

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

betreut am  
Dr. Senckenbergisches Institut für Pathologie  
Direktor: Prof. Dr. Peter Wild

**Prognose des postoperativen klinischen Verlaufs von  
Neugeborenen nach chirurgischem Eingriff bei  
Nekrotisierender Enterokolitis – Ist die histologische  
Untersuchung des Operationspräparates hilfreich?**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Ole Schickedanz

aus Offenbach am Main

Frankfurt am Main, 2024

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	Prof. Dr. Peter Wild
Koreferent:	Prof. Dr. Henning C. Fiegel
Tag der mündlichen Prüfung:	27.08.2024

# Inhaltsverzeichnis

Vorwort	5
Tabellenverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung – Die Nekrotisierende Enterokolitis	10
1.1 Epidemiologie und Inzidenz	10
1.2 Pathogenese	11
1.2.1 Intestinale Unreife	11
1.2.2 Hypoxien im Splanchnikusgebiet	11
1.2.3 Bakterielle Fehlbesiedlung	12
1.2.4 Die Rolle des Toll-like-Receptors	13
1.3 Therapiestrategien	14
1.4 Pathologie der Nekrotisierenden Enterokolitis	15
1.5 Differenzialdiagnosen	17
2 Patient:innen, Material & Methoden	18
2.1 Patient:innen	18
2.2 Klinische Befunde	18
2.3 Histopathologische Befundung	19
2.4 Datensammlung und statistische Analysen	26
3 Ergebnisse	27
3.1 Klinische Merkmale der Kohorte	27
3.2 Postoperativer klinischer Verlauf	29
3.3 Mikrobiologische Befunde	30
3.4 Histopathologische Befunde	31
3.5 Zusammenhangsanalyse	34

3.6	Time-to-Event-Analyse	42
4	Diskussion	44
4.1	Charakteristik der Kohorte	44
4.2	Klinischer Verlauf	45
4.3	Histopathologische Befunde	47
4.4	Zusammenhangsanalyse	53
4.5	Limitationen	58
4.6	Schlussfolgerung und Ausblick	59
5	Zusammenfassung	60
6	Summary	62
7	Anhang	64
8	Literaturverzeichnis	69
9	Schriftliche Erklärung	76
10	Lebenslauf	74

## Vorwort

Ein Teil dieser Arbeit wurde bereits auf der *105. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* und auf der gemeinsamen Tagung der AG Paidopathologie und der Fachgesellschaft für Kinderpathologie e.V. als Vortrag unter dem Namen *Prognosis of the postoperative clinical course of neonates after surgery for necrotizing enterocolitis – Is the histological examination of the surgical specimen helpful?* präsentiert.

Ein Artikel zu dieser Arbeit ist in Arbeit und wird langfristig einem Journal eingereicht.

In dieser Arbeit wird eine gendergerechte Sprache verwendet. Der Doppelpunkt (:) berücksichtigt alle sozialen Geschlechter und Geschlechtsidentitäten.

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Demographische Angaben	27
Tabelle 2 Postoperativer Verlauf	29
Tabelle 3 Diagnosen und Komplikationen	30
Tabelle 4 Histopathologische Befunde der Schnittpräparate der ersten OP	32
Tabelle 5 Histopathologische Befunde der Resektionspräparate der zweiten OP	32
Tabelle 6 Häufigkeiten der histopathologischen Befunde der Zusatzfärbungen aller Präparate mit Einblutung in den Resektionsrand	34
Tabelle 7 Univariate Zusammenhangsanalyse von allen Patient*innen zwischen postoperativem Verlauf und histopathologischem Befund mit exaktem Test nach Fisher	36
Tabelle 8 Univariate Zusammenhangsanalyse von allen NEC-Patient*innen zwischen postoperativem Verlauf und histopathologischem Befund mit Exaktem Test nach Fisher	38
Tabelle 9 Cox-Regressionsmodell NEC-Patient*innen	40
Tabelle 10 Cox Regression aller Patient*innen	40
Tabelle 11 Univariate Zusammenhangsanalyse CD15-, CD68- und Eisenfärbung und postoperativer Verlauf	41
Tabelle 12 Kreuztabelle: Zusammenhangsanalyse der histopathologischen Befunde aller Fälle und dem postoperativen Verlauf	64
Tabelle 13 Kreuztabelle: Zusammenhangsanalyse der histopathologischen Befunde aller NEC-Fälle und dem postoperativen Verlauf	65
Tabelle 14 Kreuztabelle: Zusammenhangsanalyse zwischen dem histopathologischen Befund der Re-Operationen und dem postoperativen Verlauf	66

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Inzidenz von Nekrotisierender Enterokolitis und Fokaler Intestinaler Perforation (FIP/SIP) unter Berücksichtigung des Gestationsalters (Quelle: Gordon, 2017, Seminars in Perinatology).	10
Abbildung 2 Intraoperativer Befund einer multiplen, segmentalen NEC. Die blauen Linien markieren beispielhaft potenzielle Resektionsränder anhand makroskopischer Gesichtspunkte. Quelle: Prof. Dr. Udo Rolle, Kinderchirurgie Universitätsklinikum Frankfurt am Main	14
Abbildung 3 Lichtmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts des Colons. Eindeutiger Befund mit submucosaler Pneumatosis intestinalis (rote Pfeile) und Perforationsstelle bei Vollwandnekrose (blauer Pfeil). Die Tunica Mucosa lässt sich nicht mehr identifizieren. Die Zellgrenzen der Tunica Muscularis sind vor allem in der rechten Bildseite unscharf. 2-fache Vergrößerung.	16
Abbildung 4 Antimesenteriale Ischämie und Perforation. Exemplarisch an einer FIP.	20
Abbildung 5 Histopathologische Befunde einer NEC. Avitale Tunica Mucosa, teilweise erhaltene Tunica Muscularis. Gestaute Blutgefäße. Linke Bildseite: Vollwandnekrose ohne erkennbare Schichtung. Teilweise perforiert. Fibrin am oberen linken Bildrand als Hinweis auf eine Peritonitis (blaue Pfeile).	21
Abbildung 6 Hämorrhagie (blauer Pfeil) an Perforationsstelle	22
Abbildung 7 Deutliche Stenose mit sichtbarer Lumeneinengung (roter Pfeil) und ausgeprägter submuköser Fibrosierung (blauer Pfeil).	23
Abbildung 8 Immunhistochemische Färbung mittels CD15. 20-fache Vergrößerung.	24
Abbildung 9 Immunhistochemische Färbung mittels CD68. 20-fache Vergrößerung.	24
Abbildung 10 Eisenfärbung. 20-fache Vergrößerung.	25
Abbildung 11 Relative Häufigkeit des Gestationsalters in Wochen	28
Abbildung 12 Relative Häufigkeit des Lebensalters zum Zeitpunkt der Erst-OP	28

Abbildung 14 Time-to-Event-Analyse. Auftreten von Komplikationen in Abhängigkeit von dem Vorliegen von Einblutungen in den Resektionsrand in der Kohorte aller Patient:innen.	43
Abbildung 15 Time-to-Event-Analyse. Auftreten von Komplikationen in Abhängigkeit von dem Vorliegen von Einblutungen in den Resektionsrand in der Kohorte der NEC-Patient:innen.	43
Abbildung 16 Relative Häufigkeit des Geburtsgewichtes in unserer Kohorte	44
Abbildung 17 Gramfärbung. 4x Vergrößerung.	52
Abbildung 18 Gramfärbung. 20-fache Vergrößerung. Keine bakterielle Besiedelung nachweisbar.	52
Abbildung 19 Färbeprotokoll Immunhistochemie CD15-Antikörper	67
Abbildung 20 Färbeprotokoll Immunhistochemie CD68-Antikörper	68

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Vollständiger Name</b>
Abb.	Abbildung
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
Bzw.	beziehungsweise
DIC	Disseminated Intravascular Coagulation
FIP/SIP	Fokale/singuläre intestinale Perforation
HE-Schnitte	Hämatoxylin-Eisen-Schnitte
IQR	Interquartilrange
Kum.	kumuliert
LPS	Lipopolysaccharide
NEC	Nekrotisierende Enterokolitis
OP	Operation
s.	siehe
Sig.	Signifikanz
Tab.	Tabelle
TLR-4	Toll-like-receptor 4
VLBW	Very-low-birth-weight

# 1 Einleitung – Die Nekrotisierende Enterokolitis

Die Nekrotisierende Enterokolitis (NEC) ist eine der häufigsten und schwerwiegendsten Erkrankungen der unreifen Neugeborenen auf der neonatologischen Intensivstation. Erstmals 1825 von Siebold als neonatale gastrointestinale Perforation beschrieben, erhielt sie mehr als 100 Jahre später von Rossier einen präziseren Namen. Er dokumentierte mehrere Fälle einer ulzerativ-nekrotischen Enterokolitis bei Frühgeborenen.<sup>1</sup> Heute wird die NEC als transmurale, nekrotisierende Entzündung der Darmwand von Früh- und Neugeborenen definiert.<sup>2</sup> Dabei kann die Darmwand disseminiert oder kontinuierlich befallen sein. Die Pathogenese der Erkrankung ist bislang noch nicht eindeutig geklärt. Es herrscht große Einigkeit darüber, dass nicht einzelne Faktoren ursächlich für die Pathogenese sind, sondern dass eine multifaktorielle Genese die Entstehung der NEC am treffendsten beschreiben kann.<sup>3</sup> Demzufolge gilt der Darm des Frühgeborenen als anfälliger für hypoxische Insulte<sup>4</sup> und aufgrund seiner Unreife vulnerabler für eine Inflammation mit pathogenen Erregern.<sup>5</sup>

## 1.1 Epidemiologie und Inzidenz

Während unter allen Neugeborenen die Inzidenz noch bei 0,1-0,3% liegt,<sup>6</sup> steigt diese mit abnehmendem Geburtsgewicht auf bis zu 11% bei einem Gewicht von 401-750g.<sup>7</sup> Der gleiche inverse Zusammenhang tritt auch in Anbetracht des Gestationsalters auf. Je geringer das Gestationsalter, desto häufiger ist das Auftreten einer NEC. So erreicht die Inzidenz bei einem Gestationsalter von 24 Schwangerschaftswochen mit bis zu 9% ihren Gipfel (s. Abb. 1).<sup>8</sup>

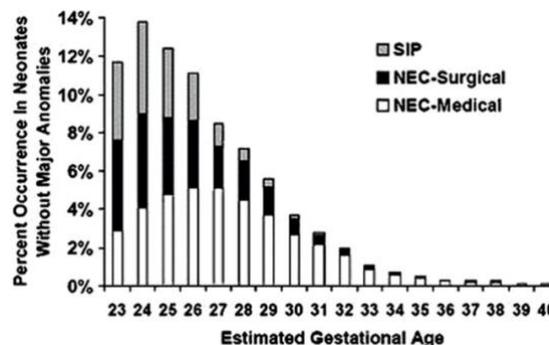


Abbildung 1 Inzidenz von Nekrotisierender Enterokolitis und Fokaler Intestinaler Perforation (FIP/SIP) unter Berücksichtigung des Gestationsalters (Quelle: Gordon, 2017, Seminars in Perinatology).

International wird das Auftreten der NEC recht unterschiedlich angegeben. So tritt die NEC bei Kindern unter 1.500g in Deutschland mit einer Häufigkeit von 2,9% auf,<sup>9</sup> während in den USA und Kanada die Häufigkeit mit 7% beziffert wird.<sup>10</sup> Bezeichnend ist, dass laut Ostlie et al. unter allen Patient:innen mit gesicherter NEC als Diagnose 90% Frühgeborene sind. Lediglich circa 10% seien Reifgeborene.<sup>11</sup> Sofern im Rahmen der operativen Versorgung die NEC gesichert wurde, liegt die Letalität bei bis zu 38%.<sup>12</sup>

## 1.2 Pathogenese

Der genaue Mechanismus hinter der Entstehung einer NEC bleibt zwar weitestgehend ungeklärt, doch gewannen einige Hypothesen durch Studien zunehmend an Bedeutung. So lassen sich pathophysiologisch drei Mechanismen als grundlegend betrachten: die intestinale Unreife des Gastrointestinaltrakts, Hypoxien im Splanchnikusgebiet durch Instabilitäten des Herz-Kreislauf-Systems und eine bakterielle Fehlbesiedlung des Darms.

### 1.2.1 Intestinale Unreife

Aufgrund der Tatsache, dass 90% der Neugeborenen mit NEC Frühgeborene sind,<sup>11</sup> liegt der Verdacht nahe, dass die Unreife des Gastrointestinaltraktes und das unreife Immunsystem des Frühgeborenen<sup>13-14</sup> eine grundlegende Bedeutung in der Pathogenese der NEC besitzt. Charakteristisch für den unreifen Gastrointestinaltrakt des Frühgeborenen ist eine erhöhte Permeabilität bei einer zeitgleich geringen humoralen und zellulären Immunität. Darüber hinaus sind weniger proteolytische Enzyme vorhanden und die Produktion von Magensäure ist im Verhältnis zum reifen Magen-Darm-Trakt noch gering,<sup>15</sup> sodass die Vulnerabilität für eine Inflammation durch Pathogene steigt.

### 1.2.2 Hypoxien im Splanchnikusgebiet

Die Blutversorgung des Magen-Darm-Trakts erfolgt über die Splanchnikusgefäße. Um bei drohender zerebraler oder kardialer Hypoxie bei Kreislaufinstabilitäten die zentrale Perfusion aufrecht zu erhalten, wird durch Vasokonstriktion die Perfusion in der Peripherie verringert. Da darunter auch das Splanchnikusgebiet vermindert perfundiert wird, entwickelte sich in den letzten

Jahren die Hypothese, dass Hypoxien ursächlich bzw. signifikant beitragend für die Entstehung der NEC sein könnten. Darüber hinaus ist das Gefäßsystem des Frühgeborenen noch nicht in der Lage, die Perfusion des Darmes bei Kreislaufinstabilitäten adäquat mittels Vasodilatation aufrecht zu erhalten.<sup>4</sup> In Studien wurde versucht, durch eine gezielte Ischämie eine NEC zu induzieren.<sup>16</sup> Diese Versuche scheiterten jedoch. Somit ergab sich die Theorie, dass allein die Hypoxie nicht ursächlich für die Entstehung der NEC zu sein scheint. Die Forschenden folgerten daraus, dass die Vulnerabilität für pathogene Antigene durch einen hypoxischen Insult erhöht werden könnte. Diese Theorie ließ sich im Mausmodell später bestätigen. Hierfür wurde bei den Tieren zweimal täglich eine Hypoxie induziert, während diese mit Lipopolysacchariden (LPS) gefüttert wurden. Hierunter zeigten sich NEC-ähnlich Läsionen.<sup>17</sup>

### 1.2.3 Bakterielle Fehlbesiedlung

Die Tatsache, dass im zuvor beschriebenen Mausmodell die Mäuse mit Lipopolysacchariden (LPS) als bakteriellem Antigen gefüttert wurden und sich hierunter NEC-ähnliche Läsionen bildeten, führte zu der Hypothese, dass eine bakterielle Besiedlung als weiterer pathophysiologischer Mechanismus ihren Beitrag zur Inflammation trägt. Dies wird durch eine Studie gestützt, in der bei steril aufgezogenen Ratten versucht wurde, mithilfe einer gezielten Hypoxie eine NEC zu provozieren. Es ließ sich jedoch bei keiner der sterilen lebenden Ratten eine NEC induzieren, während 75% der Ratten, welche in unsteriler Umgebung aufwuchsen, eine NEC entwickelten.<sup>18</sup> Des Weiteren spricht das Auftreten der NEC mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen der zweiten und vierten Lebenswoche für einen bereits stattgefundenen Kontakt mit potenziell pathogenen Erregern. Neben dem grundsätzlich sporadischen Auftreten der NEC gilt ein gelegentlich saisonales<sup>19</sup> oder auch endemisches Auftreten mit dem Nachweis gleicher Erregerstämme<sup>20</sup> als weiteres Indiz für eine mitunter infektiöse Genese.

