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ermittelt werden. Es zeigte sich jedoch auch eine hohe intra- und interindividuelle Schwankungsbreite, vor allem in den Formulagruppen. Diese sind auf wenige, aber deutliche Ausreißer zurückzuführen. Der Medianvergleich zeigt die geringste Calprotectinkonzentration in der Referenzgruppe mit 197,5 µg/ml, gefolgt von der *B. lactis*-supplementierten Stillgruppe mit 244,6 µg/ml. Die höchste durchschnittliche Konzentration wiesen die Probanden der formulaernährten Placebogruppe auf (446,5 µg/ml). Nach vier Monaten zeigte sich ein Gruppenunterschied in den Calprotectinwerten, der jedoch ausschließlich im Vergleich der *B. lactis*-supplementierten Formulagruppe mit der Referenzgruppe begründet lag (472,5 µg/ml vs. 154,4 µg/ml). Alle anderen Gruppen waren nicht voneinander verschieden.

Diese Ergebnisse sind im Hinblick auf aktuelle Untersuchungen nur bedingt zu übertragen. So konnte die Arbeitsgruppe um Campeotto *et al.* im Jahr 2004 ebenfalls keinen Unterschied in den Calprotectinkonzentrationen zwischen gestillten und formulaernährten Kindern finden, jedoch eine hohe Variation der untersuchten Proben feststellen [129]. Allerdings wurden die Stuhlproben nur innerhalb der ersten Lebenswoche analysiert. Demgegenüber konnten Lee *et al.* 2017 deutlich höhere Calprotectinkonzentrationen im Alter von 0 - 6 Monaten bei gestillten Kindern im Vergleich zu formulaernährten Kindern (354,67 µg/g vs. 149,44 µg/g, $p < 0,001$) analysieren [130]. Dabei ermittelten sie hohe Spannweiten der Daten, unabhängig von der Art der Ernährung (11,5 µg/g – 1330,6 µg/g). Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass die erhöhten Calprotectinlevel in den ersten Lebenswochen möglicherweise die physiologische Reifung des Immunsystems reflektieren, welche bei den gestillten Kindern hinsichtlich der muttermilchinduzierten Mukosaentwicklung verstärkt abläuft. Dies entspricht

auch der Tatsache, dass unabhängig von der Ernährungsform die Reifung des Darmsystems an den mit der Zeit sinkenden Calprotectinspiegeln in dieser Untersuchung deutlich wird und somit auch die Darmpermeabilität sowie die transepitheliale Migration von Neutrophilen als Calprotectinquelle abnimmt. Da diese Permeabilität bei gestillten Kindern schneller abnimmt, wären eigentlich erhöhte Calprotectinkonzentrationen in den formulaernährten Kindern zu erwarten. Diese konnten in der vorliegenden Dissertation deskriptiv nach einem Monat nachgewiesen werden, nicht jedoch in der Arbeit von Lee *et al* [130]. Es kommt somit vermutlich zu einer sehr individuellen probandenspezifischen Balance zwischen der Immunsystemreifung und der Permeabilitätsabnahme der epithelialen Mukosazellen, die sich in den großen Spannweiten der Daten zeigen. Dabei ist jedoch anzumerken, dass die Abgrenzung der formulaernährten Kinder in der Veröffentlichung von Lee *et al.* darin bestand, dass sie mindestens einen Monat vor der Rekrutierung ausschließlich mit Säuglingsnahrung ernährt wurden [130]. Dies kann in den ersten sechs Lebensmonaten demzufolge eine längere Muttermilchernährung implizieren und damit die Ergebnisse deutlich beeinflussen. Dennoch sind die Fallzahlen mit 19 bis 39 pro Gruppe deutlich größer und zeigen die limitierte Bewertungsmöglichkeit bei geringeren Stichprobenumfängen wie in dieser Dissertation, aber auch die Bedeutung einer genauen Definition der Ernährungsform.

Auch Savino *et al.* konnten 2010 höhere Calprotectinkonzentrationen bei gesunden, ausschließlich gestillten Säuglingen in den ersten 90 Lebenstagen feststellen im Vergleich zu formulaernährten Kindern [131]. Sie schlussfolgern ebenfalls, dass dieser Effekt auf die Migration von Granulozyten in das Darmlumen aufgrund der physiologischen Entwicklung des darmassoziierten lymphatischen Gewebes kombiniert mit der muttermilchbeeinflussten Mikrobiotaentwicklung zurückzuführen ist, wenngleich eine schnellere Reduktion der Darmpermeabilität bei Stillkindern nachgewiesen ist. Interessanterweise untersuchten sie auch den Zusammenhang zwischen Stuhlfrequenz und Calprotectinkonzentration und fanden heraus, dass zwar die Art der Ernährung, nicht jedoch die häufigeren Stuhlausscheidungen gestillter Kinder diese beeinflussen [131].

Die Wirkung einer *B. lactis*-Supplementation zeigt sich statistisch in dieser Dissertation nur bei den formulaernährten Kindern (FF-Pro), da der Unterschied zwischen dieser und der Referenzgruppe an V5 signifikant ausfällt ($p = 0,046$). Da die Darmpermeabilität wie bereits beschrieben in den ersten Lebenswochen abnehmend ist, kann dieser Einfluss vermutlich auf die immunfördernde Wirkung des Probiotikums *B. lactis* zurückgeführt werden. Calprotectin besitzt sowohl bakterizide als auch fungizide Aktivitäten, daher kann auch ein gesundheitsfördernder Effekt von erhöhten Konzentrationen für das Darmsystem von gesunden Kindern in den ersten Lebenswochen angenommen werden [128]. So konnte in der bereits beschriebenen Studie von Holscher *et al.* eine ähnlich initiale Calprotectinkonzentrations-

erhöhung bei Kindern ermittelt werden, die über zwei Wochen eine mit *B. lactis* angereicherte Formula zu sich nahmen [111]. Dieser Effekt war nach sechswöchiger Formulaernährung jedoch nicht mehr statistisch nachweisbar. Auch der Vergleich zur Kontrollgruppe (Formula ohne *B. lactis*) zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Probiotikgruppe [111]. Demgegenüber scheint die Einnahme von *B. lactis* bei Frühgeborenen zu einer signifikanten Reduktion der fäkalen Calprotectinwerte zu führen, die laut Mohan *et al.* möglicherweise auf eine Abschwächung der inflammatorischen Antwort auf ernährungsbedingte oder bakterielle Antigene zurückzuführen ist [99].

Zusammenfassend lässt sich zu den Calprotectinspiegeln festhalten, dass aufgrund der Studiendesigndiskrepanzen in den publizierten Daten sowie hinsichtlich der interindividuellen Variationen der Calprotectinspiegel in den ersten Lebenswochen keine eindeutige Bewertung vorgenommen werden kann. Die geringeren fäkalen Konzentrationen lassen eine schnellere Darmpermeabilitätsverringering in den untersuchten Stillgruppen dieser Arbeit vermuten, die Unterschiede in den Studiengruppen sind jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$). Eine leicht immunstimulierende Wirkung von *B. lactis* auf die formulaernährten Probanden kann anhand des Unterschiedes zur Referenzgruppe nach vier Lebensmonaten angenommen werden ($p = 0,046$). Ein Effekt bezüglich der Art der Entbindung konnte anhand der vergleichbaren Werte der Placebo-Stillgruppe und der Referenzgruppe nicht analysiert werden.

Korrelationen zwischen den fäkalen Immun- und Entzündungsparametern

Um die Zusammenhänge der einzelnen fäkalen Parameter untereinander festzustellen, wurden über alle Probanden Korrelationsanalysen nach Spearman durchgeführt.

Dabei konnte eine negative Korrelation zwischen den α 1-AT- und sIgA-Konzentrationen sowohl nach einem als auch nach vier Lebensmonaten ermittelt werden ($r = -0.502$ und $r = -0.485$). Eine ähnliche Beziehung konnten Lisowska-Myjak und Pachecka 2007 an gesunden, gestillten und vaginal geborenen Neugeborenen am vierten Lebenstag aufzeigen [114]. Da diese Proben zu einem sehr frühen Zeitpunkt genommen wurden, entsprechen diese den Autoren zufolge vermutlich der Ausscheidung des bereits intrauterin vorhandenen α 1-AT. Durch den gleichzeitigen Anstieg von sIgA in der Muttermilch entsteht daher eine positive Korrelation, die möglicherweise nicht im kausalen Zusammenhang steht, sondern zwei parallele Mechanismen, die α 1-AT-Clearance nach der Geburt und die exogene sIgA-Zufuhr durch die Muttermilch, vereint [114]. Der Effekt nach einem bzw. vier Lebensmonaten zeigt demzufolge vermutlich eher die Ausprägung der Reifung des Immunsystems, da sich die sekretorischen IgA-Konzentrationen erhöhen und parallel die α 1-AT-Konzentrationen als Maß für die Darmpermeabilität reduzieren. Weiterhin stehen letztere im Zusammenhang mit den Calprotectinwerten, da diese sowohl an V3 als auch an V5 signifikant miteinander korrelieren

($r = 0.581$ und $r = 0.531$). Dazu konnte in der bereits erwähnten Studie von Kukkonen *et al.* eine positive Korrelation von fäkalem sIgA mit beiden inflammatorischen Markern, α 1-AT und Calprotectin, bei sechs Monate alten Säuglingen, die vier probiotische Stämme einmal täglich ab Geburt erhielten, nachgewiesen werden [122]. Da die verabreichten Probiotika einen statistischen Trend zur sIgA-Erhöhung zeigten ($p = 0,085$) und signifikant die α 1-AT-Konzentrationen erhöhten ($p = 0,001$), schlussfolgerten die Autoren, dass diese immunologischen Veränderungen, zusammen mit der Tatsache, dass die höheren Calprotectinwerte mit einem geringeren Risiko für allergische Erkrankungen assoziiert waren, zu einer subklinischen Inflammation führten, die das Immunsystem und deren Reifung aktivierte [122]. Die Diskrepanzen zu der in dieser Dissertation ermittelten Korrelation bezüglich der α 1-AT- und sIgA-Werte liegen vermutlich erstens in der Art der verabreichten Probiotika begründet und zweitens darin, dass in der Arbeit von Kukkonen *et al.* keine Trennung nach Geburtsmodus sowie Ernährungsform erfolgte. Diese beiden Faktoren spielen jedoch eine entscheidende Rolle im Hinblick auf die Mikrobiotaentwicklung in Säuglingen und der damit verbundenen Immunsystemreifeung [29, 45, 71].

Bezüglich der hoch signifikant negativen Korrelation zwischen pH-Wert und sIgA-Konzentrationen in den Fäzes der Probanden lassen sich deutliche Hinweise auf die Besiedlung mit den natürlich erworbenen (Referenzgruppe) als auch mit den supplementierten Bifidobakterien (*B. lactis*-Still und -Formulagruppe) finden. So konnten Mohan *et al.* in ihrer Arbeit zur *B. lactis*-Supplementation von Frühgeborenen signifikant höhere Anzahlen von Bifidobakterien, höhere Konzentrationen an kurzkettigen Fettsäuren, reduzierte pH-Werte sowie höhere sIgA-Konzentrationen in den Fäzes der Probiotikgruppe verglichen mit der Placebogruppe finden, wobei die Bifidobakterienanzahlen signifikant mit den Konzentrationen der kurzkettigen Fettsäuren korrelierten und einen statistischen Trend hinsichtlich einer positiven Korrelation mit den sIgA-Werten zeigten [99, 132]. Diese Arbeiten beweisen daher einen Zusammenhang zwischen Kolonisation von Bifidobakterien im Säuglingsdarm und den Stoffwechselprodukten dieser sowie den daraus resultierenden veränderten fäkalen Parametern. Geringere pH-Werte weisen somit auf eine erhöhte Bildung von kurzkettigen Fettsäuren durch die Bifidobakterien hin, die zur Ansäuerung des Darmlumens führen. Dies wird besonders bei den gestillten *B. lactis*-supplementierten Probanden deutlich, da diese als einzige Gruppe eine deutliche pH-Wertreduktion zeigten, sowie die höchste durchschnittliche sIgA-Konzentration nach vier Lebensmonaten aufwiesen.

Eine Limitierung der in dieser Arbeit analysierten Ergebnisse liegt in der Qualität der Sammlung begründet, da diese durch die Eltern erfolgte und der Stuhl jeweils direkt aus der Windel entnommen wurde. Dadurch ist eine natürliche Konzentrierung durch die absorbierte Flüssigkeit nicht zu verhindern. Auch eine Vermischung mit Urin kann durch diese Art der

Sammlung nicht ausgeschlossen werden. Da diese Confoundingfaktoren jedoch in jeder Gruppe bestehen, ist eine starke Beeinflussung der Ergebnisse dadurch nicht zu erwarten. Dennoch ist eine Beurteilung bei nicht standardisierten Entnahmen von menschlichen Proben immer nur eingeschränkt möglich, da auch Tageszeit, Menge und Beachtung der Lagerungsvorschriften die Qualität der Ergebnisse beeinflussen. Diese konnten den Eltern nur als Hinweise mitgegeben werden, eine Kontrolle innerhalb des Haushaltes bezüglich deren Umsetzung war nicht möglich.

Einfluss von *B. lactis* auf die Erkrankungsinzidenz

Zur Auswertung der Erkrankungsinzidenzen wurden die von den Eltern angegebenen Daten in den Tagebüchern ausgewertet. Dabei erfolgte eine Einteilung von spezifischen Symptomen bzw. Infekten in Kategorien, um eine Auswertung systematisch vorzunehmen. So wurden Erkrankungen des respiratorischen Traktes zusammengefasst, sowie Koliken bzw. Blähungen nur dann ausgewertet, wenn diese medikamentös behandelt wurden, da vor allem in diesem Bereich der Symptomatik die subjektive Wahrnehmung der Eltern eine große Rolle spielt. Auch Hauterkrankungen im Windelbereich wurden aufgrund der vielfältigen Ausprägungsformen kategorisch zusammengefasst. Die Inzidenzen für Fieber und Durchfallerkrankungen waren in den Studiengruppen aufgrund der Stichprobengröße und des Beobachtungszeitraumes von vier Lebensmonaten zu gering, um diese auszuwerten.

Hinsichtlich der ausgewerteten Inzidenzen der Augeninfektionen konnten keine Gruppenunterschiede festgestellt werden, sodass ein Einfluss der Ernährung, des Geburtsmodus oder einer Probiotiksupplementation mit *B. lactis* nicht erkennbar ist. Allerdings sind auch die Fallzahlen mit ein bis drei Infektionen pro Gruppe sehr gering.

Ähnlich sind die Hauterkrankungen im Windelbereich zu bewerten, da kein statistischer Unterschied zwischen den Gruppen analysiert werden konnte. Dennoch fällt auf, dass kein Proband der *B. lactis*-behandelten Gruppen (BF-Pro und FF-Pro) eine Symptomatik dahingehend in den ersten vier Lebensmonaten entwickelte. Möglicherweise ist dies auf einen protektiven Effekt der veränderten durchschnittlichen Immun- und Entzündungsmarker als Resultat der milden subklinischen Inflammation zurückzuführen, die einen Schutz vor Dermatiden im Windelbereich bot. So konnte in beiden Probiotikgruppen im direkten Vergleich mit der korrespondierenden Placebogruppe Erhöhungen in den sIgA-, α 1-AT- und Calprotectinwerten gezeigt werden. Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant, zeigen aber in der Gesamtheit eine Tendenz zur Immunstimulierung. Darüber hinaus konnte ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Hauterkrankungen im Windelbereich und den gemessenen α 1-AT-Werten an Visite 3 analysiert werden ($r = 0.417$). Dies impliziert, dass bei sehr hohen Konzentrationen an α 1-AT die Darmdurchlässigkeit erhöht ist und dadurch

atopische Ekzeme möglicherweise begünstigt werden. Eine direkte kausale Beziehung kann daraus allerdings nicht abgeleitet werden.

Bezüglich der respiratorischen Erkrankungsinzidenzen zeigt sich eine durchschnittlich 50%ige Reduktion in der *B. lactis*-behandelten Stillgruppe im Vergleich zu allen anderen Probandengruppen. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant, zeigt aber eine Tendenz zur Verhinderung von respiratorischen Effekten in dieser Gruppe. Ursächlich dafür könnte die Verbesserung des Darmmilieus in dieser Gruppe sein, da es zu einer deutlichen Reduktion des pH-Wertes nach vier Monaten kam und die sekretorischen Immunglobulin A-Werte in dieser Gruppe im Vergleich zu allen anderen Gruppen erhöht blieben. Diese probiotischen Wirkungsprinzipien von *B. lactis* stellen, zusammen mit der kompetitiven Hemmung um Substrate und Bindungsstellen an der Mukosa, einen Schutz gegenüber der Besiedlung des Gastrointestinaltraktes mit potentiellen Pathogenen dar [80, 81]. Einen signifikanten Effekt in der Verhinderung von respiratorischen Infekten konnte 2011 die Arbeitsgruppe um Taipale zeigen [95]. Dabei wurde finnischen Säuglingen im Alter von einem bis zum achtem Lebensmonat einmal täglich $5 \cdot 10^{12}$ cfu *B. lactis* oder ein Placebo verabreicht. Dabei kam es zu einer 30%igen Reduktion ($p = 0,014$) von respiratorischen Erkrankungen in der Probiotikgruppe ($n = 34$) verglichen mit der Placebogruppe ($n = 35$). Es wurde zwar nicht nach Geburtsmodus und Ernährungsform unterschieden, jedoch lag die ausschließliche Stilldauer von $3,4 \pm 1,7$ Monaten (Probiotik) und $3,8 \pm 1,9$ Monaten (Placebo) im vergleichbaren Bereich zu der in dieser Arbeit untersuchten Stillgruppen. Allerdings wurden in dieser Studie keine klinischen Stuhlmarker untersucht, dennoch wird die Bedeutung einer größeren Stichprobe sowie einer längeren Studiendauer in der Bewertung der Erkrankungsinzidenzen deutlich. Die vergleichbare Stilldauer sowie der Effekt auf die Inzidenz von respiratorischen Erkrankungen verdeutlicht die synergistische Wirkung von Muttermilchernährung und Bifidobakterien im Hinblick auf die Immunantwort.

Anzumerken ist weiterhin, dass hinsichtlich der Schwere der Erkrankung sowie der Risikofaktoren in den Gruppen dieser Arbeit nicht unterschieden wurde. So ist bei der Inzidenzrate, also der Anzahl der Neuerkrankungen pro Zeitraum, ein wesentlicher Einfluss das Vorhandensein von Geschwisterkindern im gleichen Haushalt, die aufgrund der höheren Exposition zu Infektionskeimen in Kindertagesstätten oder Schulen, die Ansteckung der Probanden sehr viel wahrscheinlicher macht als bei Einzelkindern und somit einen möglichen Confounder in der Auswertung darstellt. Der Effekt bezogen auf die Einzelkinder in den Gruppen ist deutlich unterschiedlich, da sich für die respiratorischen Neuerkrankungen in den ersten vier Lebensmonaten 75 % der FF-Pla-Gruppe verglichen mit 17 % in der FF-Pro-Gruppe ergaben. In den Stillgruppen zeigte sich, dass von den Neuerkrankungen in der BF-Pla-Gruppe 50 % ohne den Einfluss von Geschwisterkindern auftraten verglichen mit nur rund

32 % in der BF-Pro-Gruppe. Die geringste Inzidenzrate von nur 14 % aller Erkrankungen bezogen auf den Einfluss von Geschwisterkindern zeigte sich in der Referenzgruppe, d.h. über 85 % der Infekte könnte aufgrund des höheren Risikos des Vorhandenseins von Geschwisterkindern im gleichen Haushalt begründet liegen. Dies stellt dabei keinen kausalen Zusammenhang dar, zeigt jedoch, dass selbst ohne größere Risikofaktoren, die *B. lactis*-supplementierten Gruppen (BF-Pro und FF-Pro) im Vergleich zu den jeweiligen Placebo-Gruppen eine geringere Inzidenzrate an Infektionen aufweisen. Ein protektiver Einfluss einer normalen Darmbesiedlung sowie einer *B. lactis*-Supplementierung bei fehlender Erstbesiedlung mit Mikroorganismen der Mutter kann somit vermutet, jedoch aufgrund der geringen Fallzahlen nicht nachgewiesen werden. Auffallend ist in diesem Zusammenhang weiterhin der moderate Effekt zwischen dem Vorhandensein von mindestens einem Geschwisterkind im gleichen Haushalt und den Calprotectinwerten ($r = 0.328$ (V3) und $r = 0.357$ (V5)). Dies zeigt zwar keine Kausalität, stützt jedoch die These der Immunstimulation, da durch eine größere Anzahl von Familienmitgliedern die Exposition von Mikroorganismen höher ist und dadurch eine möglicherweise größere Bakteriendiversität entsteht, die zusätzlich eine synergistische Modulation des Immunsystems bewirkt.