Hinzu kommen mehrere Studien, in denen das Mikrobiom von Kindern mit NEC mit einer Kontrollgruppe von Kindern ohne NEC verglichen wurde. Hier wurden im Mikrobiom der NEC-Kinder verhältnismäßig mehr pathogene Erreger detektiert.<sup>21-22</sup>

#### 1.2.4 Die Rolle des Toll-like-Receptors

Der TLR-4-Signalweg scheint eine wichtige Rolle in der intestinalen Entwicklung zu besitzen. Im Darm Frühgeborener ist die Expression von TLR-4 höher als im adulten Darm. Der Signalweg von TLR-4 führt neben einer vermehrten Apoptose und einer Hemmung der Enterozytenproliferation ebenfalls zu einer Hemmung der Enterozytenmigration. Binden LPS an den TLR-4 wird der Signalweg ausgelöst. Durch die folgende Apoptose leidet die Barrierefunktion des Darms und Bakterien können einfacher in die Darmwand einwandern. Außerdem wird nach einer Läsion durch das Signaling des TLR-4 die Proliferation neuer Enterozyten und deren Migration gehemmt. So konnte im Tiermodell bei Tieren mit einer inhibitorischen TLR-4-Mutation keine NEC induziert werden, während bei Wildtyp-Tieren mit regulärem TLR-4-Signaling eine NEC induziert wurde.<sup>23,24</sup>

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass ein einzelner der in 1.2.1-1.2.4 genannten Mechanismen allein die Pathogenese der NEC nicht erklären kann. Die Kombination einer vulnerablen, unreifen Mucosa, die paroxysmal unter hypoxischen Stress gesetzt wird und zeitgleich mit pathogenen Erregern in Kontakt kommt, scheint die Theorie der multifaktoriellen Genese am treffendsten zu repräsentieren.

### 1.3 Therapiestrategien

Aufgrund der hohen Letalität von bis zu fast 40%<sup>12</sup> wird allein bei dem Verdacht auf eine NEC neben einer Nahrungskarenz eine antibiotische Therapie eingeleitet.<sup>25</sup> Die Entscheidung über das therapeutische Vorgehen erfolgt für Kinder mit Verdacht auf NEC in Deutschland anhand der AWMF-Leitlinie und den modifizierten Bell-Stadien.<sup>26,27</sup> Bei ausbleibender Regredienz, fulminanten Verläufen oder bei starker Reduktion des Allgemeinzustands besteht die Indikation zur operativen Versorgung, bei der die nekrotischen Abschnitte des Darms entfernt werden (s. Abb. 2).<sup>27</sup> Hierbei können die beiden verbliebenden Darmstücke entweder primär oder in einem zweizeitigen Vorgehen anastomosiert werden. Anschließend werden die resezierten Segmente oftmals in pathologische Institute zur Diagnosesicherung und Befundung versandt.



Abbildung 2 Intraoperativer Befund einer multiplen, segmentalen NEC. Die blauen Linien markieren beispielhaft potenzielle Resektionsränder anhand makroskopischer Gesichtspunkte.

Quelle: Prof. Dr. Udo Rolle, Kinderchirurgie Universitätsklinikum Frankfurt am Main

## 1.4 Pathologie der Nekrotisierenden Enterokolitis

Die NEC kann den gesamten Dün- und Dickdarm befallen. Am häufigsten scheint sowohl das terminale Ileum als auch das proximale Colon befallen zu sein. Ein isolierter Befall des Colons oder des Ileums ist hingegen seltener.<sup>28,29</sup> So manifestiert sich die NEC bei der Hälfte der Patient:innen mit einem segmentalen Befallsmuster, während bei der anderen Hälfte ein kontinuierliches Befallsmuster auftritt.<sup>30</sup> In den resezierten, nekrotischen Arealen der Schnittpräparate findet sich histopathologisch vorwiegend das Bild einer Koagulationsnekrose.<sup>28</sup> Darüber hinaus kann sich sowohl das Bild einer akuten Inflammation mit vielen neutrophilen Granulozyten als auch einer chronischen Inflammation mit vielen Plasmazellen, Dendritischen Zellen und Lymphozyten zeigen.<sup>28</sup> Je fortgeschrittener die Erkrankung ist, desto mehr Gewebeschichten sind von luminal nach abluminal von der Koagulationsnekrose befallen, wie in Abbildung 3 gut erkennbar ist. Insgesamt zeigt sich zumeist ein ischämisches Schädigungsbild ohne wesentliches Entzündungszellinfiltrat. Als weiterer Befund kann vor allem submucosal eine Pneumatosis intestinalis imponieren. Diese Gasansammlung stammt vermutlich von einer bakteriellen Fermentierung und freier werdendem Wasserstoff. In einem Großteil aller Gewebeprobe (>50%) der NEC konnten histologische Befunde erhoben werden, die auf regenerative Prozesse hinweisen. Dazu gehören beispielsweise Granulationsgewebe und fokal reparative Epithelveränderungen.<sup>31</sup>

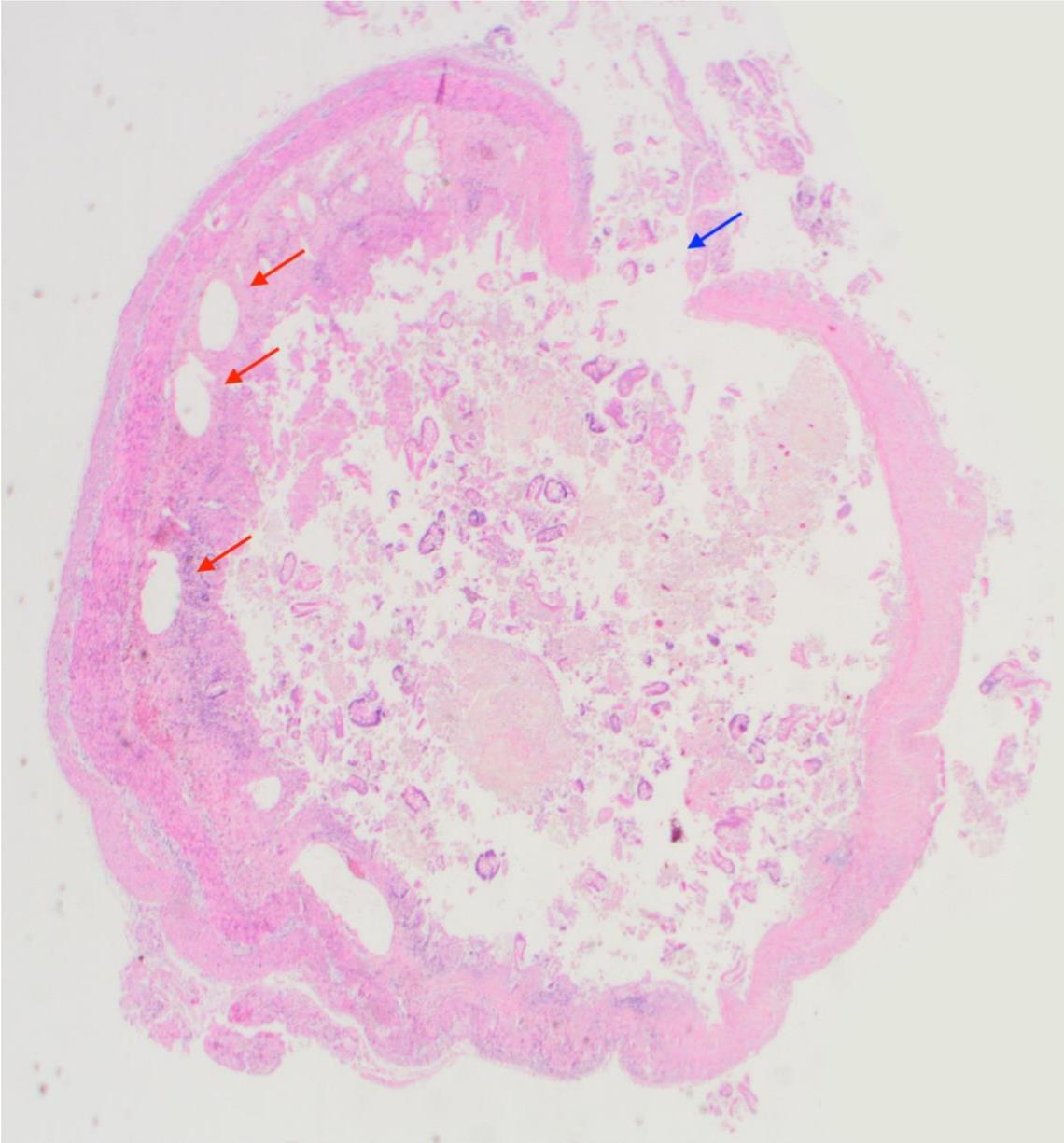


Abbildung 3 Lichtmikroskopische Aufnahme eines Colonquerschnitts. Eindeutiger Befund mit submucosaler Pneumatosis intestinalis (rote Pfeile) und Perforationsstelle bei Vollwandnekrose (blauer Pfeil). Die Tunica Mucosa lässt sich nicht mehr identifizieren. Die Zellgrenzen der Tunica Muscularis sind vor allem in der rechten Bildseite unscharf. 2-fache Vergrößerung.

## 1.5 Differenzialdiagnosen

Die NEC ist nicht die einzige Darmerkrankung des Früh- bzw. Neugeborenen, die einer operativen Therapie bedarf. So ist beispielsweise als wichtigste Differenzialdiagnose die Fokale Intestinale Perforation zu nennen (FIP). Die FIP entspricht in der klinischen Manifestation der NEC, sodass die Unterscheidung und endgültige Diagnose nur intraoperativ oder histopathologisch gestellt werden kann. Die FIP ist im Gegensatz zur NEC von einer sehr lokalisierten Vollwandnekrose gekennzeichnet und tritt eher in der ersten Lebenswoche bei extrem unreifen Frühgeborenen auf. Da auch auf molekularer Ebene Unterschiede zwischen den Erkrankungen zu existieren scheinen, wird sowohl diskutiert, dass es sich hierbei um zwei unterschiedliche Erkrankungen handelt<sup>32</sup> oder aber, dass die FIP eine geringere Form der NEC darstellt.

Innerhalb der ersten Lebenstage kann als weitere Differenzialdiagnose mit galligem Erbrechen und einem gespannten Abdomen der Mekonium-Ileus auftreten. Auch ein Volvulus kann zu einer Darmischämie und einer ähnlichen Klinik führen.

Mit einer Ileus-Symptomatik, abdomineller Distension und dem Auftreten von Erbrechen ist ferner der Morbus Hirschsprung als Differenzialdiagnose anzuführen.

### Ziel dieser Studie

Da sich bislang in der Literatur erst zwei Studien über einen möglichen Zusammenhang zwischen den histopathologischen Befunden der resezierten NEC-Darmsegmente und dem klinischen Outcome vor allem mit dem Schwerpunkt auf bakterielle Besiedlung finden lassen, wurde in dieser Arbeit mit einem anderen Blickwinkel der Zusammenhang zwischen bestimmten Histologiebefunden und dem klinischen Verlauf der Neugeborenen beleuchtet. Es wurde in dieser Studie am primären und sekundären OP-Präparat das Vorliegen bestimmter histopathologischer Befunde wie Nekrose, Granulationsgewebe, Hämatome und Hämosiderinablagerung bewertet und daraufhin untersucht, ob ein Zusammenhang zum postoperativen, klinischen Verlauf besteht.

## **2 Patient:innen, Material und Methoden**

### **2.1 Patient:innen**

In unsere Studie schlossen wir 75 Neugeborene ein, die am Universitätsklinikum der Goethe-Universität in Frankfurt am Main zwischen 2010 und 2019 mit dem Verdacht auf eine Nekrotisierende Enterokolitis (NEC) operiert wurden. Die Entscheidung über das therapeutische Vorgehen erfolgte gemäß den AWMF-Leitlinien und modifizierten Bell-Stadien.<sup>26</sup>

#### **Klinische Diagnose – Ist NEC gleich NEC?**

Da die klinischen Symptome der NEC häufig unspezifisch sind, konnte trotz initialem Verdacht nicht immer intra- und postoperativ die Diagnose der NEC bestätigt werden. In manchen Fällen zeigte sich entweder intraoperativ oder in der histopathologischen Befundung das Bild einer fokalen intestinalen Perforation (FIP), eines Volvulus oder eines Mekonium-Ileus.

Diese Kinder schlossen wir ebenfalls in unsere Studie ein, um einerseits auch hier einen möglichen Zusammenhang zwischen dem klinischen Verlauf und der histopathologischen Befunde der eben genannten Diagnosen untersuchen zu können. Andererseits ließen sich so allgemein Auffälligkeiten nach chirurgischer Intervention bei Frühgeborenen näher betrachten.

### **2.2 Klinische Befunde**

Um eine Aussage über die klinischen Verläufe der operierten Neugeborenen treffen zu können, beobachteten wir die postoperativen klinischen Verläufe der Neugeborenen mindestens ein Jahr nach. Hierbei wurden die Neugeborenen in drei Gruppen eingeteilt: komplikationsfrei, postoperative Komplikationen und Exitus letalis.

Blieben die operierten Kinder bis zu einem Jahr nach der Operation frei von Komplikationen, galt dies als komplikationsfreier Verlauf. Entwickelten sie innerhalb eines Jahres eine erneute NEC, einen stark reduzierten Allgemeinzustand, der eine operative Revision benötigte, oder einen Ileus, wurden sie zur Gruppe der postoperativen Komplikationen zugeteilt. Verstarben

die Kinder innerhalb eines Jahres nach der initialen Operation, wurden sie der Gruppe Exitus letalis zugeteilt.

Darüber hinaus erfolgte eine Datensammlung und -auswertung der mikrobiologischen Befunde anhand von intraoperativen Abdominalabstrichen und abgenommenen Blutkulturen.

## **2.3 Histopathologische Befundung**

Im Dr. Senckenbergischen Institut für Pathologie wurden von den resezierten Darmsegmenten standardmäßig histologische Schnittpräparate angefertigt und mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbt (HE-Schnitte). Hierbei wurden sowohl die Resektionsränder als auch die zentralen Abschnitte der resezierten Darmsegmente und potenzielle Läsionen – wie Perforationen oder Stenosen – in Paraffinblöcke eingebettet und Schnittpräparate angefertigt. Kam es im klinischen Verlauf zu einer erneuten Operation, wurden auch hiervon Schnittpräparate angefertigt, sodass pro Patient:in von 1-4 Operationen Schnittpräparate der Darmresektate zu befunden waren.

Um die Aussagekraft der histopathologischen Befundung zu erhöhen, erfolgte die lichtmikroskopische Untersuchung der Schnittpräparate durch drei unabhängige Untersucher:innen. Anschließend wurde gemeinsam ein Untersuchungsbefund erstellt. Für die lichtmikroskopische Untersuchung wurde das Lichtmikroskop Axio Scope.A1 der Firma Carl Zeiss genutzt.

### **Histologische Merkmale**

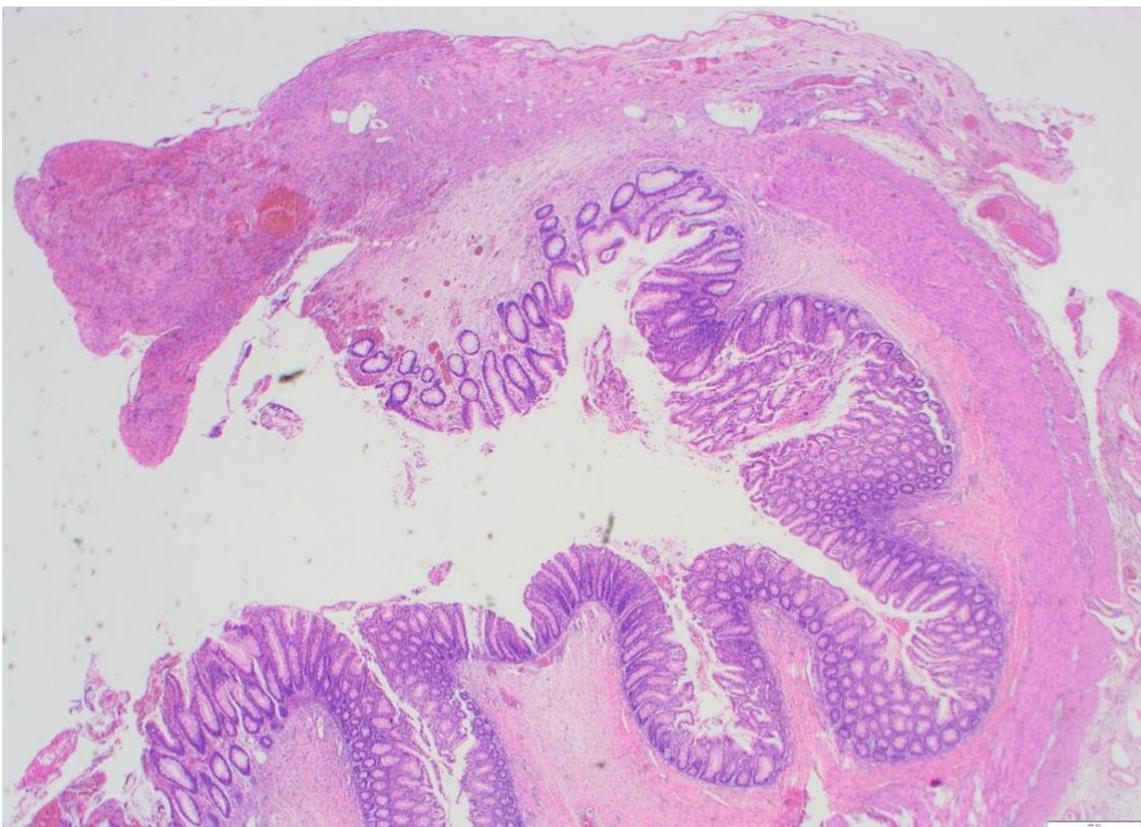
Für die histopathologische Befundung untersuchten wir die einzelnen Präparate hinsichtlich unterschiedlicher pathologischer Befunde. So wurden die Resektionsränder der resezierten Darmsegmente hinsichtlich folgender Merkmale untersucht: Vitalität der Tunica Mucosa, Vitalität der Tunica Muscularis, Vorliegen mindestens einer fokalen Vollwandnekrose, Vorhandensein von Peritonitis und Einblutungen in das Gewebe. In den zentralen Anteilen der resezierten Darmsegmente achteten wir ebenfalls auf die Vitalität der Tunica Mucosa beziehungsweise Tunica Muscularis, das Vorliegen einer Perforation, einer fokalen Vollwandnekrose und auch auf das Vorliegen einer

Peritonitis. Darüber hinaus wurde das Vorliegen einer Stenose im gesamten Präparat untersucht.

Lagen Schnittpräparate der Zweit- oder Dritt-Operation vor, untersuchten wir weitergehend auf das Vorliegen einer Anastomoseninsuffizienz, einer Striktur oder weiteren pathologischen Auffälligkeiten.

Die einzelnen Merkmale wurden auf dichotome Werte beschränkt. Entweder war die Tunica Mucosa beziehungsweise Tunica Muscularis vital oder avital. Entweder lag eine Vollwandnekrose, eine Peritonitis, eine Einblutung beziehungsweise eine Perforation vor oder nicht.

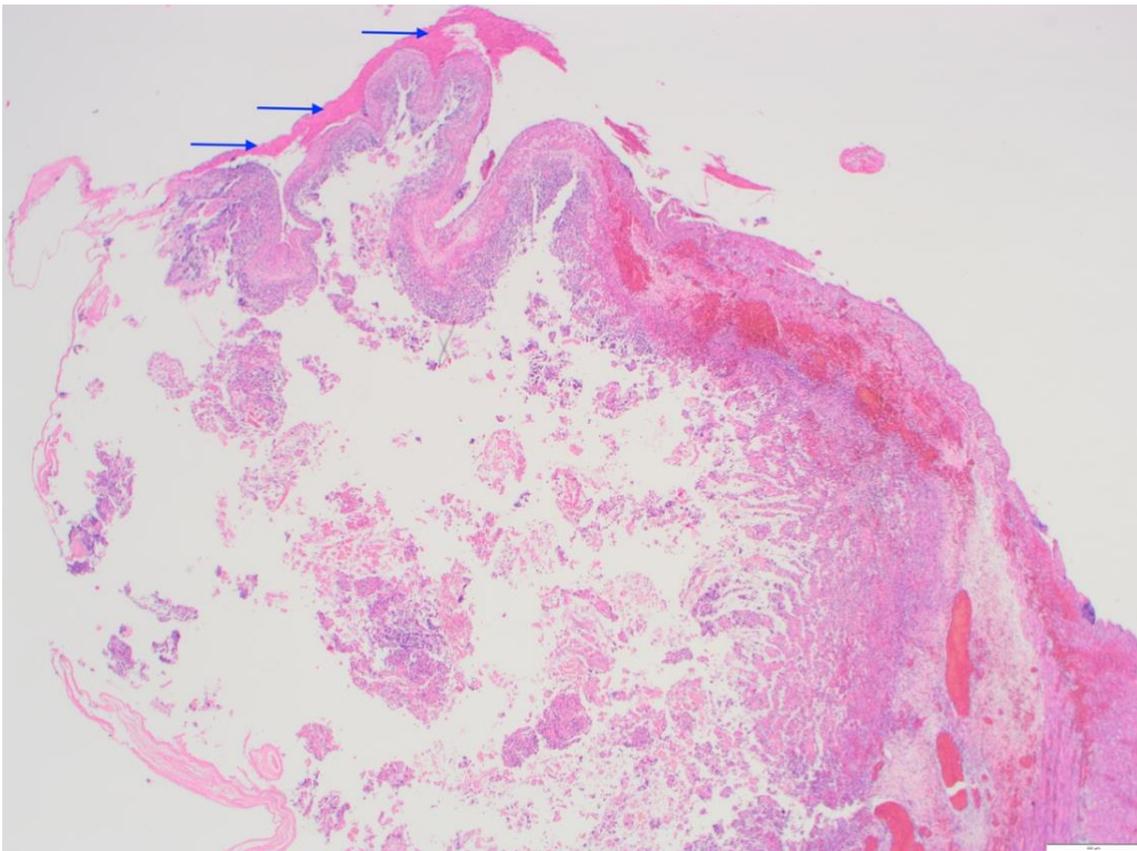
Eine Perforation zeichnete sich durch eine Vollwandnekrose mit Unterbrechung der Kontinuität der Darmwand aus, bei dem die Perforationsränder verschwommen und abgerundet erscheinen (s. Abb. 4).



*Abbildung 4 Antimesenteriale Ischämie und Perforation. Exemplarisch an einer FIP.*

Vitales Darmgewebe erkennt man am regelrechten Aufbau von Tunica Mucosa und Tunica Muscularis mit gut differenzierbaren Zellgrenzen und sichtbaren Zellkernen. Sobald lichtmikroskopisch erkennbar war, dass Zellverbände untergehen, dass Zellgrenzen verschwimmen und Zellkerne verschwinden oder die Eosinophilie des Gewebes abblasst, definierten wir das Gewebe als avital (s. Abb. 5).

Bei Vorliegen einer Nekrose erscheinen die Tunica Muscularis longitudinale und circulare schlecht differenzierbar. Lag in einem Querschnitt in einem Bereich entweder fokal oder voll ausgedehnt sowohl eine Nekrose der Tunica Mucosa als auch der Tunica Muscularis vor, erfolgte die Einteilung in eine Vollwandnekrose (s. Abb. 5).



*Abbildung 5 Histopathologische Befunde einer NEC. Avitale Tunica Mucosa, teilweise erhaltene Tunica Muscularis. Gestaute Blutgefäße. Linke Bildseite: Vollwandnekrose ohne erkennbare Schichtung. Teilweise perforiert. Fibrin am oberen linken Bildrand als Hinweis auf eine Peritonitis (blaue Pfeile).*

Waren auf der Serosa Fibrin und neutrophile Granulozyten sichtbar, wurde eine Peritonitis diagnostiziert (s. Abb. 5, blauer Pfeil). Konnten massenhaft Erythrozyten extravasal im Gewebe erkannt werden, definierten wir dies als frische Einblutung in das Gewebe (s. Abb 6). Ausgedehnte Hämosiderinablagerungen und hämosiderinbeladene Makrophagen in der Subserosa und Submucosa waren ein Zeichen stattgehabter Blutungen, die vor mehreren Tagen, Wochen und Monaten stattgefunden hatten.

Eine Stenose wird durch Lumeneinengung erkennbar und ist durch eine submuköse Fibrosierung gekennzeichnet (s. Abb. 7). Das Vorliegen einer starken Dilatation mit einer deutlichen Lumenerweiterung werteten wir ebenfalls als Hinweis auf eine Stenose im Sinne eines prästenotischen Abschnitts.

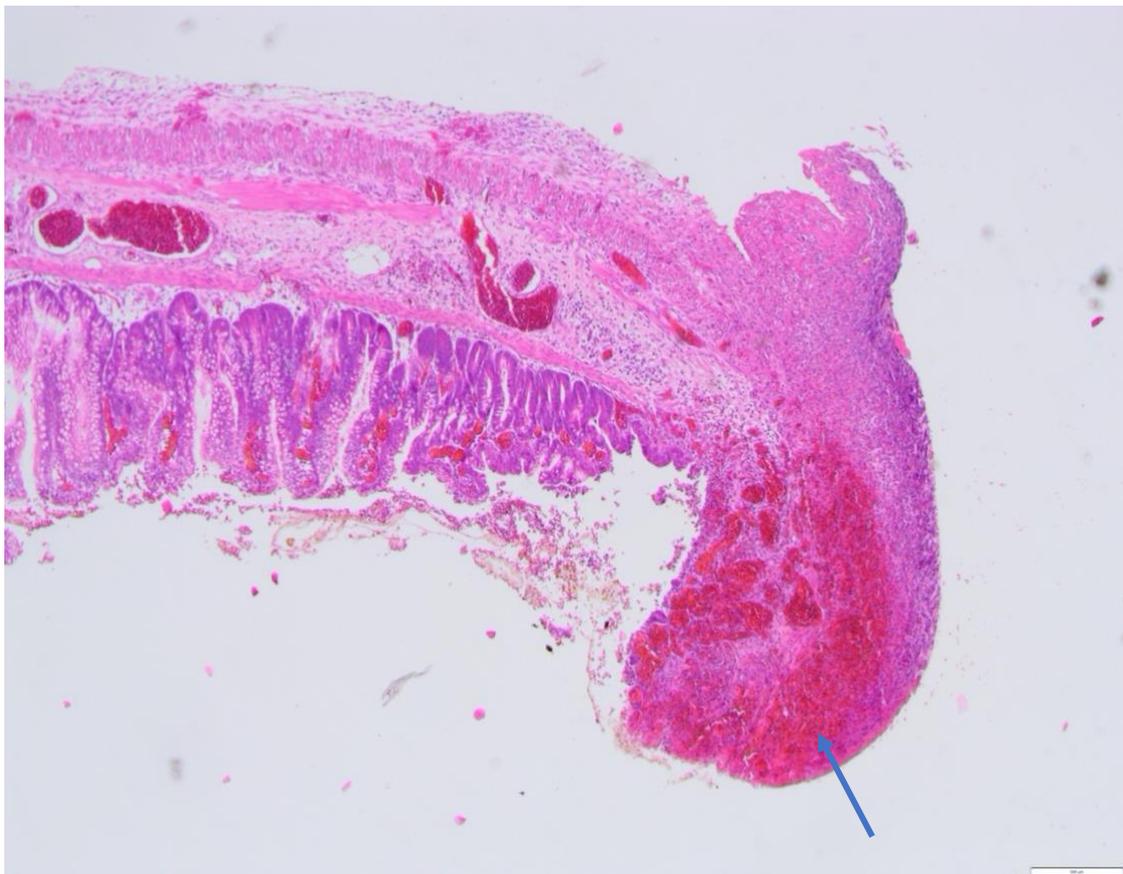


Abbildung 6 Hämorrhagie (blauer Pfeil) an Perforationsstelle

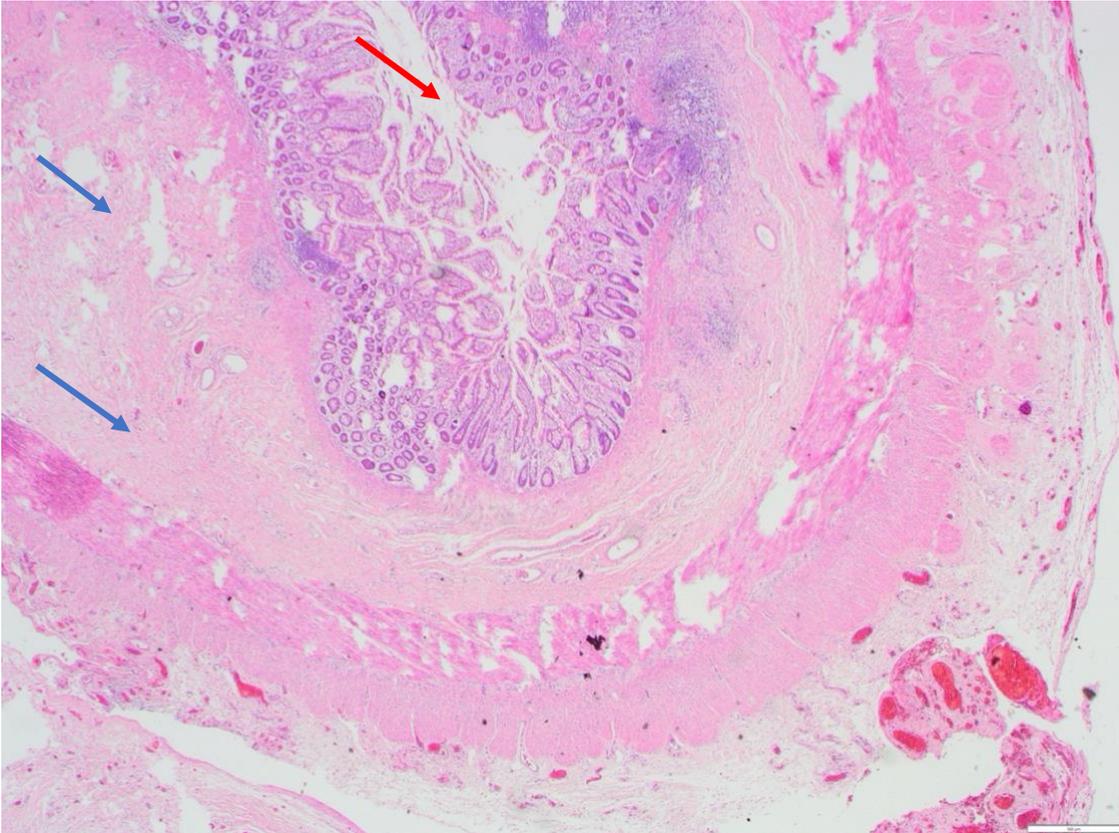


Abbildung 7 Deutliche Stenose mit sichtbarer Lumeneinengung (roter Pfeil) und ausgeprägter submuköser Fibrosierung (blauer Pfeil).