Die Betrachtung der durchschnittlichen Erkrankungsdauer in den Gruppen zeigt, dass die Referenzgruppe aufgrund der geringsten Dauer von durchschnittlich nur 3,7 Tagen vermutlich nur leichtere Infekte bzw. eine schnellere Regenerationsfähigkeit besitzt. Demgegenüber zeigt die *B. lactis*-behandelte Stillgruppe eine deutlich längere Krankheitsdauer von durchschnittlich 9,0 Tagen. Dabei muss jedoch erwähnt werden, dass es sich um sehr geringe Inzidenzen handelt und eine deutlich schwerere respiratorische Erkrankung in dieser Gruppe auftrat. Auch im Hinblick auf den exploratorischen Charakter dieser Studie und den geringen Stichprobenumfang, lassen sich bezüglich der Erkrankungsdauer keine deutlichen Aussagen treffen.

Für die Inzidenz der behandelten Blähungen und Koliken in den ersten vier Lebensmonaten ließ sich ein signifikanter Effekt hinsichtlich eines protektiven Einflusses von vaginal geborenen, voll gestillten Kindern analysieren, da in dieser Gruppe kein einziger Fall dokumentiert wurde. Daher ist der Unterschied zu beiden Placebogruppen (BF-Pla und FF-Pla) signifikant ($p < 0,001$). Muttermilch und die Besiedlung mit natürlichen Bakterien aus der Vaginalflora der Mütter scheinen eine optimale Grundlage zu bilden, um einen Schutz vor gastrointestinalen Beschwerden zu bilden.

Auffällig ist außerdem, dass eine Probiotikbehandlung in beiden Ernährungsgruppen zu einer Reduzierung der Kolik- bzw. Blähungsinzidenzen führt. Dabei sind die Unterschiede nicht signifikant, jedoch deskriptiv erkennbar. In den Stillgruppen sind 20 % weniger Probanden mit *B. lactis*-Supplementation betroffen, in den Formulagruppen ist der Unterschied mit über 40 % noch deutlicher. Die Bifidobakterien scheinen somit zu einer geringeren Ausprägung der

gastrointestinalen Beschwerden zu führen, möglicherweise durch die Beeinflussung der Balance zwischen Bifidobakterien und den weiteren kommensalen Bakterien sowie deren Stoffwechselprodukten. Dementsprechend konnten auch Saavedra *et al.* 2004 zeigen, dass eine Supplementation von *B. lactis* zusammen mit *S. thermophilus* in formulaernährten Kindern mit einer geringeren Frequenz von Koliken assoziiert ist [94]. Die Autoren vermuten dahingehend, dass die Probiotikagabe die gastrointestinale Toleranz aufgrund der veränderten Fermentationsfähigkeit und einer möglichen geringeren Gasbildung verbessert. Eine Metaanalyse aus dem Jahr 2009 zeigt dazu weiterhin, dass Bifidobakterien, wie das *Bifidobacterium infantis*, zu einer Abschwächung der gastrointestinalen Störungen wie abdominelle Schmerzen, Blähungen und/oder Stuhlgangsbeschwerden führen kann, jedoch die einheitliche Bewertung von Probiotika dazu aufgrund von inadäquaten Studiendesigns nicht möglich ist [133].

Hinsichtlich der Dauer der Beschwerden zeigt sich im Gruppenvergleich, dass die gestillte *B. lactis*-Gruppe nur durchschnittlich 30 Tage von behandlungsbedürftigen Blähungen betroffen ist, verglichen mit 70 bis 81 Tagen in den anderen Gruppen. Der protektive Effekt ist somit deutlich erkennbar, da weniger Probanden betroffen sind, wenn nach einer Sektiogeburt gestillt wird und zusätzliche probiotische Bifidobakterien gegeben werden, und diese auch im Ergebnis eine rund 60 % verkürzte Beschwerdedauer haben. Dies verstärkt zusätzlich die zusammenwirkenden klinischen Effekte von Muttermilchernährung und Bifidobakterien-supplementation.

Insgesamt zeigt sich im Vergleich der Gruppen, dass in der *B. lactis*-supplementierten Stillgruppe bei 50 % der Probanden, und damit am meisten im Gruppenvergleich, keinerlei unerwünschte Ereignisse in den ersten vier Lebensmonaten dokumentiert wurden. Die formulaernährte Placebogruppe ist demgegenüber auffällig, da jeder Proband dieser Gruppe in den ersten vier Lebensmonaten einen Infekt bzw. gastrointestinale Beschwerden erlebte. Das Immunsystem scheint daher nach Sektiogeburt und Formulaernährung deutlich beeinträchtigt zu sein. Dies wird durch den errechneten Zusammenhang zwischen der Erkrankungsfreiheit in den ersten vier Lebensmonaten und den sIgA-Spiegeln an V5 verdeutlicht ($r = 0.424$), dabei ist jedoch keine Kausalität daraus abzuleiten. Dennoch zeigt es die interessante Verbindung von Antikörperkonzentrationen und geringerer Infektinzidenz, die über alle Gruppen berechnet wurde.

Zusammenfassende Darstellung der gruppenspezifischen Einflussfaktoren

Die Ergebnisse der Stuhlprobenanalysen sowie der dokumentierten Erkrankungsinzidenzen zeigen deutliche Zusammenhänge zwischen der Mikrobiotaentwicklung in den ersten Lebenswochen bei per Kaiserschnitt geborenen Kindern sowie der Entwicklung des Immunsystems. Dabei spielt die Ernährung der Säuglinge eine essentielle Rolle. Durch den Vergleich mit der rekrutierten Referenzgruppe aus vaginal geborenen, voll gestillten Kindern lassen sich außerdem Einflüsse hinsichtlich der Darmbesiedlung nach der Geburt bzw. der Entbindungsart an sich darstellen und der natürlichste Ablauf als „Goldstandard“ ableiten.

Zur übersichtlichen Vergleichbarkeit der Gruppen untereinander hinsichtlich der Stuhlparameter und der Erkrankungsinzidenzen sind die Ergebnisse schematisch zusammengefasst in Tabelle 4.1 dargestellt. Dabei beziehen sich die Pfeile auf den Vergleich der Mittelwerte (pH-Wert) bzw. Mediane (slgA, α 1-AT, Calprotectin) zur Referenzgruppe an Visite 5.

Tab. 4.1: Schematischer Vergleich der Parameterveränderungen bezogen auf die Ergebnisse der Referenzgruppe nach vier Lebensmonaten

| | BF-Pro | BF-Pla | FF-Pro | FF-Pla |
|------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| pH-Wert | ↔ | ↑ | ↑↑ | ↑↑ |
| slgA | ↑ | ↔ | ↓ | ↓ |
| α 1-AT | ↔ | ↔ | ↑↑ | ↑↑ |
| Calprotectin | ↔ | ↔ | ↑↑ | ↔ |
| Respiratorische Erkrankungen | ↓ | ↔ | ↔ | ↔ |
| Kolik/Blähungen | ↑ | ↑↑ | ↑ | ↑↑ |
| unerwünschte Ereignisse | ↓ | ↔ | ↔ | ↑ |

Die Pfeile stellen die deskriptiven Parameterveränderungen hinsichtlich einer Reduktion (↓) bzw. eines Anstieges (↑) im Vergleich zur Referenzgruppe dar, bei doppelter Pfeilsymbolik (↓↓ oder ↑↑) ist der Unterschied zur Referenzgruppe signifikant. ↔ kein Unterschied zur Referenzgruppe

grün = positive Veränderung, rot = negative Veränderung, schwarz = keine Interpretation möglich

Die zusammengefasste Ergebnisübersicht der analysierten fäkalen Parameter und der Erkrankungsinzidenzen zeigt die unterschiedlichen Einflüsse von Geburtsmodus, Ernährungsform und Probiotiksupplementation der Probanden. So wird bezüglich einer Geburt per Kaiserschnitt deutlich, dass gestillte Kinder in den ersten vier Lebensmonaten einen leicht

höheren pH-Wert aufweisen, als vaginal geborene Säuglinge. Dieser Unterschied zwischen Referenzgruppe (REF) und der Placebo-Stillgruppe (BF-Pla), die sich allein durch die Art der Entbindung unterscheiden, ist auf Ebene der fäkalen Parameter jedoch der einzige und statistisch nicht signifikant. Auf klinischer Ebene hingegen sind diese Probanden signifikant häufiger von Blähungen bzw. Koliken betroffen, was auf die veränderte initiale Darmbesiedlung hinweist, die in den ersten vier Lebensmonaten auch durch die Muttermilch-ernährung nicht neutralisiert werden kann. Diese Beobachtung könnte dabei auch durch die peripartale prophylaktische Antibiotikagabe nach Sektio beeinflusst sein, da aufgrund des operativen Eingriffes eine standardisierte Antibiose zur Verhinderung von maternalen Infektionen eine Standardprozedur in der Geburtshilfe darstellt [134]. Über die Muttermilch der ersten Tage gelangt das verabreichte Antibiotikum dann in den kindlichen Organismus und kann die Darmbesiedlung zusätzlich beeinträchtigen.