### Zusatzfärbungen

Im Verlauf der Studie schien es, als würde das Vorliegen einer Hämorrhagie in das Gewebe in Zusammenhang mit dem postoperativen Verlauf stehen. Dies veranlasste uns dazu, weitere Färbungen der Präparate anzufertigen, bei denen eine Einblutung in den HE-Schnitten vorlag. Es erfolgte eine immunhistochemische Analyse mittels CD15- (Dako Anti-Human CD15 Monoclonal Mouse FLEX Clone Carb 3) und CD68- (Dako Anti-Human CD68 Monoclonal Mouse FLEX Clone KP1) Färbung sowie eine Eisenfärbung. Das Färbeprotokoll ist im Anhang zu finden (Abb. 19 und 20).

Mittels CD15-Färbung wird der Nachweis von Granulozyten/Monozyten beabsichtigt. Eine grobe Orientierung über das Ausmaß der Entzündung soll hiermit möglich sein. Mittels CD68-Färbung soll der Nachweis von Histiozyten ebenfalls eine Aussage über das Ausmaß der chronisch-entzündlichen Abräumreaktion geben. Die Eisenfärbung zielt auf den Nachweis einer alten,

stattgehabten Blutung mit Hämosiderin als Abbauprodukt des Hämoglobins durch Makrophagen.

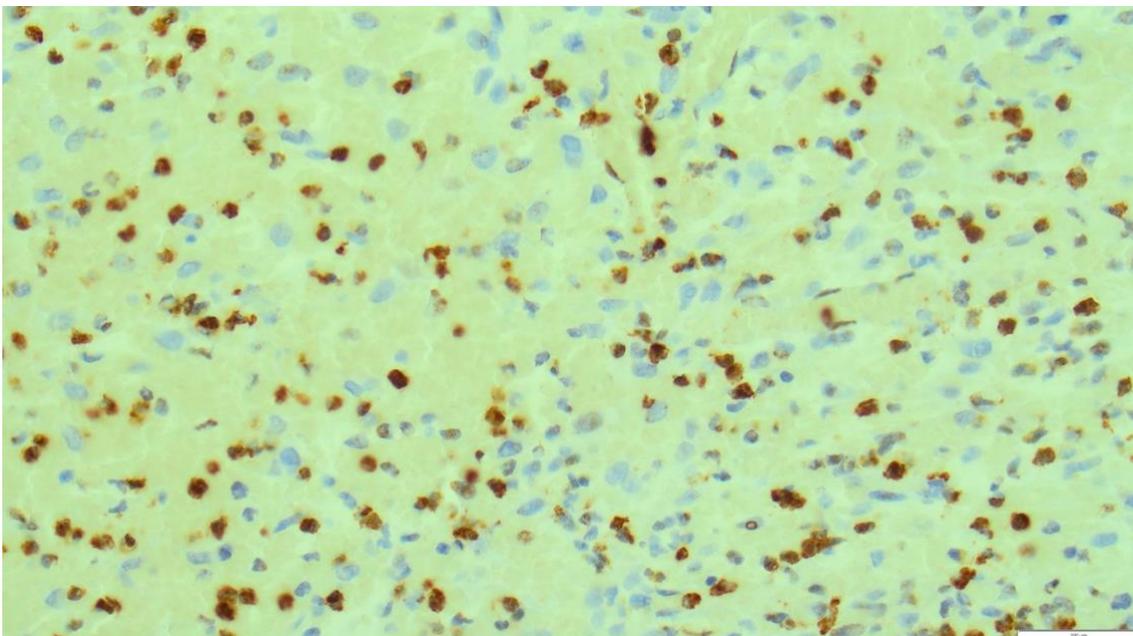


Abbildung 8 Immunhistochemische Färbung mittels CD15. 20-fache Vergrößerung.

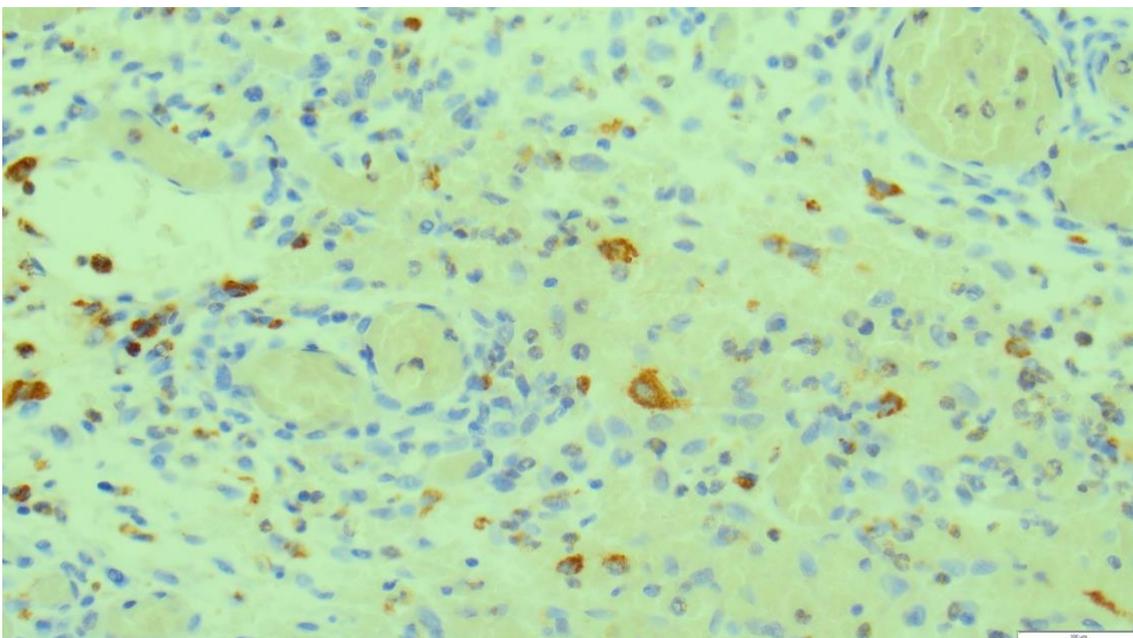
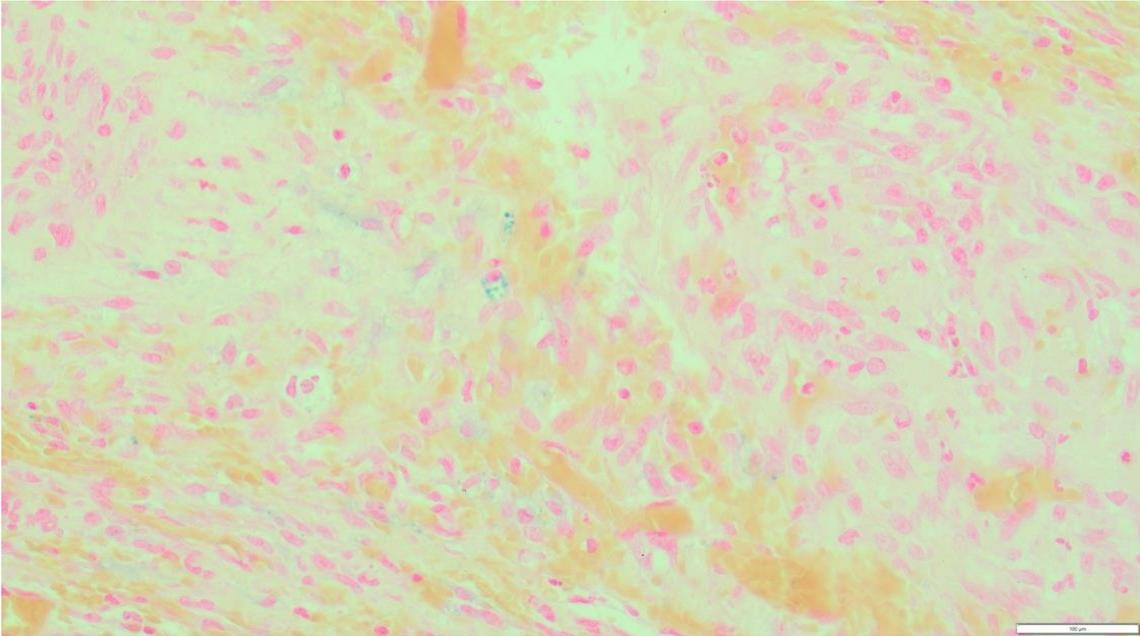


Abbildung 9 Immunhistochemische Färbung mittels CD68. 20-fache Vergrößerung.



*Abbildung 10 Eisenfärbung. 20-fache Vergrößerung.*

## 2.4 Datensammlung und statistische Analysen

Von unserer kinderchirurgischen Abteilung des Universitätsklinikums Frankfurt am Main erhielten wir eine Übersicht aller Kinder, die zwischen 2010 und 2019 mit dem Verdacht auf eine NEC operiert wurden. Daraufhin wurden die Daten über den postoperativen klinischen Verlauf retrospektiv aus der klinikinternen Dokumentationssoftware extrahiert und pseudonymisiert, sodass den einzelnen Patient:innen die jeweiligen archivierten Schnittpräparate zugeordnet und untersucht werden konnten. Parallel erfolgte die histopathologische Befundung zu den einzelnen Patienten. Die histopathologische Beurteilung erfolgte ohne Kenntnis des klinischen Verlaufs und sollte somit eine Verblindung gewährleisten, um eine Verzerrung aufgrund der möglicherweise bekannten postoperativen Verläufe zu verhindern.

Für die Zusammenhangsanalyse zwischen den histopathologischen Befunden und den klinischen Daten wurde vorausgesetzt, dass von der initialen Operation ein Schnittpräparat vorlag. War dies nicht der Fall, wurden die Patient:innen nicht in die finale Zusammenhangsanalyse miteinbezogen. So wurden von anfänglich 75 Kindern insgesamt 16 ausgeschlossen. Damit ergab sich eine Kohortengröße von 59 Patient:innen. Die Datenauswertung erfolgte mittels IBM SPSS Statistics 28. Die Kohortengröße von 59 Patient:innen veranlasste uns initial dazu, in einer univariaten Zusammenhangsanalyse mittels Fisher-Freeman-Halton Exact Test einen statistischen Zusammenhang zwischen den einzelnen Gruppen der klinischen Verläufe mit den möglichen Merkmalen der histopathologischen Befunde zu untersuchen. Als Signifikanzniveau wählten wir  $p = 5\%$ .

Im weiteren Verlauf erfolgte auch eine multivariate Analyse durch die Cox-Regression mit dem postoperativen Verlauf als abhängige Variable. Dabei wurde der Tod bei der Gruppe mit Komplikationen aufgeführt. Als postoperativer Verlauf ergaben sich somit nur zwei Gruppen, entweder komplikationsfrei oder mit Komplikation. Als unabhängige Variablen untersuchten wir die histopathologischen Befunde einerseits und die mikrobiologischen Befunde andererseits. Auch hier lag das Signifikanzniveau bei  $p = 5\%$ .

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Klinische Merkmale der Kohorte

Wir untersuchten in unserer Studie die klinischen Merkmale von insgesamt 59 Neugeborenen, welche im Zeitraum von 2010 bis 2019 chirurgisch versorgt wurden.

Von den 59 Neugeborenen waren 37 (62,7%) männlich und 22 (37,3%) weiblich. Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der ersten Operation lag bei 16 Tagen (IQR: 8-31, s. Tab. 1). Jedes Neugeborene war vor der 37. Schwangerschaftswoche geboren, sodass alle eingeschlossenen Kinder per definitionem Frühgeborene waren. Das mittlere Gestationsalter lag bei 27 Wochen (IQR: 25-29). Im Durchschnitt wogen die Neugeborenen 810g (IQR: 680-1050g). Nur vier der eingeschlossenen Neugeborenen hatten ein Gestationsgewicht von mehr als 1.500g, womit 55 der Kinder als Very-Low-Birth-Weight-Kinder (VLBW-Infants) galten.

*Tabelle 1 Demographische Angaben*

<b>Patient:innen</b>	<b>59</b>
Gestationsalter in Wochen – median (iqr)	27 (25-29)
Geburtsgewicht in Gramm – median (iqr)	810 (680-1050)
Alter in Tagen bei Erst-OP – median (iqr)	16 (8-31)
Geschlecht (männlich/weiblich)	37/22 (62,7%/37,3%)
Mehrlingschwangerschaften – n (%)	
Einling	48 (81,4%)
Zwillinge	10 (16,9%)
Drillinge	1 (1,7%)

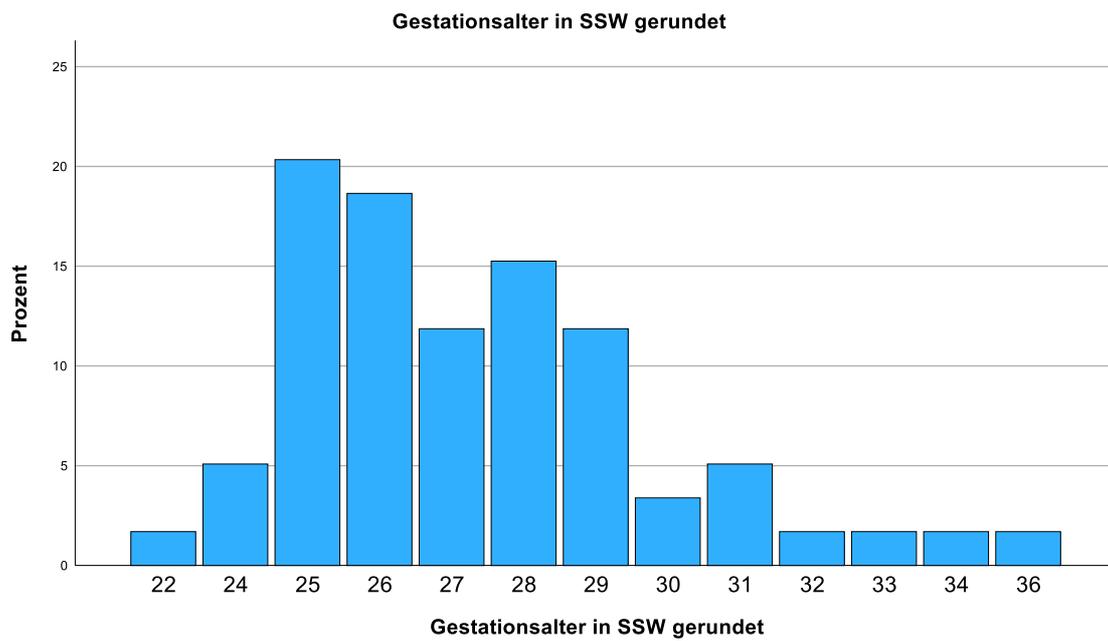


Abbildung 11 Relative Häufigkeit des Gestationsalters in Wochen

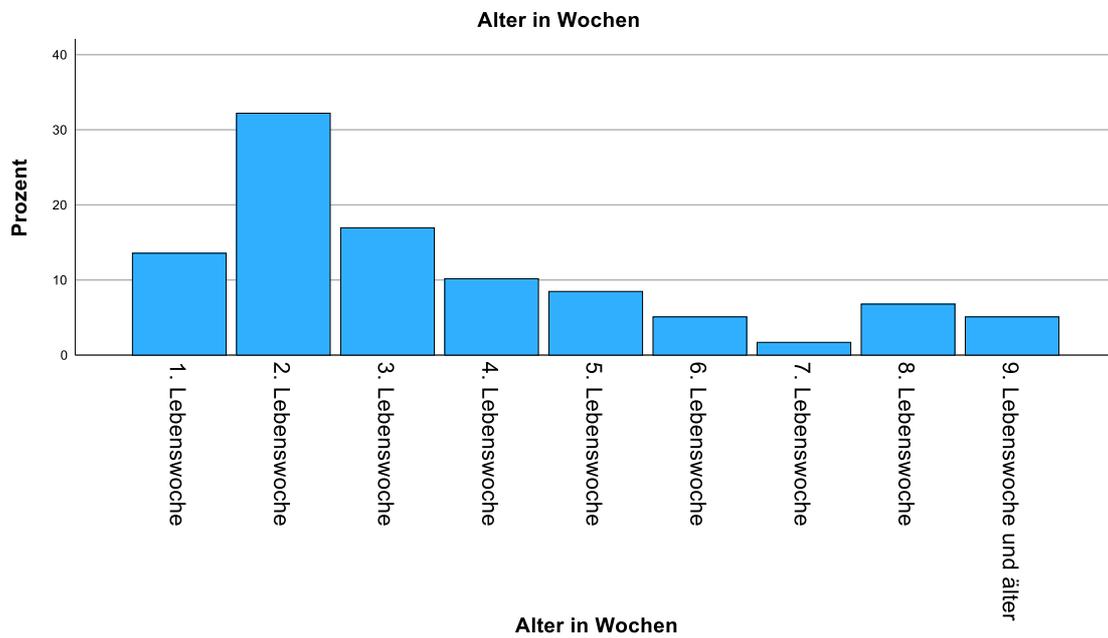


Abbildung 12 Relative Häufigkeit des Lebensalters zum Zeitpunkt der Erst-OP

Während 10 Kinder ein Zwillingsgeschwister hatten und ein Kind zwei Drillingsgeschwister hatte, waren 48 der Kinder Einlingschwangerschaften.

Die endgültige, klinisch und histologisch bestätigte Erstdiagnose lautete bei 49 Neugeborenen NEC (83,1%). Fünf Neugeborene hatten eine FIP (8,5%), bei vier Neugeborenen zeigte sich ein Mekonium-Ileus (6,8%) und bei einem Neugeborenen wurde ein Volvulus diagnostiziert (2%). Eine Übersichtsdarstellung befindet sich in Tabelle 3.

### 3.2 Postoperativer klinischer Verlauf

Die Nachbeobachtung der Kinder erfolgte über ein Jahr. In diesem Zeitraum blieben von den 59 Neugeborenen 29 frei von postoperativen Komplikationen (49,2%), 25 zeigten postoperative Komplikationen (42,4%) und fünf Kinder verstarben (8,4%).

Von den 25 Neugeborenen mit postoperativen Komplikationen mussten zehn (40%) aufgrund einer Allgemeinzustandsverschlechterung erneut operiert werden. Weitere zehn (40%) Neugeborene entwickelten postoperativ einen Ileus und bei fünf Neugeborenen (20%) zeigte sich eine erneute NEC im Sinne eines Rezidivs.

Von den 25 Kindern mit postoperativen Komplikationen hatten 22 Kinder initial eine NEC, zwei Kinder eine FIP und eines einen Mekonium-Ileus (s. Tab. 3).

*Tabelle 2 Postoperativer Verlauf*

	Häufigkeiten n (%)
<b>Postoperativ Komplikationsfrei</b>	<b>29 (49,2%)</b>
<b>Postoperativ Komplikationen</b>	<b>25 (42,4%)</b>
- Reduzierter Allgemeinzustand	- 10 (40%)
- Ileus	- 10 (40%)
- NEC-Rezidiv	- 5 (20%)
<b>Tode</b>	<b>5 (8,4%)</b>
<b>Insgesamt</b>	<b>59</b>

Tabelle 3 Diagnosen und Komplikationen

Diagnose	Häufigkeiten (%)	n
<b>Nekrotisierende Enterokolitis</b>	<b>49 (83,1%)</b>	
- Ohne postoperative Komplikationen	- 22	
- Postoperative Komplikationen	- 22	
○ Reduzierter Allgemeinzustand	○ 9	
○ Ileus	○ 8	
○ NEC-Rezidiv	○ 5	
- Tode	- 5	
<b>Fokale Intestinale Perforation</b>	<b>5 (8,5%)</b>	
- Ohne postoperative Komplikationen	- 3	
- Postoperative Komplikationen	- 2	
○ Reduzierter Allgemeinzustand	○ 1	
○ Ileus	○ 1	
<b>Mekonium Ileus</b>	<b>4 (6,8%)</b>	
- Ohne postoperative Komplikationen	- 3	
- Postoperative Komplikationen	- 1	
○ Ileus	○ 1	
<b>Volvulus</b>	<b>1 (2%)</b>	
- Ohne postoperative Komplikationen	- 1	
<b>Insgesamt</b>	<b>59</b>	

### 3.3 Mikrobiologische Befunde

Unter allen Patient:innen wurde in 27 von 59 Fällen (45,8%) eine Blutkultur abgenommen. Davon zeigten drei Blutkulturen (11,1%) einen positiven Erregernachweis. Intraoperativ erfolgte in 53 Fällen (89,3%) ein Abdominalabstrich. Dieser zeigte in 34 Fällen (57,6%) einen positiven Erregernachweis. Unter allen NEC-Patient:innen wurde in 21 Fällen (42,9%) eine Blutkultur abgenommen. Davon zeigten sich drei Blutkulturen (14,3%) positiv. Intraoperativ erfolgte in 44 Fällen (89,8%) ein Abdominalabstrich. Dieser war in 29 Fällen (65,9%) positiv.

### 3.4 Histopathologische Befunde

Wir untersuchten insgesamt 135 Resektionspräparate von 75 Patient:innen mit Verdacht auf NEC. Von lediglich 59 Kindern (79%) lagen Resektionspräparate der Erst-OP vor, von 16 (21%) lagen ausschließlich Resektionspräparate anderer Operationen vor, jedoch keine Präparate einer NEC oder anderer ischämischer Darmerkrankungen. Möglicherweise wurden diese in anderen Einrichtungen primär operiert oder mittels konservativer Watch-and-Wait-Strategie therapiert. Dies ließ sich leider in 16 Fällen nicht nachvollziehen, sodass die Daten dieser 16 Kinder von der Studie ausgeschlossen werden mussten.

Von den 59 eingeschlossenen Neugeborenen untersuchten wir sowohl die Resektionsränder als auch einen zentralen Abschnitt des Resektionspräparates (s. Tab. 4). In der Befundung der Resektionsränder zeigte sich die Tunica Mucosa in 38 Fällen vital, während sie sich in 21 Fällen avital präsentierte. In 49 Fällen war die Tunica Muscularis propria ohne pathologischen Befund und in zehn Fällen war die Tunica Muscularis propria avital. In 49 Fällen war keine transmurale Nekrose in den Resektionsrändern erkennbar, während in zehn Fällen eine transmurale Nekrose vorlag. Des Weiteren zeigte sich in 28 Fällen eine Einblutung in das Gewebe des Resektionsrandes – in den restlichen 31 Fällen erschien das Gewebe blande. In 17 Resektionsrändern zeigte sich der histopathologische Befund einer Peritonitis, während in 42 Fällen keine Peritonitis im Resektionsrand vorlag.

Wir untersuchten außerdem die zentralen Abschnitte der Resektionspräparate. Hier zeigte sich die Tunica Mucosa bei 35 Präparaten größtenteils vital, während die Tunica Muscularis bei 21 Präparaten vital erschien. In 26 Fällen sahen wir eine fokale transmurale Nekrose, in 29 Fällen eine Perforation und in 26 Fällen eine Peritonitis. In 12 Fällen sahen wir Zeichen einer Stenose in den Schnittpräparaten.

Außerdem befundeten wir die Schnittpräparate der Zweit-Operationen von den Patient:innen mit initialer NEC bei erneuter Allgemeinzustandsverschlechterung, dem erneuten Auftreten einer NEC oder dem Vorliegen eines Ileus (s. Tab. 5).

Tabelle 4 Histopathologische Befunde der Schnittpräparate der ersten OP

<b>Histopathologischer Befund</b>	<b>Absolute Häufigkeit</b>
<b>Resektionsränder</b>	59 (%)
Avitale Tunica Mucosa	21 (36%)
Avitale Tunica Muscularis	10 (17%)
Transmurale Nekrose	10 (17%)
Hämorrhagie	28 (47%)
Peritonitis	17 (29%)
<b>Zentrale Abschnitte der Resektate</b>	59
Avitale Tunica Mucosa	24 (41%)
Avitale Tunica Muscularis	38 (64%)
Transmurale Nekrose	26 (44%)
Perforation	29 (49%)
Peritonitis	26 (44%)
Stenose	12 (20%)

Tabelle 5 Histopathologische Befunde der Resektionspräparate der zweiten OP

<b>Histopathologischer Befund</b>	<b>Absolute Häufigkeit</b>
<b>Resektionsränder</b>	16 (%)
Avitale Tunica Mucosa	9 (56%)
Avitale Tunica Muscularis	5 (31%)
Transmurale Nekrose	3 (19%)
Hämorrhagie	8 (50%)
Peritonitis	5 (31%)
<b>Zentrale Abschnitte der Resektate</b>	16
Avitale Tunica Mucosa	10 (63%)
Avitale Tunica Muscularis	6 (38%)
Transmurale Nekrose	6 (38%)
Perforation	2 (13%)
Peritonitis	6 (38%)
Stenose	6 (38%)

Von 21 Kindern lagen neben den NEC-Resektaten auch Schnittpräparate weiterer Operationen vor, wie zum Beispiel Tonsillen nach Tonsilektomie, die jedoch in keinem Zusammenhang mit der NEC oder den anderen ischämischen Darmerkrankungen standen und somit nicht in die Studie einbezogen wurden.

### **Zusatzfärbungen**

Wir führten für die Präparate der initialen Operationen, in denen sich lichtmikroskopisch Zeichen einer Einblutung in den Resektionsrand zeigten, eine weitere Eisenfärbung und eine immunhistochemische Analyse mit CD15- und CD68-Antikörpern durch. Insgesamt wurden die Präparate von 21 Patient:innen untersucht (s. Tab 6). Von sechs Patient:innen wurden die Paraffinblöcke im Laufe der Studie aus dem Archiv des Instituts routinemäßig entsorgt, sodass keine Zusatzfärbungen angefertigt werden konnten. In 16 Fällen (76,2%) ließen sich mittels Eisenfärbung keine Hämosiderin-beladenen Makrophagen nachweisen. In vier Fällen (19%) lag eine diskrete und in einem Fall (4,8%) eine milde Ansammlung von Hämosiderin-beladenen Makrophagen vor. Der Nachweis von Monozyten beziehungsweise Granulozyten mittels CD15-Antikörper gelang in allen 21 Fällen (100%). Dabei fand sich in zehn Fällen (47,6%) eine diskrete, in sechs Fällen (28,6%) eine milde und in fünf Fällen (23,8%) eine ausgeprägte Ansammlung von CD15-positiven Zellen. Auch der Nachweis von CD68-positiven Zellen wie Histozyten war in den Präparaten aller 21 Fälle (100%) möglich. In neun Fällen (42,9%) war der Nachweis diskret, in acht Fällen (38,1%) mild und in vier Fällen (19%) ausgeprägt.

Somit ergab sich in allen Fällen (100%) eine Kolokalisation von Histozyten und Monozyten beziehungsweise Granulozyten, während in nur fünf Fällen (23,8%) eine Kolokalisation von Histozyten, Monozyten und mit Hämosiderin-beladenen Makrophagen vorlag.

*Tabelle 6 Häufigkeiten der histopathologischen Befunde der Zusatzfärbungen aller Präparate mit Einblutung in den Resektionsrand*

	<b>Absolute Häufigkeit (Prozent)</b>
<b>Eisenfärbung</b>	21
Kein Nachweis	16 (76,2%)
Diskret	4 (19%)
Mild	1 (4,8%)
<b>CD15</b>	21
Diskret	10 (17%)
Mild	6 (38%)
Ausgeprägt	6 (38%)
<b>CD68</b>	21
Diskret	9 (42,9%)
Mild	8 (38,1%)
Ausgeprägt	4 (19%)
<b>Kolokalisationen</b>	
Kolokalisation CD15 & CD68	21 (100%)
Kolokalisation Eisen, CD15 & CD68	5 (23,8%)

### **3.5 Zusammenhangsanalyse**

Es wurde für jeden einzelnen histopathologischen Befund (s. Abschnitt 3.3) untersucht, ob ein Zusammenhang zum postoperativen Verlauf besteht (s. Tab. 7). Das Ziel war, bei allen 59 operierten Kindern einen Zusammenhang zwischen dem histopathologischen Befund des Resektates unabhängig von der Diagnose bei Erst-OP und dem postoperativen Verlauf zu untersuchen. Außerdem untersuchten wir explizit einen möglichen Zusammenhang zwischen dem histopathologischen Befund und dem postoperativen Verlauf ausschließlich der Kinder, die eine gesicherte NEC hatten. Hierfür wendeten wir sowohl univariate Zusammenhangsanalysen als auch multivariate Zusammenhangsanalysen an.

### **Univariate Zusammenhangsanalyse aller Diagnosen**

Resektionsränder: Während sich in unseren Daten kein Zusammenhang zwischen der Vitalität der Tunica Mucosa und der Tunica Muscularis in den Resektionsrändern und dem postoperativen Verlauf zeigte (p-Wert = 0,78 bzw. 0,32), präsentierte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Hämorrhagie im Resektionsrand und dem postoperativen Verlauf der Patient:innen (p-Wert = 0,032).

In der weiteren Analyse ist in der univariaten Analyse kein statistischer Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Vollwandnekrose oder einer Peritonitis im Bereich der Resektionsränder und dem postoperativen Verlauf (p-Wert = 0,16 bzw. p-Wert = 0,19) entdeckt worden.

Zentrale Anteile: Betrachtet man die Zusammenhangsanalyse zwischen den histopathologischen Befunden in den zentralen Anteilen der Resektate und dem postoperativen Verlauf, zeigte sich in keinem Fall ein statistischer Zusammenhang. Als weiteren Parameter betrachteten wir zusätzlich für das gesamte Resektionspräparat das Vorliegen von Zeichen einer stenotischen Veränderung. Diese stand jedoch wie auch die anderen Parameter in keinem statistischen Zusammenhang mit dem postoperativen Verlauf der Patient:innen.

*Tabelle 7 Univariate Zusammenhangsanalyse von allen Patient:innen zwischen postoperativem Verlauf und histopathologischem Befund mit exaktem Test nach Fisher*

<b>Histopathologischer Befund der Resektionsränder</b>				
	Komplikationsfrei	Komplikationen	Tode	<i>p</i>
Vitale Mucosa	20	15	3	0,781
Avitale Mucosa	9	10	2	
Vitale Muscularis	25	21	3	0,321
Avitale Muscularis	4	4	2	
Keine Vollwandnekrose	26	18	5	0,162
Vollwandnekrose	3	7	0	
Ohne Einblutung	20	10	1	0,032
Mit Einblutung	9	15	4	
Keine Peritonitis	20	20	2	0,193
Peritonitis	9	5	3	
<b>Histopathologischer Befund der zentralen Anteile</b>				
	Komplikationsfrei	Komplikationen	Tode	<i>p</i>
Vitale Mucosa	19	13	3	0,580
Avitale Mucosa	10	12	2	
Vitale Muscularis	13	6	2	0,301
Avitale Muscularis	16	19	3	
Keine Vollwandnekrose	16	13	4	0,586
Vollwandnekrose	13	12	1	
Keine Perforation	12	16	2	0,187
Perforation	17	9	3	
Keine Peritonitis	15	15	3	0,855
Peritonitis	14	10	2	
Keine Stenose	25	19	3	0,251
Stenose	4	6	2	
<b>Gesamt</b>	29	25	5	59

### **Univariate Zusammenhangsanalyse aller NEC-Patient:innen**

Resektionsränder: Darüber hinaus überprüften wir in einer weiteren Zusammenhangsanalyse explizit bei 49 Kindern mit diagnostizierter NEC einen Zusammenhang zwischen der Histopathologie und dem postoperativen Verlauf. Hier zeigten unsere Daten ebenfalls, dass kein Zusammenhang zwischen der Vitalität der Resektionsränder im Hinblick auf Tunica Mucosa, Tunica Muscularis oder einer Vollwandnekrose und dem postoperativen Verlauf vorlag (p-Wert = 1,000, 0,304 bzw. 0,217).