Eine Probiotikabehandlung mit *B. lactis* bewirkt bei gestillten Kindern (BF-Pro) eine deutliche Reduzierung des pH-Wertes über die Zeit, sodass dieser sich von der Referenzgruppe nicht mehr unterscheidet. Außerdem sind die sekretorischen Immunglobulin A-Konzentrationen im Vergleich zur Referenzgruppe erhöht, was auf eine Induktion der B-Zell-Differenzierung zur IgA-Bildung hinweist und somit den Immunstatus der Probanden bezüglich der Pathogenabwehr begünstigt. Dies korrespondiert mit der Beobachtung, dass die *B. lactis*-supplementierten Stillkinder deutlich weniger von respiratorischen Infekten betroffen sind und insgesamt den größten Anteil der Kinder beinhalten, für die keinerlei unerwünschte Ereignisse in den ersten vier Lebensmonaten dokumentiert wurden. Die Unterschiede sind bezüglich der Referenzgruppe jedoch nicht statistisch signifikant, zeigen aber eine insgesamt positive Beeinflussung des Immunsystems. Der Schutz vor Atemwegserkrankungen kann dabei auch in der durch die zusätzlich verfügbaren Bifidobakterien veränderten Mikrobiota begründet liegen. Als Teil des menschlichen mukosalen Immunsystems, welches unter anderem auch den respiratorischen Trakt beinhaltet, können Immunstimulationen des darmassoziierten lymphatischen Gewebes auch die Immunreaktion anderer mukosaler Oberflächen beeinflussen [30].

Grundlegend konnte außerdem anhand der Referenzgruppe gezeigt werden, dass vaginal geborene, voll gestillte Kinder die größte Fäkalparameterdynamik aufweisen und demzufolge eine Vielzahl von immunologischen Prozessen in den ersten vier Lebensmonaten durchlaufen. So ist der Verlauf von drei der vier untersuchten Marker zwischen V3 und V5 entweder statistisch signifikant oder weisen einen statistischen Trend auf (slgA: $p = 0,018^*$, α 1-AT: $p = 0,043^*$, pH: $p = 0,091$). Diese Ergebnisse heben die Wichtigkeit der verbundenen Stichproben zur Interpretation der Parameterverläufe im Untersuchungszeitraum in dieser Arbeit hervor.

Formulaernährte und per Kaiserschnitt geborene Kinder zeigen insgesamt im Vergleich zu gestillten, vaginal geborenen Kindern starke Veränderungen auf laborchemischer (erhöhter pH-Wert, reduzierte sIgA-Konzentrationen und erhöhte α 1-AT-Spiegel) und klinischer Ebene (mehr Kinder mit behandelten Blähungen). Da diese Effekte in den Stillgruppen nicht so deutlich ausgeprägt sind, kann dies auf die Ernährungsform bzw. das Fehlen der Muttermilch zurückgeführt werden. Die Bedeutung der Calprotectinerhöhung kann aufgrund der divergenten Literaturlage nicht eindeutig interpretiert werden, könnte aber auf eine immunstimulierende Wirkung durch eine subklinische Inflammation zurückzuführen sein.

Um eine Einschätzung der Probiotikintervention in den Formulagruppen vorzunehmen, wurden diese miteinander in Tabelle 4.2 schematisch verglichen, jedoch ausschließlich im Bezug zueinander:

Tab. 4.2: Schematischer Vergleich der Parameterveränderungen zwischen den Formulagruppen nach vier Lebensmonaten

| | FF-Pro | FF-Pla |
|------------------------------|--------|--------|
| pH-Wert | ↔ | ↔ |
| sIgA | ↑ | ↓ |
| α 1-AT | ↔ | ↔ |
| Calprotectin | ↑ | ↓ |
| Respiratorische Erkrankungen | ↔ | ↔ |
| Kolik/Blähungen | ↓ | ↑ |
| unerwünschte Ereignisse | ↓ | ↑ |

Die Pfeile stellen die Parameterveränderungen hinsichtlich einer Reduktion (↓) bzw. eines Anstieges (↑) im deskriptiven Vergleich untereinander dar. ↔ entspricht keinem Unterschied der Parameter untereinander. grün = positive Veränderung, rot = negative Veränderung, schwarz = keine Interpretation möglich

Wenngleich die Behandlung mit *B. lactis* den Effekt einer Muttermilchernährung nicht erreichen kann, zeigen sich in der näheren Betrachtung der Daten untereinander doch interessante Unterschiede. So sind die durchschnittlichen sIgA-Werte der *B. lactis*-behandelten Gruppe nach vier Lebensmonaten höher und der Anteil der Kinder mit Blähungen und/oder Koliken geringer, sowie der Probandenanteil mit unerwünschten Ereignissen niedriger. Diese Unterschiede sind nicht signifikant, weisen jedoch auf eine insgesamt positive, immunstimulierende Wirkung der Bifidobakterien bei formulaernährten Kindern hin.

Das Zusammenspiel von Geburtsmodus, Ernährung in den ersten vier Lebensmonaten und der Einfluss einer Supplementation mit dem probiotischen Bakterium *B. lactis* konnte in dieser Dissertation auch Auswirkungen auf die klinische Relevanz dieser synergistischen Einflussfaktoren aufzeigen, wenngleich die Stichprobengröße zur Determinierung von signifikanten Effekten limitierend war, vor allem im Vergleich der entsprechenden Ernährungsgruppen untereinander. Dabei spielt auf klinischer Ebene die nicht vermeidbare Subjektivität der Eltern bezüglich der Dokumentation in den Tagbüchern und der Bewertung der Symptome zusätzlich eine entscheidende Rolle. Dennoch sind die Vorteile des Studiendesigns für diese Dissertation deutlich hervorzuheben im Vergleich zu bereits publizierten Arbeiten. So stellen die definierten Ernährungsgruppen (voll gestillt vs. ausschließlich formulaernährt), die frühzeitige Probiotiksupplementation innerhalb der ersten drei Lebenstage nach Kaiserschnittgeburt, die Rekrutierung einer Referenzgruppe aus vaginal geborenen, voll gestillten Kindern, sowie die Verbindung von Stuhlprobenparameteranalyse und Erkrankungsinzidenzdokumentation eine wesentliche Grundlage zur Determination der einzelnen Effekte dar. Vor allem die konkrete Trennung der Ernährungsformen sowie der Entbindungsarten sollten in der Thematik der Probiotikaforschung größere Beachtung finden, da dies die Ergebnisse entscheidend beeinflussen kann.

Weitere Interventionsmöglichkeiten zur Immunsystemstärkung von per Kaiserschnitt geborenen Säuglingen

Die symbiotische Beziehung zwischen Mensch und Mikroorganismen steht im grundlegenden Zusammenhang mit einer optimalen postnatalen Entwicklung und der Gesunderhaltung bis über die Kindheit hinaus. Dabei wurden uns von der Natur im Laufe der Evolution die besten Startvoraussetzungen mitgegeben, um diesen Synergismus optimal zu entwickeln: eine natürliche, vaginale Geburt und eine ausschließliche Ernährung mit Muttermilch. Kinder, denen ein oder beide Faktoren fehlen, besitzen eine veränderte Darmmikrobiota und damit auch eine höhere Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung von immunologischen und metabolischen Störungen.

In aktuellen Reviews werden dabei die Möglichkeiten der Interventionen diskutiert, die diese negativen Startbedingungen hinsichtlich einer Geburt per Kaiserschnitt potentiell abschwächen können [70, 135]. Dabei werden neben den in dieser Arbeit vorgestellten Möglichkeiten des Stillens und der Probiotikasupplementation weitere, sowohl pränatale Interventionen, wie beispielsweise die maternale Supplementation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren oder Probiotika zur Verbesserung der Vaginal- und Rektalflora sowie des Immunsystems, als auch postnatale Mechanismen, wie das „Vaginal Seeding“ diskutiert (vgl. Abb. 4.2). Dabei wird bei letzterem vorher entnommenes Vaginalsekret der Mutter nach

dem Kaiserschnitt über die Haut des Neugeborenen gewischt und somit der Kontakt zur mütterlichen Vaginalflora bei einer Spontangeburt imitiert. In einer Pilotstudie konnten Dominguez-Bello *et al.* 2016 zeigen, dass per Kaiserschnitt geborene Kinder auf diese Weise mit Vaginalbakterien besiedelt werden konnten [136]. Allerdings sind evidenzbasierte Aussagen darüber hinaus aufgrund fehlender Studien noch nicht möglich. Außerdem besteht die Gefahr einer iatrogenen Infektion durch asymptomatisch enthaltene Pathogene in der mütterlichen Vaginalflora.