Dem entgegen zeigte sich erneut ein statistischer Zusammenhang zwischen einer Einblutung in das Gewebe des Resektionsrandes und dem Auftreten postoperativer Komplikationen (p-Wert < 0,001).

Zentrale Anteile: Eine Zusammenhangsanalyse der Histopathologie der zentralen Segmente eines resezierten Darmanteils im Hinblick auf die Vitalität der Tunica Mucosa und Tunica Muscularis, dem Vorliegen einer fokalen Vollwandnekrose, einer Peritonitis oder einer Perforation zeigte keinen statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem postoperativen Verlauf. Dies galt sowohl für alle eingeschlossenen Patient:innen als auch für die spezifische Auswertung der Patient:innen mit NEC als Diagnose (s. Tab. 7 bzw. 8).

*Tabelle 8 Univariate Zusammenhangsanalyse von allen NEC-Patient:innen zwischen postoperativem Verlauf und histopathologischem Befund mit Exaktem Test nach Fisher*

<b>Histopathologischer Befund der Resektionsränder</b>				
	Komplikationsfrei	Komplikationen	Tode	<i>p</i>
Vitale Mucosa	15	12	3	1,000
Avitale Mucosa	9	8	2	
Vitale Muscularis	21	16	3	0,304
Avitale Muscularis	3	4	2	
Keine Vollwandnekrose	21	14	5	0,217
Vollwandnekrose	3	6	0	
Ohne Einblutung	20	6	1	<0,001
Mit Einblutung	4	14	4	
Keine Peritonitis	17	15	2	0,406
Peritonitis	7	5	3	
<b>Histopathologischer Befund der zentralen Anteile</b>				
	Komplikationsfrei	Komplikationen	Tode	<i>p</i>
Vitale Mucosa	15	10	3	0,772
Avitale Mucosa	9	10	2	
Vitale Muscularis	10	4	2	0,283
Avitale Muscularis	14	16	3	
Keine Vollwandnekrose	13	11	4	0,654
Vollwandnekrose	11	9	1	
Keine Perforation	11	13	2	0,388
Perforation	13	7	3	
Keine Peritonitis	13	11	3	1,000
Peritonitis	11	9	2	
Keine Stenose	21	14	3	0,214
Stenose	3	6	2	
<b>Gesamt</b>	24	20	5	49

### **Multivariate Zusammenhangsanalyse mit dem Cox-Regressionsmodell**

In der Gruppe der NEC-Patient:innen war das Cox-Regressionsmodell mit dem postoperativen Verlauf als abhängige Variable und den histopathologischen Befunden der Resektionsränder als unabhängige Variablen statistisch signifikant  $\chi^2(5) = 18,213$ ,  $p = 0,003$ .

Von den fünf Variablen, die in das Modell aufgenommen wurden, waren zwei signifikant, die frische Einblutung/Hämorrhagie ( $p < 0,001$ ), und das Vorliegen einer Vollwandnekrose ( $p = 0,046$ ), während Vitalität der Mucosa ( $p = 0,383$ ), Vitalität der Muscularis ( $p = 0,218$ ) und Peritonitis ( $p = 0,995$ ) keinen signifikanten Einfluss auf prädiktive Leistung des Modells hatten. Einblutung führte eher zu Komplikationen mit einem Hazard Ratio von 4,926 (95% CI = 1,908-12,718). Das heißt, dass bei Patient:innen mit Einblutung in den Resektionsrand das Risiko für eine Komplikation fast 5-fach erhöht ist. Für Patient:innen mit einer Vollwandnekrose im Resektionsrand ist das Risiko fast 3-fach erhöht (Hazard Ratio = 2,727). Alle Modellkoeffizienten und Hazard Ratio können Tabelle 9 entnommen werden.

In der Gruppe aller Patient:innen war das Cox-Regressionsmodell ebenfalls signifikant  $\chi^2(5) = 11,637$ ,  $p = 0,040$ . Die frische Einblutung/Hämorrhagie war auch in diesem Modell die signifikante Variable ( $p = 0,006$ ). Mit einem Hazard Ratio von 3,447 (95% CI = 1,435-8,280) ist das Risiko für Komplikationen bei dem Vorliegen einer Einblutung in den Resektionsrand um das 3,5-fache erhöht (s. Tabelle 10).

Tabelle 9 Cox-Regressionsmodell NEC-Patient:innen

	Sig.	Hazard Ratio	95,0% CI for Hazard Ratio	
			Lower	Upper
Vitalität der Mucosa	,383	,572	,163	-,559
Vitalität der Muscularis	,218	2,618	,566	,962
Vollwandnekrose	,046	2,727	1,017	1,003
Peritonitis	,995	1,003	,388	,003
Einblutung in den Resektionsrand	<,001	4,926	1,908	1,595

Tabelle 10 Cox Regression aller Patient:innen

	Sig.	Hazard Ratio	95,0% CI for Hazard Ratio	
			Lower	Upper
Vitalität der Mucosa	,892	,926	,308	2,788
Vitalität der Muscularis	,630	1,414	,346	5,778
Vollwandnekrose	,062	2,509	,955	6,592
Peritonitis	,644	,804	,319	2,027
Einblutung in den Resektionsrand	,006	3,447	1,435	8,280

### Univariate Zusammenhangsanalyse CD15-, CD68- und Eisenfärbung

Im weiteren Verlauf wurde untersucht, ob sich das Ausmaß einer Entzündungsreaktion als Folge einer Einblutung in den Resektionsrand ver- und quantifizieren lässt. Hierfür wurden in den Fällen mit Einblutungen in den Resektionsrand zusätzliche CD15-, CD68- und Eisenfärbungen angefertigt. In der Zusammenhangsanalyse mittels exaktem Test nach Fisher zeigte sich zwischen den Befunden der zusätzlichen Färbungen und dem postoperativen Verlauf in keinem Fall ein Zusammenhang (p-Werte stets > 0,05).

Tabelle 11 Univariate Zusammenhangsanalyse CD15-, CD68- und Eisenfärbung und postoperativer Verlauf

<b>Zusammenhangsanalyse CD15, CD68 sowie Eisenfärbung mit postoperativem Verlauf</b>					
<b>CD15</b>	Komplikationsfrei	Komplikationen	Tode		<i>p</i>
Diskret	2	7	1	10 (17%)	0,403
Mild	1	4	1	6 (38%)	
Ausgeprägt	3	1	1	6 (38%)	
<b>CD68</b>					
Diskret	2	7	0	9 (43%)	0,296
Mild	2	4	2	8 (38%)	
Ausgeprägt	2	1	1	4 (19%)	
<b>Eisen</b>					
Nicht nachweisbar	5	9	2	16 (76%)	0,429
Diskret	1	3	0	4 (19%)	
Mild	0	0	1	1 (5%)	
<b>Gesamt</b>	6	12	3	21	

### Univariate Zusammenhangsanalyse aller Befunde der Zweit-Operationen

Des Weiteren analysierten wir einen Zusammenhang zwischen den histopathologischen Befunden der Operationspräparate der Folgeoperationen und dem klinischen Verlauf (s. Tab. 14 im Anhang). Hier zeigte sich ein statistischer Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Perforation und dem postoperativen Verlauf (p-Wert = 0,035). Im Hinblick auf den Zusammenhang zwischen Hämorrhagien in den Resektionsrand und dem postoperativen Verlauf zeigte sich entgegen den Ergebnissen der Erst-OP kein Zusammenhang. In der

weiteren Analyse konnten keine weiteren statistisch signifikanten Zusammenhänge gefunden werden.

### **Multivariate Zusammenhangsanalyse - Binär logistisches**

#### **Regressionsmodell – Mikrobiologische Befunde**

Das binär logistische Regressionsmodell mit dem postoperativen Verlauf als abhängige Variable und den mikrobiologischen Befunden als unabhängige Variablen zeigte sich statistisch knapp nicht signifikant  $\chi^2(2) = 5,958$ ,  $p = 0,051$  mit einer Varianzaufklärung von Nagelkerkes  $R^2 = 0,296$ . Die Überprüfung der Anpassungsgüte im Hosmer-Lemeshow-Test wies eine hohe Anpassungsgüte auf,  $\chi^2(1) = 0,000$   $p > 0,05$ .

### **3.6 Time-to-Event-Analyse**

Im Rahmen der Cox Regressionsanalyse führten wir eine Time-to-Event-Analyse durch. Über ein Jahr wurden die Kinder nach chirurgischer Intervention nachbeobachtet. Die Zeit bis zum Auftreten von Komplikationen wurde in Tagen gemessen. Der Exitus letalis wurde in dieser Analyse ebenfalls als Komplikation gewertet, um so in zwei Gruppen einteilen zu können.

Die folgende Abbildung 14 veranschaulicht das unterschiedlich häufige Auftreten von Komplikationen in Abhängigkeit von dem Vorliegen von Hämorrhagien in den Resektionsrand innerhalb der Kohorte aller Patient:innen im Beobachtungszeitraum von einem Jahr. Im Median traten in der Gruppe mit Einblutungen in den Resektionsrand nach zehn Tagen (95%-KI[0.0;21.67]) Komplikationen auf. In der Gruppe ohne Einblutungen hingegen ließ sich kein Median ermitteln, da in weniger als 50% der Fällen Komplikationen auftraten.

In der Kohorte der NEC-Patient:innen traten in der Gruppe mit Einblutungen in den Resektionsrand im Median nach zehn Tagen (95%-KI[6.48;13.53]) Komplikationen auf. Auch hier ließ sich kein Median für die einblutungsfreie Gruppe ermitteln, da bei weniger als 50% Komplikationen auftraten (Abb. 15).

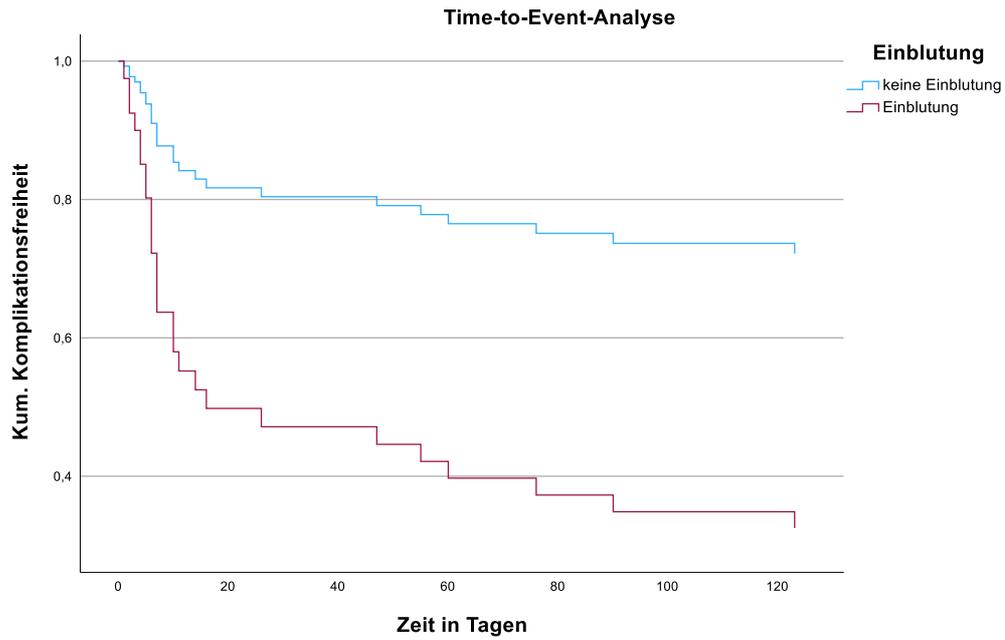


Abbildung 13 Time-to-Event-Analyse. Auftreten von Komplikationen in Abhängigkeit von dem Vorliegen von Einblutungen in den Resektionsrand in der Kohorte aller Patient:innen.

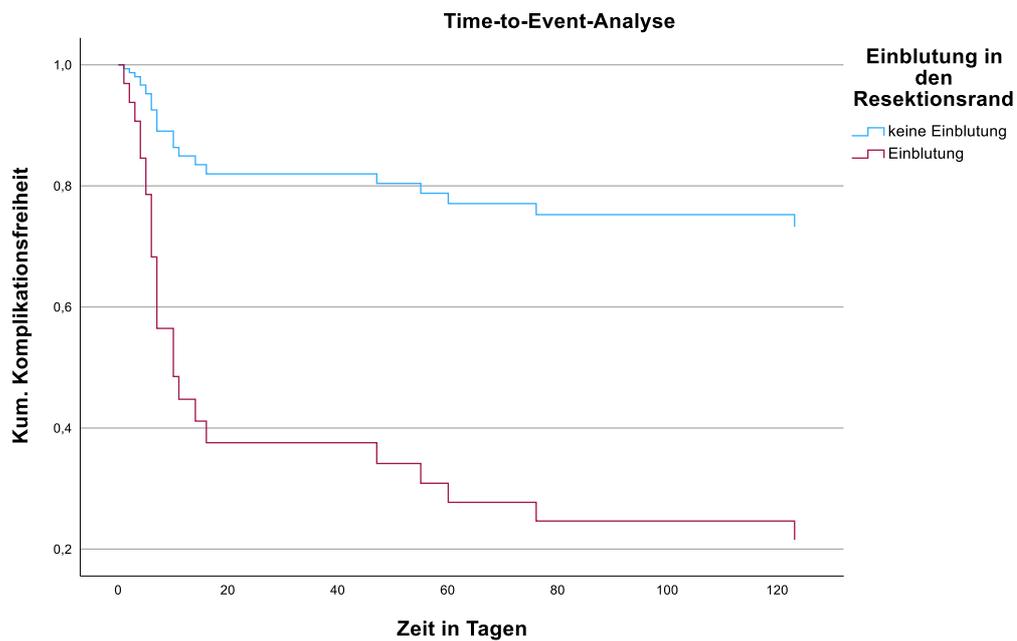


Abbildung 14 Time-to-Event-Analyse. Auftreten von Komplikationen in Abhängigkeit von dem Vorliegen von Einblutungen in den Resektionsrand in der Kohorte der NEC-Patient:innen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Charakteristik der Kohorte

Die Ergebnisse dieser Kohorte gleichen den Ergebnissen anderer Kohorten in der Literatur.<sup>33-34</sup> Im Mittel lag das Geburtsgewicht der Patient:innen unserer Kohorte bei 889g. Der Median des Gestationsalters beläuft sich auf 27 Schwangerschaftswochen und alle Patient:innen waren vor der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche geboren und somit per Definition Frühgeborene.<sup>33</sup> Die NEC trat in unserer Kohorte im Median bei 16 Lebenstagen auf und ist somit vergleichbar mit dem typischen Manifestationsalter der NEC, welches zwischen der zweiten und vierten Lebenswoche liegt. Sie tritt mit einem erhöhten Risiko vor allem bei Frühgeborenen auf, die vor der 28. Schwangerschaftswoche geboren wurden. Außerdem begünstigt ein Geburtsgewicht von unter 1.500g das Auftreten einer NEC.<sup>35</sup> Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Inzidenz der NEC mit abnehmendem Gewicht bei Geburt zunimmt.<sup>7</sup> Dies deckt sich mit den Daten unserer Kohorte, in der die Gruppe mit einem Geburtsgewicht unter 750g am stärksten vertreten war (s. Abb. 16).

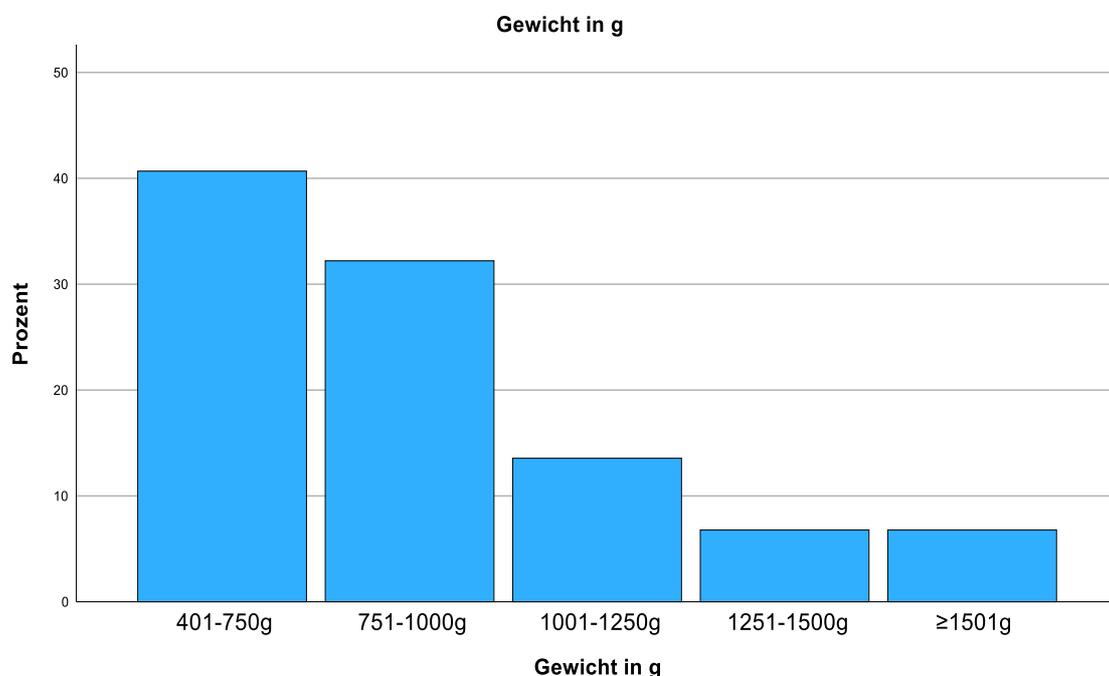


Abbildung 15 Relative Häufigkeit des Geburtsgewichtes in unserer Kohorte

## 4.2 Klinischer Verlauf

Der postoperative, klinische Verlauf der Kinder mit operierter NEC kann in kurz- und langfristige Komplikationen bis hin zum Exitus letalis differenziert werden.

### Exitus letalis

Die Angaben bezüglich der Letalität der NEC variieren zwischen 10-42%.<sup>3,12,36,37</sup> In einer Auswertung von Krankenkassendaten Frühgeborener ermittelten Jeschke et al.<sup>34</sup> 474 Kinder, die beim Vorliegen einer NEC/FIP chirurgisch versorgt wurden. 97 Kinder verstarben postoperativ, womit sich eine Letalität von 20,5% ergab. Da in unsere Studie ebenfalls nur Frühgeborene eingeschlossen wurden, die eine chirurgische Intervention erhielten, lassen sich die Angaben bezüglich der Letalität gut vergleichen. Mit einer Letalität von 10% bewegt sich die Sterblichkeitsrate unserer Kohorte im Vergleich im unteren Niveau. Der Beobachtungszeitraum in unserer Studie war darüber hinaus mit einem Jahr größer gefasst als bei Jeschke et al., welche ein halbes Jahr als Beobachtungszeitraum wählten.

### Kurzfristige Komplikationen

Im unmittelbar postoperativen Verlauf treten in 50-70% der Fälle typische, viszeralchirurgische Komplikationen wie Anastomoseninsuffizienzen, Wundinfektionen bis hin zur Sepsis, Peritonitiden oder Strikturen auf.<sup>38-39</sup> Diese Angaben in der Literatur zu Kindern mit postoperativen Komplikationen deckt sich grundsätzlich mit der Häufigkeit in unserer Studie, welche bei 48,89% lag. Entgegen der Datensammlung von Horwitz et al.<sup>38</sup> definierten wir eine erneute NEC, einen Ileus oder eine Allgemeinzustandsverschlechterung, die eine operative Therapie bedingten, als Komplikationen der initial operativen Versorgung der NEC.

Horwitz et al. untersuchten in ihrer multizentrischen Studie die postoperativen Komplikationen bei 252 Neugeborenen mit gesicherter NEC, die eine Peritonealdrainage oder eine primäre Laparotomie erhielten.<sup>38</sup> Dabei zeigten sich in 49% der Fälle postoperative Komplikationen. Am häufigsten waren Sepsis (9%), Strikturen (9%) oder ein Kurzdarmsyndrom (8.7%). Allerdings wurden weiterhin ein Nierenversagen, das Kurzdarmsyndrom und auch eine

Disseminierte Intravasale Gerinnung (DIC) als postoperative Komplikationen eingeschlossen. Sofern wir diese Komplikationen in unsere Studie ebenfalls miteinschließen würden, ist gut vorstellbar, dass sich die Rate an Komplikationen in der vorliegenden Studie erhöhen würde.

Aufgrund des inflammatorischen Geschehens ist die Ausbildung von Strikturen und Stenosen unabhängig von der Wahl der Therapie durch fibrotische Umbauprozesse der Darmwand möglich<sup>40,41,42</sup>. In einer retrospektiven, multizentrischen Studie untersuchten Heida et al. das Auftreten von Strikturen nach einer akuten NEC.<sup>42</sup> Bei 19% der Patient:innen zeigte sich dabei röntgenologisch oder intraoperativ der Nachweis einer Striktur. Innerhalb der Gruppe von Patient:innen mit Striktur zeigte sich häufiger eine Striktur nach initial chirurgischer Intervention (24%) verglichen mit der Häufigkeit bei medikamentöser Therapie (17%). Auch in unseren Daten kam es nachweislich zu Strikturen nach chirurgischer Intervention bei einer akuten NEC: In den 17 Resektionspräparaten der Zweit-OPs zeigten sich in der histopathologischen Befundung bei 6 Patient:innen Zeichen einer Stenose im Sinne einer Lumeneinengung und submuköser Fibrose beziehungsweise prästenotische Zeichen einer deutlichen Dilatation. Auf die Kohorte mit 49 NEC-Kindern bezogen, liegt der Anteil einer gesicherten post-NEC Striktur bei 12,24%. Es ist anzunehmen, dass in der vorliegenden Studie die Dunkelziffer mechanisch nicht-wirksamer Stenosen höher sein dürfte, da die Stenosen nur bei symptomatischen Patient:innen, die eine chirurgische Intervention aufgrund der Stenose erhielten, detektiert wurden und keine röntgenologische Analyse durchgeführt wurde. Außerdem wurden im Gegensatz zur Studie von Heida et al. keine Patient:innen mit konservativer Behandlung der Post-NEC-Stenose eingeschlossen. Allerdings zeigten sich auch in den Resektionspräparaten der Erst-OP in 11 von 49 Fällen (22,45%) mit gesicherter NEC Zeichen einer stenotischen Veränderung. Dies entspricht in etwa den Untersuchungen von Gorbatyuk et al.<sup>43</sup> In jener Studie wurde das Auftreten einer Obstruktion bei Vorliegen einer NEC untersucht. In 18,18% der Fälle konnte röntgenologisch und sonografisch der Nachweis einer Obstruktion erbracht werden. Am ehesten ist hier eine starke Inflammation und überschießende Abräumreaktion ursächlich für fibrotische Umbauprozesse und

die resultierende Lumeneingengung im Sinne der Post-NEC-Stenose, wie sie in der Studie von Heida et al. definiert wurde.

Sowohl nach chirurgischer als auch nach medikamentöser Therapie der NEC kann es in 4-10% der Fällen zu einem Rezidiv der NEC kommen.<sup>44,45</sup> Vergleicht man die Daten mit unserer Kohorte aller 49 NEC-Patient:innen, so entwickelten bei uns ebenfalls 10% (5 von 49 Kindern) ein NEC-Rezidiv.

### **Typische Postoperative Komplikationen**

Eine weitere typische und langfristige Komplikation der NEC nach chirurgischer Intervention ist die Malassimilation, die in bis zu 20% in ihrer Maximalform – dem Kurzdarmsyndrom – zu einer lebenslangen parenteralen Substitution von Vitaminen und Mineralstoffen führen kann.<sup>26</sup> Aus diesem Grund ist das therapeutische Ziel jeder chirurgischen Intervention, den befallenen Darm so sparsam wie möglich zu resezieren.

Als weitere postoperative Langzeitkomplikation konnte in Studien eine verzögerte neurologische Entwicklung nachgewiesen werden.<sup>46,47</sup>

Da der Fokus dieser Studie auf unmittelbar postoperativ auftretenden Komplikationen und Komplikationen im Operationsbereich liegt, wurde in der Zusammenhangsanalyse die neurologische Entwicklung und das Vorliegen eines Kurzdarmsyndroms nicht berücksichtigt.

### **4.3 Histopathologische Befunde**

In der aktuellen Literatur finden sich wenige Studien mit dem Fokus auf der lichtmikroskopischen Untersuchung von Resektionspräparaten der NEC. Trotzdem sind die histopathologischen Charakteristika der NEC heute gut beschrieben.<sup>28,29,31</sup> Kennzeichnend für die NEC ist eine Vollwandnekrose mit Einblutungen, entzündlichem Infiltrat, reparativen Epithelveränderungen und dem Vorliegen einer Peritonitis.<sup>28</sup> Darüber hinaus zeigt sich regelmäßig submucosal eine Pneumatosis intestinalis als krankheitstypischer Befund.

#### Unterschiede zwischen den Resektionsrändern und den zentralen Abschnitten:

Die Tunica Muscularis der Resektionsränder zeigte sich in den Schnittpräparaten meist vital (49 von 59 aller Kinder = 83% und 40 von 49 NEC-Kindern = 81,6%). Dem entgegen zeigte sich die Tunica Muscularis in den zentralen Abschnitten der Resektionspräparate häufig avital (38 von 59 aller Kinder = 64% und 33 von 49 NEC-Kindern = 67%). Die intraoperative makroskopische Unterscheidung zwischen vitalem und avitalem, nekrotischem und entzündetem Gewebe scheint sehr gut von den Chirurg:innen differenzierbar zu sein. Das wird im Vergleich von dem Vorliegen einer Peritonitis bestärkt: In den Resektionsrändern (27 von 59 aller Kinder = 29% und 15 von 49 aller NEC-Kinder = 31%) war eine Peritonitis seltener als in den zentralen Abschnitten (26 von 59 aller Kinder = 44% und 17 von 49 aller NEC-Kinder = 45%). Gleiches gilt für das Vorliegen einer Vollwandnekrose: in neun Fällen zeigte sich in den Resektionsrändern eine Vollwandnekrose (9 von 49 = 18%) und in 21 Fällen fanden sich in den zentralen Anteilen Zeichen für eine Vollwandnekrose (21 von 49 = 43%). Auch das spricht für die gute makroskopische Differenzierbarkeit der avitalen Segmente durch die Kinderchirurg:innen.

Nekrotische Veränderungen: Das in dieser Arbeit beobachtete Schädigungsmuster des Darms im Rahmen der NEC entspricht vorwiegend einem ischämischen Muster mit einem Punctum Maximum zumeist im antimesenterialen Anteil der Darmwand (Abb. 5) und mit Beginn der mikrozirkulatorischen Schädigung in dem luminalen Anteil der Mucosa und sukzessiver Schädigung bis zur äußeren muscularis propria bis hin zur Vollwandnekrose (Abb. 4). Dies wurde auch von Hong-yi Zhang et al.<sup>48</sup> beobachtet.

Weiterhin definierten wir in unserer Studie die Tunica Mucosa beziehungsweise die Tunica Muscularis als avital, wenn mehr als 30% des Querschnitts avital imponierten. Waren alle Schichten betroffen und nicht mehr klar differenzierbar, definierten wir dies als Vollwandnekrose. Da wir somit nicht jedes Vorliegen einer sehr gering ausgeprägten Nekrose als avital definierten, ergab sich wahrscheinlich das seltenere Auftreten – 67,35% in unseren Daten – verglichen mit anderen Studien, bei denen das Vorliegen nekrotischer Veränderungen mit 89 bis hin zu 100% angegeben wird.<sup>28,49</sup>

Dem entgegen schwanken die Angaben über das Vorliegen einer Vollwandnekrose deutlich zwischen 10 und 77%.<sup>28,50</sup> Bei 43% der Patient:innen unserer Studie lagen Vollwandnekrosen vor. Remon et al. verzeichneten in ihrer Studie ähnliche Ergebnisse: Etwas mehr als die Hälfte der Fälle zeigte eine schwere transmurale und nekrotische Inflammation der Darmwand (51.5%).<sup>49</sup> Vergleicht man das Ausmaß des Mucosaschadens in der vorliegenden Studie mit den Angaben in der Literatur, zeigt sich eine relative Übereinstimmung: Schaart et al.<sup>29</sup> fanden in 11 von 21 Fällen (52%) einen vollständigen Mucosaschaden, Eaton et al.<sup>50</sup> in 58% und wir in 21 von 49 Fällen (43%).

Entzündliche Veränderungen: Ballance et al.<sup>28</sup> beschreiben das Auftreten einer Peritonitis eher als fokales Ereignis, was sich mit unseren Beobachtungen deckt. In unseren Daten zeigte sich jedoch eine Peritonitis (42,86%) seltener als bei Ballance et al. (68%). Des Weiteren fanden sich bei einem Großteil der Präparate in der Studie von Ballance et al. (60%) sowohl Zeichen einer akuten als auch einer chronischen Inflammation, was als Hinweis auf inflammatorische Prozesse vor der Manifestation der akuten NEC gesehen werden kann. In einer Studie von Remon et al. zeigte sich in etwas mehr als der Hälfte der Fälle eine schwere transmurale und nekrotische Inflammation der Darmwand (51,5%).<sup>49</sup>

Hämorrhagie: Einblutungen sind mit bis zu 74% mitunter ein häufiges histopathologisches Merkmal der NEC.<sup>27,28</sup> Wir untersuchten hauptsächlich das Vorliegen von Einblutungen in die Resektionsränder und nicht in den stark befallenen Abschnitten der Erkrankung. In den Resektionsrändern kann die Einblutung nicht nur eine Folge der Erkrankung selbst sein, sondern auch eine Folge der Gewebemanipulation durch die chirurgischen Instrumente. In den Resektionsrändern unserer Schnittpräparate bezifferte sich die Häufigkeit von Zeichen einer Einblutung auf 47%. Das ließe sich damit erklären, dass die Resektionsränder eher fern der Erkrankung liegen und die Operateur:innen im Sinne der Therapie im gesunden Gewebe die Resektionsränder setzen. Die 47% schienen weniger durch die NEC selbst, als eher durch die mechanische Manipulation im Rahmen der Resektion entstanden zu sein.

Die Ergebnisse der Befundung mittels CD15-, CD68- und Eisenfärbung, wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, wiesen bei fünf Patient:innen positive Eisenfärbungen in den Resektionsrändern auf, welche als Hinweis auf eine ältere stattgehabte Blutung gewertet werden können, während die CD15- und CD68-Färbungen stets positiv waren. Das bestärkt die These, dass die in unserer Studie entdeckten Einblutungen in die Resektionsränder aufgrund der chirurgischen Intervention als frische, akute Blutung zu werten sind und nicht als alte Blutungen im Rahmen einer chronisch-hämorrhagischen Entzündungsreaktion.