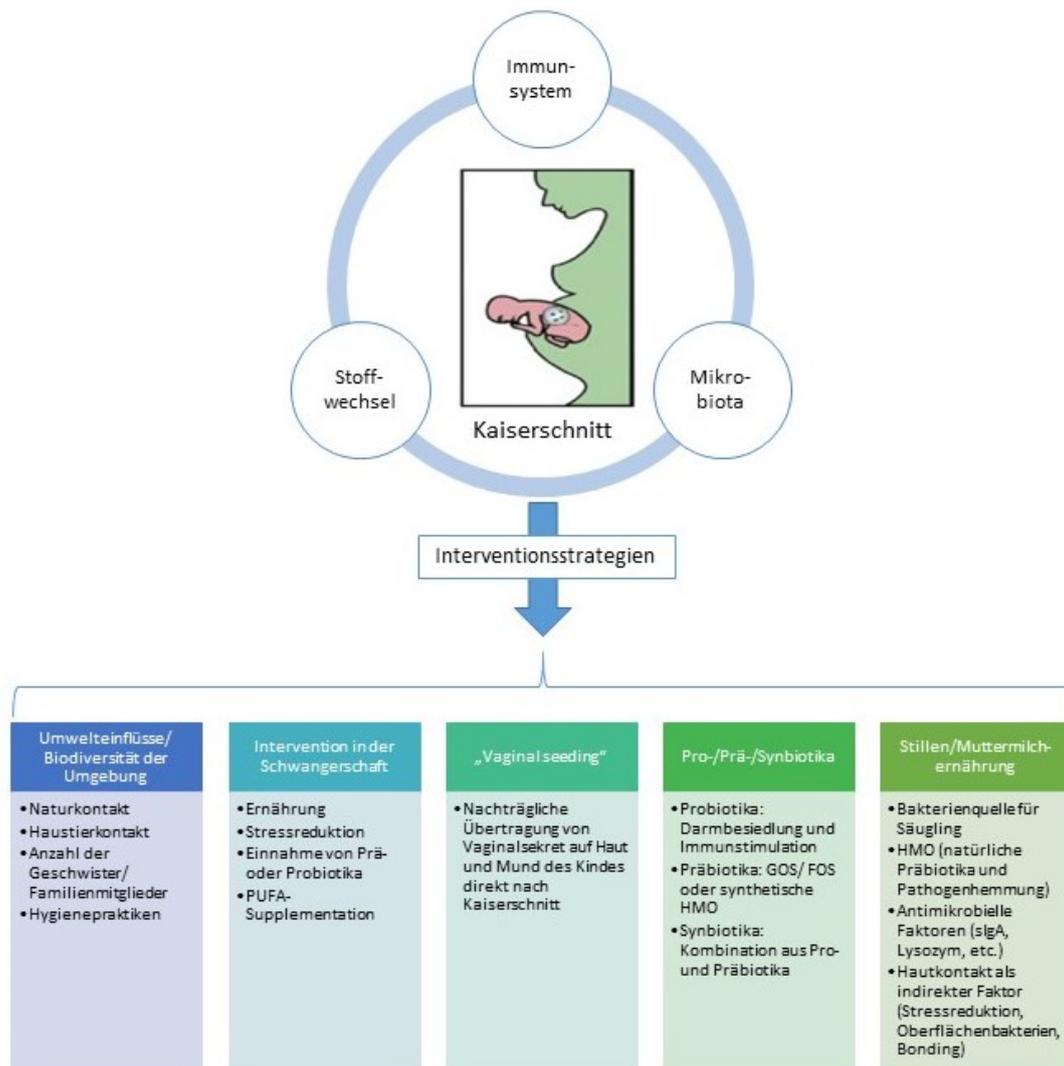


Abb. 4.1: Schematische Darstellung von Interventionsstrategien zur Abschwächung der Effekte einer Entbindung per Kaiserschnitt (modifiziert nach [135])

Dargestellt sind die wesentlichen Ansatzpunkte zur präventiven oder therapeutischen Modulation der Mikrobiotaentwicklung. Eine Geburt per Kaiserschnitt beeinflusst im Wesentlichen die intestinale Darmbesiedlung sowie das Immunsystem und den Metabolismus. Wichtige Maßnahmen sind dahingehend die vorbeugenden Interventionen (Gesunderhaltung in der Schwangerschaft) sowie die nachgeburtlichen Faktoren wie Muttermilchernährung und bei Formulaernährung die Supplementation mit Prä-/Probiotika.

PUFA - mehrfach ungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids), HMO - humane Milcholigosaccharide, GOS/FOS - Galakto-/Fructooligosaccharide

Ein nicht zu unterschätzender Faktor bleibt in der Biodiversität der Umgebung bestehen. So konnte bereits 1989 Strachan in der sogenannten „Hygiene hypothesis“ feststellen, dass die abnehmende Familiengröße und der höhere Hygienestandard aufgrund der reduzierten Keimexposition mit einer steigenden Anzahl von immunologischen Erkrankungen einhergehen [137]. Ein Kontakt mit möglichst vielen natürlichen Bakterien und der Verzicht auf übertriebene Hygienepraktiken, wie der übermäßigen Verwendung von Desinfektionsmitteln, sollten demzufolge in den ersten Lebensjahren ermöglicht werden. Zusätzlich ist auch der pränatale Gesundheitsstatus der werdenden Mutter essentiell für die Grundlagenbildung einer möglichst natürlichen Darmmikrobiota beim Kind. So konnten in der Muttermilch allergischer Frauen signifikant geringere Bifidobakterienanzahlen nachgewiesen werden im Vergleich zu nicht allergischen Frauen [138]. Außerdem verändert sich beispielsweise auch das Mikrobiom der Muttermilch während der Laktation [139]. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Muttermilch übergewichtiger Frauen eine geringere Bakteriendiversität aufweist im Vergleich zur Milch von normalgewichtigen Müttern. Außerdem wurden auch Unterschiede zwischen Frauen gefunden, die per Wunschkaiserschnitt entbunden wurden, nicht jedoch bei Frauen nach Notkaiserschnitt, im Vergleich zu spontan gebärenden Frauen. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass nicht nur die Operation an sich, sondern auch das Fehlen von physiologischen Stress- und Hormonsignalen die mikrobielle Übertragung in die Milch beeinflussen [139]. Analog dazu konnte in neuesten Untersuchungen gezeigt werden, dass der deutliche Unterschied der mikrobiellen Besiedlung zwischen vaginal und per Sektio geborenen Kindern nicht ausschließlich auf den Transfer von Vaginalbakterien der Mutter zurückzuführen ist, sondern auch andere Faktoren, wie der Wehenprozess, einen möglichen Einfluss auf die kindliche Physiologie besitzt, die zur Entwicklung einer speziellen Mikrobiota führt [140].

Die Komplexität der Mikrobiotaentwicklung und der Immunsystemreifung ist somit zusammenfassend nicht auf einzelne Prozesse zu beschränken, jedoch sind der Entbindungsmodus und die Ernährungsform zentrale Faktoren für die optimale Entwicklung von Säuglingen und Kindern. Die Bedeutung einer physiologischen Zusammensetzung der intestinalen Bakterien macht deutlich, dass mikrobiotabasierte Interventionen prä- sowie postnatal effektive Möglichkeiten zur Verbesserung der kindlichen Gesundheit bieten, wenn eine Sektiogeburt erfolgt und/oder keine Ernährung mit Muttermilch gegeben ist [70]. Dabei ist die Entwicklung von gut geplanten und kontrolliert durchgeführten Studien essentiell, um eindeutige zukünftige Empfehlungen aussprechen zu können. Zusätzlich sollten insgesamt mehr Bemühungen im Gesundheitssystem unternommen werden, um das klinische Outcome der zukünftigen Generationen zu verbessern. Dazu zählen sowohl die Senkung der Kaiserschnittraten bei konstanter Sicherheit für Mutter und Kind, als auch die Verbesserung der Unterstützung für stillende Mütter, vor allem in den ersten Stunden und Tagen nach Sektioentbindung.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Mittels Kaiserschnittentbindung werden in Deutschland derzeit rund 30 % der Kinder zur Welt gebracht. Dabei stellt diese operative Entbindungsmethode einen wesentlichen Einfluss für die postnatale Gastrointestinalbesiedlung sowie die immunologische Entwicklung der Säuglinge dar und ist mit kurz- und langfristigen Risiken verbunden. Eine mögliche Interventionsstrategie nach Sektio stellt die Supplementation von Probiotika dar.

In der vorliegenden Dissertation wurde der Einfluss des probiotischen Bakteriums *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (*B. lactis*) auf fäkale Immun- und Entzündungsmarker sowie auf die Erkrankungsinzidenz von gesunden, reifen, per Kaiserschnitt geborenen Säuglingen in den ersten vier Lebensmonaten untersucht, die entweder gestillt oder mit einer Formulanahrung ernährt wurden. Als Referenz diente eine Gruppe aus vaginal geborenen, voll gestillten Kindern.

Bezüglich der Analyse der Wachstumsparameter und der Nahrungsverträglichkeit ergaben sich keine Unterschiede in den entsprechenden Ernährungsgruppen, sodass eine Behandlung mit *B. lactis* sowohl bei gestillten als auch bei formulaernährten Säuglingen als sicher bewertet werden kann.

Eine *B. lactis*-Supplementation bei gestillten Kindern führte zu einer deutlichen Reduktion des pH-Wertes, der denen von vaginal geborenen, gestillten Säuglingen entspricht. Gleichzeitig zeigte sich eine knapp 50%ige Erhöhung der sekretorischen Immunglobulin A-Konzentrationen im Vergleich zur Placebo-Stillgruppe sowie zur Referenzgruppe. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Ein Anstieg der Alpha-1-Antitrypsin-Konzentrationen konnte in der *B. lactis*-Stillgruppe analog zur Referenzgruppe analysiert werden, nicht jedoch in der Placebo-Stillgruppe. Aufgrund der ermittelten Unterschiede zwischen den Stillgruppen zeigt sich eine immunstimulierende Wirkung von *B. lactis*, die hinsichtlich des synergistischen Effekts durch die Muttermilchernährung verstärkt wird und somit auch zu einer rund 20%igen Reduktion von Atemwegserkrankungen, sowie einer geringeren Anzahl von unerwünschten Ereignissen in den ersten vier Lebensmonaten führt, wenngleich aufgrund der limitierten Probandenzahlen diese Ergebnisse nur auf deskriptiver Ebene deutlich wurden.

Bezüglich der formulaernährten Gruppen ließ sich feststellen, dass sich im Vergleich zu den gestillten Probanden deutlich erhöhte pH-Werte, niedrigere sIgA-Konzentrationen sowie höhere Alpha-1-Antitrypsin-Konzentrationen ergaben. Diese Unterschiede waren signifikant und zeigen den bedeutenden Einfluss der Muttermilchernährung in der Immunsystem- und Darmpermeabilitätsentwicklung, unabhängig von einer Probiotiksupplementation. Der Effekt von *B. lactis* bei formulaernährten Kindern untereinander zeigte eine Verdopplung der sIgA-

Werte, einen Anstieg der Calprotectinkonzentrationen sowie auf klinischer Ebene eine Reduktion von behandelten Blähungen bzw. Koliken innerhalb der ersten vier Lebensmonate. Diese Unterschiede zeigten keine Signifikanz, jedoch eine Tendenz zur positiven Beeinflussung der gastrointestinalen Besiedlung und einer daraus resultierenden subklinischen Inflammation, die möglicherweise eine protektive Immunstimulierung zufolge hatte.

Vaginal geborene, voll gestillte Kinder dienten in diesem exploratorischen Vergleich als Goldstandard zu den untersuchten Studiengruppen und zeigten durchschnittlich die niedrigsten pH-Werte und Calprotectinkonzentrationen sowie keinerlei Auftreten von medikamentös behandelten Blähungen bzw. Koliken als eine der häufigsten Beschwerden von Säuglingen in den ersten Lebensmonaten. Der ausschließliche Unterschied des Geburtsmodus zeigte im Vergleich zur Placebo-Stillgruppe, dass ein Kaiserschnitt mit leicht erhöhten pH-Werten sowie einer signifikant höheren Wahrscheinlichkeit von behandlungsbedürftigen Blähungen bzw. Koliken in Verbindung steht. Eine Probiotikeneinnahme von *B. lactis* kann diese Effekte bei gestillten Kindern neutralisieren sowie darüber hinaus das immunologische Profil anhand der fäkalen Messparameter verbessern. Diese Fähigkeit der Bifidobakterien ließ sich in abgeschwächter Form auch bei formulaernährten Kindern nachweisen, jedoch bleibt der Einfluss der Muttermilchernährung limitierend und kann durch eine probiotische Säuglingsnahrung bei per Kaiserschnitt geborenen Säuglingen nicht imitiert werden.

Diese Dissertation bietet eine umfassende Analyse des Einflusses von *B. lactis* auf fäkale und klinische Parameter bei gestillten sowie formulaernährten Kindern in den ersten vier Lebensmonaten nach Kaiserschnittgeburt. Der Vergleich zu vaginal geborenen, voll gestillten Kindern zeigt darüber hinaus den Effekt des Geburtsmodus an sich, jedoch sind die Ergebnisse hinsichtlich der begrenzten Probandenzahlen als exploratorisch zu bewerten und müssen in größeren Studien bestätigt werden. Dabei liegt die Bedeutung vor allem auf einer klar definierten Unterteilung der Ernährungsform. Des Weiteren scheint es sinnvoll, die fäkalen Untersuchungsparameter zu erweitern, so könnte die Analyse von Bakterienanzahlen weitere interessante Forschungsergebnisse liefern.

Zur Gesunderhaltung der zukünftigen Generationen gilt es jedoch letztendlich die Kaiserschnittsraten bei konstanter Sicherheit für Mutter und Kind gering zu halten sowie die Bedeutung des Stillens in der Gesellschaft weiter zu unterstreichen und Mütter unmittelbar postpartal diesbezüglich zu unterstützen, da Muttermilch den größten Schutzfaktor vor immunologischen Dysbalancen und daraus resultierenden Erkrankungen darstellt.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Statistisches Bundesamt. Die 20 häufigsten Operationen insgesamt: Vollstationär behandelte Patientinnen und Patienten in Krankenhäuser 2017. URL: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Krankenhaeuser/Tabellen/DRGOperationenInsgesamt.html> [Stand am 18.02.2019].
2. Rettberg F. Die Stunde des Kastrators. 1500 gelingt der erste Kaiserschnitt, den Mutter und Kind überleben. 2009; Spiegel Geschichte, Heft 05: S. 65.
3. Kraatz H. Der Wittenberger Kaiserschnitt des Jeremias Trautmann im Jahre 1610; eine historische Reminiszenz. Dtsch Gesundheitsw 1958; 13(5): 169–72.
4. Betran AP, Torloni MR, Zhang JJ, Gülmezoglu AM. WHO Statement on Caesarean Section Rates. BJOG 2016; 123(5): 667–70.
5. Boerma T, Ronsmans C, Melesse DY et al. Global epidemiology of use of and disparities in caesarean sections. The Lancet 2018; 392(10155): 1341–8.
6. Ye J, Zhang J, Mikolajczyk R et al. Association between rates of caesarean section and maternal and neonatal mortality in the 21st century: a worldwide population-based ecological study with longitudinal data. BJOG 2016; 123(5): 745–53.
7. Statistisches Bundesamt. Grunddaten der Krankenhäuser - Fachserie 12 Reihe 6.1.1 - 2017.
8. EURO-PERISTAT Project. European Perinatal Health Report. Health and Care of Pregnant Women and Babies in Europe in 2010 2013.
9. Lutz U, Kolip P, Glaeske G. Die GEK-Kaiserschnittstudie. Sankt Augustin: Asgard; 2006.
10. Mylonas I, Friese K. Indications for and Risks of Elective Cesarean Section. Dtsch Arztebl Int 2015; 112(29-30): 489–95.
11. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. Absolute und relative Indikationen zur Sectio caesarea und zur Frage der sogenannten Sectio auf Wunsch (015/054) 2010.
12. Hansen AK, Wisborg K, Ulbjerg N, Henriksen TB. Risk of respiratory morbidity in term infants delivered by elective caesarean section: cohort study. BMJ 2008; 336(7635): 85–7.

13. Tita ATN, Landon MB, Spong CY et al. Timing of elective repeat cesarean delivery at term and neonatal outcomes. *N Engl J Med* 2009; 360(2): 111–20.
14. Thavagnanam S, Fleming J, Bromley A et al. A meta-analysis of the association between Caesarean section and childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 2008; 38(4): 629–33.
15. Cardwell CR, Stene LC, Joner G et al. Caesarean section is associated with an increased risk of childhood-onset type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Diabetologia* 2008; 51(5): 726–35.
16. Hakansson S, Kallen K. Caesarean section increases the risk of hospital care in childhood for asthma and gastroenteritis. *Clin Exp Allergy* 2003; 33(6): 757–64.
17. Laubereau B, Filipiak-Pittroff B, Berg A von et al. Caesarean section and gastrointestinal symptoms, atopic dermatitis, and sensitisation during the first year of life. *Arch Dis Child* 2004; 89(11): 993–7.
18. Bager P, Wohlfahrt J, Westergaard T. Caesarean delivery and risk of atopy and allergic disease: meta-analyses. *Clin Exp Allergy* 2008; 38(4): 634–42.
19. Decker E, Hornef M, Stockinger S. Cesarean delivery is associated with celiac disease but not inflammatory bowel disease in children. *Gut Microbes* 2011; 2(2): 91–8.
20. Mesquita DN, Barbieri MA, Goldani HAS et al. Cesarean Section Is Associated with Increased Peripheral and Central Adiposity in Young Adulthood: Cohort Study. *PLoS ONE* 2013; 8(6): e66827.
21. Eggesbø M, Botten G, Stigum H et al. Is delivery by cesarean section a risk factor for food allergy? *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112(2): 420–6.
22. Liu S, Liston RM, Joseph KS et al. Maternal mortality and severe morbidity associated with low-risk planned cesarean delivery versus planned vaginal delivery at term. *CMAJ* 2007; 176(4): 455–60.
23. Holmgren CM. Uterine rupture associated with VBAC. *Clin Obstet Gynecol* 2012; 55(4): 978–87.
24. van Ham MA, van Dongen PW, Mulder J. Maternal consequences of caesarean section. A retrospective study of intra-operative and postoperative maternal complications of caesarean section during a 10-year period. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1997; 74(1): 1–6.

25. Keag OE, Norman JE, Stock SJ. Long-term risks and benefits associated with cesarean delivery for mother, baby, and subsequent pregnancies: Systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 2018; 15(1): e1002494.
26. Zanardo V, Soldera G, Volpe F et al. Influence of elective and emergency cesarean delivery on mother emotions and bonding. *Early Hum Dev* 2016; 99: 17–20.
27. Holzapfel WH, Haberer P, Snel J et al. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 41(2): 85–101.
28. Guarner F, Malagelada J-R. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361(9356): 512–9.
29. Neu J, Rushing J. Cesarean versus vaginal delivery: long-term infant outcomes and the hygiene hypothesis. *Clin Perinatol* 2011; 38(2): 321–31.
30. Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P et al. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* 2001; 73(2 Suppl): 444S-450S.
31. Grönlund MM, Arvilommi H, Kero P et al. Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0-6 months. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000; 83(3): F186-92.
32. Brandtzaeg P, Halstensen TS, Kett K et al. Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 1989; 97(6): 1562–84.
33. Björkstén B. Effects of intestinal microflora and the environment on the development of asthma and allergy. *Springer Semin Immunopathol* 2004; 25(3-4): 257–70.
34. Wampach L, Heintz-Buschart A, Hogan A et al. Colonization and Succession within the Human Gut Microbiome by Archaea, Bacteria, and Microeukaryotes during the First Year of Life. *Front Microbiol* 2017; 8: 738.
35. Houghteling PD, Walker WA. Why is initial bacterial colonization of the intestine important to infants' and children's health? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2015; 60(3): 294–307.
36. Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC et al. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut* 2014; 63(4): 559–66.

37. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(26): 11971–5.
38. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y et al. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe* 2015; 17(5): 690–703.
39. Makino H, Kushiro A, Ishikawa E et al. Mother-to-infant transmission of intestinal bifidobacterial strains has an impact on the early development of vaginally delivered infant's microbiota. *PLoS ONE* 2013; 8(11): e78331.
40. Aagaard K, Ma J, Antony KM et al. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* 2014; 6(237): 237ra65.
41. Funkhouser LJ, Bordenstein SR. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. *PLoS Biol* 2013; 11(8): e1001631.
42. Martin R, Makino H, Cetinyurek Yavuz A et al. Early-Life Events, Including Mode of Delivery and Type of Feeding, Siblings and Gender, Shape the Developing Gut Microbiota. *PLoS ONE* 2016; 11(6): e0158498.
43. Perez-Muñoz ME, Arrieta M-C, Ramer-Tait AE, Walter J. A critical assessment of the "sterile womb" and "in utero colonization" hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome* 2017; 5(1): 48.
44. Stark PL, Lee A. The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. *J Med Microbiol* 1982; 15(2): 189–203.
45. Penders J, Thijs C, Vink C et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 2006; 118(2): 511–21.
46. Salminen S, Tang M. 1.8 Gut Microbiota in Infants. In: Koletzko B, Cooper P (Hrsg.). *Pediatric nutrition in practice*. Basel, New York: KARGER; 2008, 80–84.
47. Huurre A, Kalliomäki M, Rautava S et al. Mode of delivery - effects on gut microbiota and humoral immunity. *Neonatology* 2008; 93(4): 236–40.
48. Grönlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 28(1): 19–25.
49. Rutayisire E, Huang K, Liu Y, Tao F. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. *BMC Gastroenterol* 2016; 16(1): 86.

50. Laursen MF, Zachariassen G, Bahl MI et al. Having older siblings is associated with gut microbiota development during early childhood. *BMC Microbiol* 2015; 15: 154.
51. Nermes M, Endo A, Aarnio J et al. Furry pets modulate gut microbiota composition in infants at risk for allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 136(6): 1688-1690.e1.
52. Azad MB, Konya T, Maughan H et al. Infant gut microbiota and the hygiene hypothesis of allergic disease: impact of household pets and siblings on microbiota composition and diversity. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2013; 9(1): 15.
53. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB et al. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* 2007; 5(7): e177.
54. Vestermark V, Høgdall CK, Birch M et al. Influence of the mode of delivery on initiation of breast-feeding. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991; 38(1): 33–8.
55. Prior E, Santhakumaran S, Gale C et al. Breastfeeding after cesarean delivery: a systematic review and meta-analysis of world literature. *Am J Clin Nutr* 2012; 95(5): 1113–35.
56. Field CJ. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *J Nutr* 2005; 135(1): 1–4.
57. Karav S, Le Parc A, Leite Nobrega de Moura Bell JM et al. Oligosaccharides Released from Milk Glycoproteins Are Selective Growth Substrates for Infant-Associated Bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol* 2016; 82(12): 3622–30.
58. Gueimonde M, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E. Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology* 2007; 92(1): 64–6.
59. Latuga MS, Stuebe A, Seed PC. A review of the source and function of microbiota in breast milk. *Semin Reprod Med* 2014; 32(1): 68–73.
60. Jantscher-Krenn E, Bode L. Human milk oligosaccharides and their potential benefits for the breast-fed neonate. *Minerva Pediatr* 2012; 64(1): 83–99.
61. Brand-Miller JC, McVeagh P, McNeil Y, Messer M. Digestion of human milk oligosaccharides by healthy infants evaluated by the lactulose hydrogen breath test. *J Pediatr* 1998; 133(1): 95–8.
62. Asakuma S, Hatakeyama E, Urashima T et al. Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria. *J Biol Chem* 2011; 286(40): 34583–92.

63. Chichlowski M, Lartigue G de, German JB et al. Bifidobacteria isolated from infants and cultured on human milk oligosaccharides affect intestinal epithelial function. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 55(3): 321–7.
64. Duijts L, Jaddoe VVW, Hofman A, Moll HA. Prolonged and exclusive breastfeeding reduces the risk of infectious diseases in infancy. *Pediatrics* 2010; 126(1): e18-25.
65. Kull I, Almqvist C, Lilja G et al. Breast-feeding reduces the risk of asthma during the first 4 years of life. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(4): 755–60.
66. Kull I, Böhme M, Wahlgren C-F et al. Breast-feeding reduces the risk for childhood eczema. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116(3): 657–61.
67. Catassi C, Bonucci A, Coppa GV et al. Intestinal permeability changes during the first month: effect of natural versus artificial feeding. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995; 21(4): 383–6.
68. Penders J, Vink C, Driessen C et al. Quantification of Bifidobacterium spp., Escherichia coli and Clostridium difficile in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 243(1): 141–7.
69. Biasucci G, Benenati B, Morelli L et al. Cesarean delivery may affect the early biodiversity of intestinal bacteria. *J Nutr* 2008; 138(9): 1796S-1800S.
70. Francavilla R, Cristofori F, Tripaldi ME, Indrio F. Intervention for Dysbiosis in Children Born by C-Section. *Ann Nutr Metab* 2018; 73 Suppl 3: 33–9.
71. Isolauri E, Rautava S, Salminen S. Probiotics in the development and treatment of allergic disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2012; 41(4): 747–62.
72. Di Mauro A, Neu J, Riezzo G et al. Gastrointestinal function development and microbiota. *Ital J Pediatr* 2013; 39: 15.
73. Weng M, Walker WA. The role of gut microbiota in programming the immune phenotype. *J Dev Orig Health Dis* 2013; 4(3): 203–14.
74. Tsai Y-T, Cheng P-C, Pan T-M. The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012; 96(4): 853–62.
75. Sudo N, Sawamura S, Tanaka K et al. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J Immunol* 1997; 159(4): 1739–45.

76. Food and Agriculture Organization and World Health Organization. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria 2001.
77. Hill C, Guarner F, Reid G et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014; 11(8): 506–14.
78. Guandalini S. Probiotics for prevention and treatment of diarrhea. *J Clin Gastroenterol* 2011; 45 Suppl: S149-53.
79. Bezkorovainy A. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am J Clin Nutr* 2001; 73(2 Suppl): 399S-405S.
80. Huang Y, Shao XM, Neu J. Immunonutrients and neonates. *Eur J Pediatr* 2003; 162(3): 122–8.
81. Wall R, Ross RP, Ryan CA et al. Role of gut microbiota in early infant development. *Clin Med Pediatr* 2009; 3: 45–54.
82. Savilahti E, Kukkonen K, Kuitunen M. Probiotics in the treatment and prevention of allergy in children. *World Allergy Organ J* 2009; 2(5): 69–76.
83. Goldenberg JZ, Yap C, Lytvyn L et al. Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev* 2017; 12: CD006095.
84. Lin H-C, Hsu C-H, Chen H-L et al. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight preterm infants: a multicenter, randomized, controlled trial. *Pediatrics* 2008; 122(4): 693–700.
85. Deshpande G, Rao S, Patole S, Bulsara M. Updated meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates. *Pediatrics* 2010; 125(5): 921–30.
86. Rautava S, Salminen S, Isolauri E. Specific probiotics in reducing the risk of acute infections in infancy--a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr* 2009; 101(11): 1722–6.
87. Rinne M, Kalliomaki M, Arvilommi H et al. Effect of probiotics and breastfeeding on the bifidobacterium and lactobacillus/enterococcus microbiota and humoral immune responses. *J Pediatr* 2005; 147(2): 186–91.

88. Chr. Hansen. Bifidobacterium (BB-12®); 2019. URL: <https://www.chr-hansen.com/de/probiotic-supplements-and-infant-formula/cards/product-cards/bifidobacterium-animalis-subsp-lactis-bb-12> [Stand am 14.02.2019].
89. Jungersen M, Wind A, Johansen E et al. The Science behind the Probiotic Strain Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12(®). *Microorganisms* 2014; 2(2): 92–110.
90. Garrigues C, Johansen E, Pedersen MB. Complete genome sequence of Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12, a widely consumed probiotic strain. *J Bacteriol* 2010; 192(9): 2467–8.
91. Rinkinen M, Westermarck E, Salminen S, Ouwehand AC. Absence of host specificity for in vitro adhesion of probiotic lactic acid bacteria to intestinal mucus. *Vet Microbiol* 2003; 97(1-2): 55–61.
92. Palaria A, Johnson-Kanda I, O'Sullivan DJ. Effect of a synbiotic yogurt on levels of fecal bifidobacteria, clostridia, and enterobacteria. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78(4): 933–40.
93. Larsen CN, Nielsen S, Kaestel P et al. Dose-response study of probiotic bacteria Bifidobacterium animalis subsp lactis BB-12 and Lactobacillus paracasei subsp paracasei CRL-341 in healthy young adults. *Eur J Clin Nutr* 2006; 60(11): 1284–93.
94. Saavedra JM, Abi-Hanna A, Moore N, Yolken RH. Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. *Am J Clin Nutr* 2004; 79(2): 261–7.
95. Taipale T, Pienihäkkinen K, Isolauri E et al. Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12 in reducing the risk of infections in infancy. *Br J Nutr* 2011; 105(3): 409–16.
96. Isolauri E, Arvola T, Sütas Y et al. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy* 2000; 30(11): 1604–10.
97. Fukushima Y, Kawata Y, Hara H et al. Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *Int J Food Microbiol* 1998; 42(1-2): 39–44.
98. Kabeerdoss J, Devi RS, Mary RR et al. Effect of yoghurt containing Bifidobacterium lactis Bb12® on faecal excretion of secretory immunoglobulin A and human beta-defensin 2 in healthy adult volunteers. *Nutr J* 2011; 10: 138.
99. Mohan R, Koebnick C, Schildt J et al. Effects of Bifidobacterium lactis Bb12 supplementation on body weight, fecal pH, acetate, lactate, calprotectin, and IgA in preterm infants. *Pediatr Res* 2008; 64(4): 418–22.

100. Radke M, Picaud J-C, Loui A et al. Starter formula enriched in prebiotics and probiotics ensures normal growth of infants and promotes gut health: a randomized clinical trial. *Pediatr Res* 2017; 81(4): 622–31.
101. Cohen J. Statistical Power Analysis. *Curr Dir Psychol Sci* 1992; 1(3): 98–101.
102. World Health Organization. Indicators for assessing breastfeeding practices 1991; WHO/CDD/SER/91.14, Corr. 1.
103. Apgar V. A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. *Curr Res Anesth Analg* 1953; 32(4): 260–7.
104. Thavarajah H, Flatley C, Kumar S. The relationship between the five minute Apgar score, mode of birth and neonatal outcomes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2018; 31(10): 1335–41.
105. Gartner LM, Morton J, Lawrence RA et al. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* 2005; 115(2): 496–506.
106. WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age. *Acta Paediatr Suppl* 2006; 450: 76–85.
107. Nelson SE, Rogers RR, Ziegler EE, Fomon SJ. Gain in weight and length during early infancy. *Early Hum Dev* 1989; 19(4): 223–39.
108. Çamurdan AD, Beyazova U, Özkan S, Tunç VT. Defecation patterns of the infants mainly breastfed from birth till the 12th month: Prospective cohort study. *Turk J Gastroenterol* 2014; 25 Suppl 1: 1–5.
109. Bullen CL, Tearle PV, Willis AT. Bifidobacteria in the intestinal tract of infants: an in-vivo study. *J Med Microbiol* 1976; 9(3): 325–33.
110. Rinne MM, Gueimonde M, Kalliomäki M et al. Similar bifidogenic effects of prebiotic-supplemented partially hydrolyzed infant formula and breastfeeding on infant gut microbiota. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 43(1): 59–65.
111. Holscher HD, Czerkies LA, Cekola P et al. Bifidobacterium lactis Bb12 enhances intestinal antibody response in formula-fed infants: a randomized, double-blind, controlled trial. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2012; 36(1 Suppl): 106S-17S.
112. Ventura M, Turrone F, Motherway MO'C et al. Host-microbe interactions that facilitate gut colonization by commensal bifidobacteria. *Trends Microbiol* 2012; 20(10): 467–76.
113. Brandtzaeg P. Role of secretory antibodies in the defence against infections. *Int J Med Microbiol* 2003; 293(1): 3–15.

114. Lisowska-Myjak B, Pachecka J. Alpha-1-antitrypsin and IgA in serial meconium and faeces of healthy breast-fed newborns. *Fetal Diagn Ther* 2007; 22(2): 116–20.
115. Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30(1): 61–7.
116. Rinne M, Kalliomäki M, Salminen S, Isolauri E. Probiotic intervention in the first months of life: short-term effects on gastrointestinal symptoms and long-term effects on gut microbiota. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 43(2): 200–5.
117. Oswari H, Prayitno L, Dwipoerwantoro PG et al. Comparison of stool microbiota compositions, stool alpha1-antitrypsin and calprotectin concentrations, and diarrhoeal morbidity of Indonesian infants fed breast milk or probiotic/prebiotic-supplemented formula. *J Paediatr Child Health* 2013; 49(12): 1032–9.
118. van der Sluys Veer A, Biemond I, Verspaget HW, Lamers CB. Faecal parameters in the assessment of activity in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1999; 230: 106–10.
119. Crossley JR, Elliott RB. Simple method for diagnosing protein-losing enteropathies. *Br Med J* 1977; 1(6058): 428–9.
120. Keller KM, Knobel R, Ewe K. Fecal alpha 1-antitrypsin in newborn infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 24(3): 271–5.
121. Woodruff C, Fabacher D, Latham C. Fecal alpha 1-antitrypsin and infant feeding. *J Pediatr* 1985; 106(2): 228–32.
122. Kukkonen K, Kuitunen M, Haahtela T et al. High intestinal IgA associates with reduced risk of IgE-associated allergic diseases. *Pediatr Allergy Immunol* 2010; 21(1 Pt 1): 67–73.
123. Davidson LA, Lönnerdal B. Fecal Alpha 1 -Antitrypsin in Breast-Fed Infants Is Derived from Human Milk and Is not Indicative of Enteric Protein Loss. *Acta Paediatrica* 1990; 79(2): 137–41.
124. Stratiki Z, Costalos C, Sevastiadou S et al. The effect of a bifidobacter supplemented bovine milk on intestinal permeability of preterm infants. *Early Hum Dev* 2007; 83(9): 575–9.
125. Fagerhol MK, Dale I, Andersson T. A radioimmunoassay for a granulocyte protein as a marker in studies on the turnover of such cells. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1980; 16 Suppl: 273–82.

126. Steinbakk M, Naess-Andresen CF, Lingaas E et al. Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet* 1990; 336(8718): 763–5.
127. Laserna-Mendieta EJ, Lucendo AJ. Faecal calprotectin in inflammatory bowel diseases: a review focused on meta-analyses and routine usage limitations. *Clin Chem Lab Med* 2019.
128. Kapel N, Campeotto F, Kalach N et al. Faecal calprotectin in term and preterm neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010; 51(5): 542–7.
129. Campeotto F, Butel MJ, Kalach N et al. High faecal calprotectin concentrations in newborn infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004; 89(4): F353-5.
130. Lee YM, Min C-Y, Choi YJ, Jeong SJ. Delivery and feeding mode affects fecal calprotectin levels in infants <7months old. *Early Hum Dev* 2017; 108: 45–8.
131. Savino F, Castagno E, Calabrese R et al. High faecal calprotectin levels in healthy, exclusively breast-fed infants. *Neonatology* 2010; 97(4): 299–304.
132. Mohan R, Koebnick C, Schildt J et al. Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study. *J Clin Microbiol* 2006; 44(11): 4025–31.
133. Brenner DM, Moeller MJ, Chey WD, Schoenfeld PS. The utility of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2009; 104(4): 1033-49; quiz 1050.
134. Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. Perioperative Antibiotika-Prophylaxe AWMF-Nr. 029/022 2010.
135. Moya-Pérez A, Luczynski P, Renes IB et al. Intervention strategies for cesarean section-induced alterations in the microbiota-gut-brain axis. *Nutr Rev* 2017; 75(4): 225–40.
136. Dominguez-Bello MG, Jesus-Laboy KM de, Shen N et al. Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nat Med* 2016; 22(3): 250–3.
137. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989; 299(6710): 1259–60.
138. Grönlund M-M, Gueimonde M, Laitinen K et al. Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the *Bifidobacterium* microbiota in infants at risk of allergic disease. *Clin Exp Allergy* 2007; 37(12): 1764–72.

139. Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K et al. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr* 2012; 96(3): 544–51.
140. Sakwinska O, Foata F, Berger B et al. Does the maternal vaginal microbiota play a role in seeding the microbiota of neonatal gut and nose? *Benef Microbes* 2017; 8(5): 763–78.

ANHANG**Zutatenliste Studiennahrung:**

Milchzucker, pflanzliches Öl (Sonnenblumenöl, Rapsöl) in veränderlichen Gewichtsanteilen, hydrolysiertes Molkeeiweiss, pflanzliches Fett (Kokosfett, Palmfett) in veränderlichen Gewichtsanteilen, Calciumorthophosphate, Magnesiumchlorid, Kaliumhydroxid, Kaliumchlorid, Fischöl, L-Arginin, Kaliumorthophosphate, Öl aus *Mortierella alpina*, Natriumhydroxid, Vitaminmischung (Vitamin C, Niacin, Pantothenensäure, Vitamin E, Vitamin B2 (Riboflavin), Vitamin A, Vitamin B1 (Thiamin), Vitamin B6, Folsäure, Vitamin K, Biotin, Vitamin D, Vitamin B12), L-Histidin, Natriumchlorid, L-Tyrosin, Cholin tartrat, Säureregulator Citronensäure, Taurin, Inositol, Eisensulfat, Nukleotide (Cytidin-5-monophosphat, Uridin-5-monophosphat, Adenosin-5-monophosphat, Guanosin-5-monophosphat), L-Carnitin, Zinksulfat, Kupfersulfat, Mangansulfat, Kaliumjodid, Natriumselenat

Mittelwerte (M) und Standardabweichungen (SD) der Körpergewichte an V0, V1, V3 und V5

| Körpergewicht in kg (M ± SD) | BF-Pro n = 10 | BF-Pla n = 13 | FF-Pro n = 9 | FF-Pla n = 9 | REF n = 8 |
|------------------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|--------------|
| V0 | 3,40 ± 0,38 | 3,52 ± 0,39 | 3,58 ± 0,47 | 3,50 ± 0,31 | 3,39 ± 0,28 |
| V1 | 3,19 ± 0,35 | 3,34 ± 0,38 | 3,37 ± 0,47 | 3,36 ± 0,33 | 3,18 ± 0,25 |
| V3 | 4,30 ± 0,42 | 4,52 ± 0,51 | 4,15 ± 0,64 | 4,32 ± 0,37 | 4,57 ± 0,45 |
| V5 | 6,90 ± 1,15 | 6,72 ± 0,75 | 6,61 ± 0,75 | 6,42 ± 0,71 | 6,45 ± 0,52 |

Mittelwerte (M) und Standardabweichungen (SD) der Körperlängen an V0, V3 und V5

| Körperlänge in cm (M ± SD) | BF-Pro n = 10 | BF-Pla n = 13 | FF-Pro n = 9 | FF-Pla n = 9 | REF n = 8 |
|----------------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|--------------|
| V0 | 49,30 ± 2,50 | 50,00 ± 2,20 | 49,33 ± 2,50 | 49,67 ± 1,80 | 50,00 ± 0,76 |
| V3 | 54,00 ± 3,08 | 54,06 ± 2,42 | 53,06 ± 2,54 | 54,17 ± 2,21 | 55,38 ± 1,60 |
| V5 | 63,35 ± 3,46 | 63,92 ± 2,77 | 64,00 ± 2,61 | 63,83 ± 1,87 | 62,19 ± 2,72 |

Mittelwerte (M) und Standardabweichungen (SD) der Kopfumfänge an V0, V3 und V5

| Kopfumfang in cm (M ± SD) | BF-Pro n = 10 | BF-Pla n = 13 | FF-Pro n = 9 | FF-Pla n = 9 | REF n = 8 |
|---------------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|--------------|
| V0 | 35,55 ± 1,38 | 35,38 ± 0,98 | 35,22 ± 1,33 | 35,11 ± 1,19 | 35,56 ± 1,12 |
| V3 | 37,65 ± 1,49 | 37,51 ± 1,07 | 36,78 ± 1,44 | 37,00 ± 1,00 | 37,56 ± 1,05 |
| V5 | 41,65 ± 1,81 | 41,81 ± 1,09 | 41,11 ± 1,24 | 41,11 ± 1,34 | 41,13 ± 1,03 |

Aus datenschutzrechtlichen Gründen werden Danksagung, Lebenslauf und Eidesstattliche Erklärung nicht veröffentlicht.