Strikturen: Das Auftreten von Strikturen durch fibrotische Umbauprozesse als postinflammatorisches, postreparatives Phänomen ist in der Literatur sowohl auf histologischer<sup>51,52</sup> als auch auf klinischer<sup>42,43</sup> Ebene bereits mehrfach beschrieben worden. Bei elf Patient:innen (22%) konnten wir histologisch stenotische Veränderungen bereits in der histopathologischen Befundung der Erst-OP ermitteln. In 28% der Fälle zeigte sich in der Studie von Ballance et al. fibrotische Veränderungen im Sinne von Granulationsgewebe.<sup>28</sup> Hieran wird eine präoperative Fibrosierung durch inflammatorische Prozesse deutlich.

Bakterielle Infiltration und Besiedlung: Aufgrund der Annahme, dass bakterielle Antigene und Bakterien in der Pathogenese der NEC eine große Rolle spielen,<sup>18-22,53</sup> wurde in einigen Studien die bakterielle Invasion in die Darmwand und eine bakterielle Überwucherung der NEC-Läsion näher untersucht.<sup>28,49</sup> In HE-Schnitten konnten Ballance et al. bei 56 von 84 Patient:innen (66%) eine bakterielle Überwucherung nachweisen.<sup>28</sup> Eine weitere Gramfärbung habe Bakterien in der Darmwand nachweisen können. Da sich in unseren histopathologischen Befunden der HE-Schnitte keine bakterielle Besiedlung zeigte, überprüften wir die Präsenz von Bakterien exemplarisch anhand von fünf Fällen mit fokaler Vollwandnekrose. Zur Identifizierung färbten wir die Schnitte mittels Gramfärbung und konnten teilweise tatsächlich eine bakterielle Besiedelung nachweisen. Allerdings ähnelte diese einer postmortalen Besiedelung ohne zelluläre Gewebereaktion, wie es nach Autolyse von Geweben der Fall ist. In den restlichen Abschnitten ließen sich keine Bakterien in unseren Präparaten nachweisen (s. Abb. 17 und 18, S. 52). Darüber hinaus ist ein Nachweis von Bakterien mittels lichtmikroskopischer Untersuchung der HE-

Schnitte nur bedingt aussagekräftig und besitzt laut Ring et al. lediglich eine Sensitivität von 0.43 sofern die bakteriellen Aggregate >10µm sind.<sup>54</sup>

Das Fehlen von Bakterienwachstum in den Resektionspräparaten könnte möglicherweise auch auf die anfänglich konservative Behandlung mit Antibiotika zurückzuführen sein, welche die Bakterienkolonien eradiziert, sodass zum Zeitpunkt der Operation keine Bakterien mehr identifiziert werden können. Daher ist die initial höchstwahrscheinlich bakterielle Schädigung des unreifen Darms in der Phase der Operation histologisch nicht mehr nachweisbar. Zum Zeitpunkt der Operation scheint der führende Pathomechanismus der NEC ischämischer Natur zu sein.

Perforation: Die zentralen Abschnitte zeigten bei 47% der Patient:innen eine auch lichtmikroskopisch sichtbare Perforation. Dies deckt sich ziemlich genau mit der Prävalenz von 45% in der Studie von Santulli et al.<sup>55</sup>

Unauffällige Befunde: Nennenswert sind außerdem die Angaben über unauffällige Befunde von Resektaten. Eaton et al. zogen in ihren Untersuchungen zur gezielteren Differenzierung zwei unterschiedliche HE-Schnitte pro Patient heran: ein schwer befallenes Areal – meist im Zentrum des Operationspräparates – und ein mild bis gar nicht befallenes Areal – meist der Resektionsrand.<sup>50</sup> In 32% aller Resektate wurden keine pathologischen Befunde entdeckt. Unauffällige Befunde wurden von uns nicht speziell definiert, allerdings könnte unter der Annahme, dass eine vitale Tunica Mucosa in Kombination mit einer vitalen Tunica Muscularis einen unauffälligen Befund darstellen, liegt in unserer Studie in 33% der Fälle ein weitestgehend unauffälliger Befund vor. Die Häufigkeit entspricht nahezu vollständig den Ergebnissen von Eaton et al.

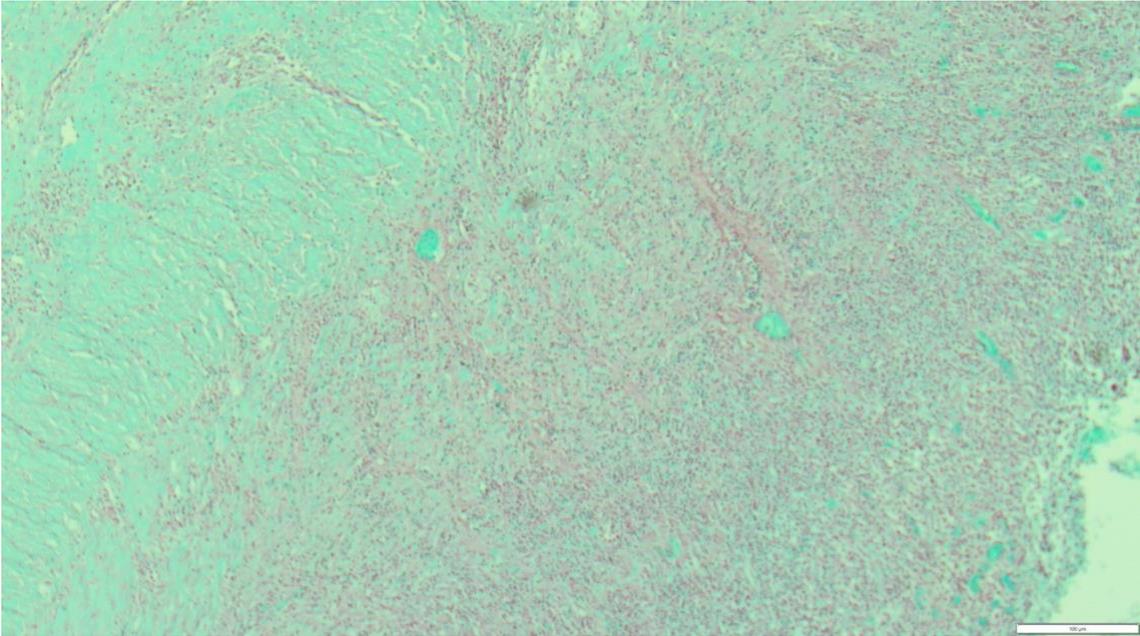


Abbildung 16 Gramfärbung. 4x Vergrößerung.

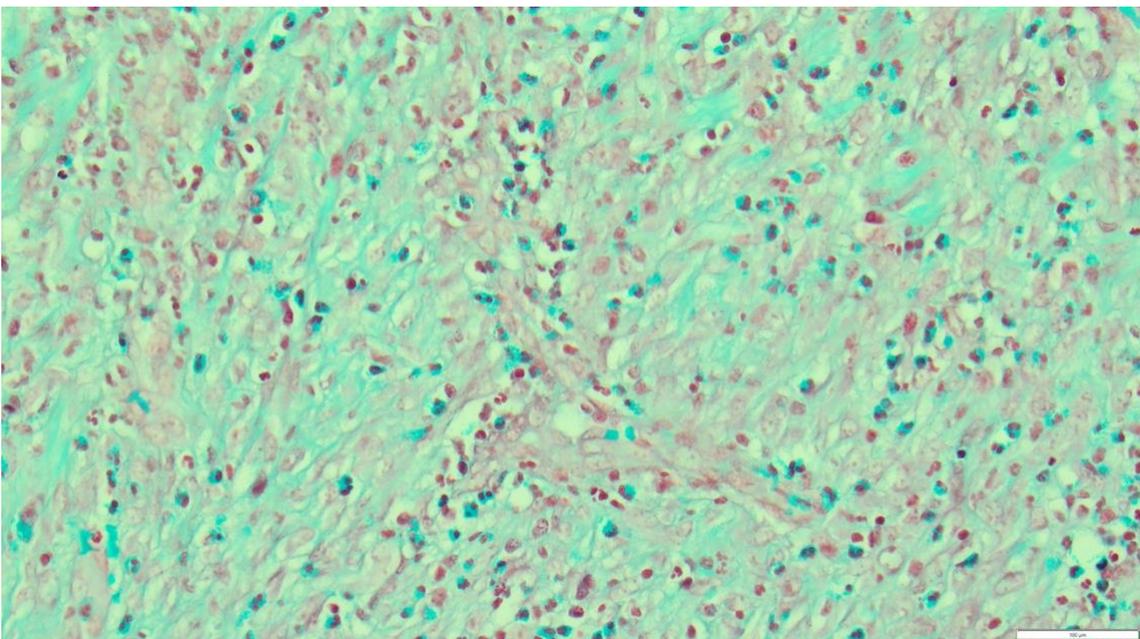


Abbildung 17 Gramfärbung. 20-fache Vergrößerung. Keine bakterielle Besiedelung nachweisbar.

## 4.4 Zusammenhangsanalyse

Soweit uns bekannt ist, existieren bis heute (Februar 2024) lediglich zwei Studien, die einen Zusammenhang zwischen den histopathologischen Befunden der NEC und dem postoperativen, klinischen Verlauf untersuchen.<sup>49,50</sup> Wie im Folgenden erläutert, unterscheiden sich die Herangehensweise und die Ergebnisse teilweise recht deutlich.

Grundsätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob zwischen einzelnen histopathologischen Befunden des resezierten Darms ein Zusammenhang mit dem postoperativen, klinischen Verlauf besteht. Darüber hinaus ließ sich mit den Daten dieser Arbeit spezifischer vergleichen, ob sich der histopathologische Befund der Resektionsränder auf den klinischen Verlauf auswirkt, oder ob auch der histopathologische Befund der zentralen Abschnitte des resezierten Darms maßgeblich ist. In unseren Daten zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer frischen Einblutung in den Resektionsrand und dem postoperativen klinischen Verlauf sowohl für Früh- und Neugeborene mit NEC als auch für Früh- und Neugeborene mit anderen ischämischen Darmerkrankungen wie FIP, Volvulus oder Mekonium-ileus.

Hämorrhagie: In der vorliegenden Studie zeigte sich in der uni- und multivariaten Zusammenhangsanalyse, dass das Vorliegen einer frischen Hämorrhagie im Gewebe des Resektionsrandes einen unabhängigen Prognosefaktor für den postoperativen klinischen Verlauf darstellt. Es ist bekannt, dass es im Rahmen der Wundheilung nach einem Gewebeschaden, beispielsweise durch extravasale Erythrozyten im Rahmen einer akuten Einblutung und andere Mediatoren, zu einer Entzündung und Abräumreaktion kommt.<sup>56</sup> Diese Abräumaktion kann zu einer unvollständigen Heilung führen.

Ein pathophysiologischer Erklärungsansatz für den bei uns entdeckten Zusammenhang könnte sein, dass die Einblutung und das Ausmaß des Hämatoms zu einem großflächigen oder verstärkten Gewebeschaden beitragen. Vor allem bei Frühgeborenen erscheint eine darauffolgend überschießende und verstärkte Fibrosierung des verbliebenen Darms an der Operationsstelle durch Abbauprodukte der Erythrozyten und anderer Blutbestandteile denkbar.

Aufgrund des physiologisch unreifen Immunsystems des Frühgeborenen könnte es vulnerabler für eine schlecht bis dysregulierte Immunantwort und Reparatur des Gewebes sein.<sup>13</sup> Dies könnte schlussendlich den Heilungsprozess behindern und das postoperative Outcome durch beispielsweise die Ausbildung von Narben und Stenosen verschlechtern. Erschwerend könnte hinzukommen, dass eine DIC als bekannte Komorbidität bei Frühgeborenen<sup>57</sup> das Ausmaß der Einblutung verstärken kann.

Eine mögliche Schlussfolgerung für die Kinderchirurg:innen könnte die möglichst atraumatische Operation sein und im Falle von makroskopisch gut sichtbaren, intraoperativ frisch entstandenen Hämatomen und Einblutungen ebendiese zeitgleich bei der Erst-OP zu entfernen.

Zur weiteren Analyse und spezifischen Untersuchung interessierte uns im Verlauf der Studie, ob sich das Ausmaß einer Entzündungsreaktion als Folge einer Einblutung in den Resektionsrand ver- und quantifizieren lässt und ob sich hieraus eine Schlussfolgerung durch einen möglichen Zusammenhang mit dem postoperativen Verlauf ergibt. Hierfür wurden in den Präparaten der Initialoperationen mit Einblutungen in den Resektionsrand zusätzliche immunhistochemische CD15-, CD68- und Eisenfärbungen analysiert. Mithilfe der Eisenfärbungen sollte das Vorliegen einer Einblutung in das Gewebe zeitlich konkreter eingeordnet werden können. Der aktuellen Literatur zufolge nimmt im zeitlichen Verlauf eines kutanen Hämatoms das Ausmaß der Makrophageninfiltration und Hämosiderinablagerung im gesamten Bereich des Hämatoms zu.<sup>58</sup> Der geringe bis fehlende Nachweis von Eisen und Makrophagen spricht in fast allen Fällen für eine akute Blutung.<sup>58</sup> Entweder ist die Ursache der Blutung im akuten Verlauf der NEC oder aber vor allem als Folge der intraoperativen Gewebemanipulation zu werten. In unserer Arbeit zeigte sich in lediglich fünf Präparaten eine vermehrte Eisenfärbung als Hinweis auf eine stattgehabte, ältere Blutung.

In allen Präparaten von Patient:innen mit Einblutung in den Resektionsrand fand sich eine geringe Zahl von CD15 markierten Monozyten und Granulozyten und CD68 exprimierende Makrophagen. Dies entspricht am ehesten der physiologischen ortsständigen Zellpopulation der Submucosa.<sup>59</sup> Die Zusammenhangsanalyse zwischen den CD15-, CD68- sowie Eisenfärbungen und dem postoperativen Verlauf ergab keinen statistischen Zusammenhang (p-

Wert stets  $> 0.05$ ). Eine spezifische Zusammenhangsanalyse zwischen den Befunden der CD15-, CD68- und Eisenfärbungen der Erst-OP mit dem Vorliegen von Stenosen im klinischen Verlauf war nicht möglich, da zu wenige Befunde der Zweit-Operationen vorhanden waren. Es ergab sich somit keine Empfehlung zur regelhaften Färbung der Schnittpräparate mittels CD15, CD68 oder Eisen.

In unserer Arbeit zeigte sich in allen Fällen mit Einblutungen in den Resektionsrand bei Erst-OP eine Kolokalisation von Histiozyten und Monozyten beziehungsweise Granulozyten. In lediglich fünf Fällen (23.8%) lag eine Kolokalisation von Histiozyten, Monozyten und mit Hämosiderin-beladenen Makrophagen vor. In den fünf Fällen, in denen Hämosiderin-beladene Makrophagen zu finden waren, ließen sich die Hämorrhagien als Blutungsresiduen interpretieren, während in den 16 Fällen ohne Hämosiderin-beladene Makrophagen von einer frischen Blutung im Rahmen der NEC auszugehen war.

Entzündliche Veränderungen: Auf Gewebeschäden im Sinne einer Nekrose oder Einblutung folgt eine Infiltration mit Entzündungszellen und die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren. Die teils inflammatorisch und teils anti-inflammatorisch wirksamen Mediatoren bewirken in ihrem komplexen Zusammenspiel reparative Umbauprozesse, die Ausbildung von Granulationsgewebe bis hin zur Fibrose.<sup>60</sup> Auch ausgeschüttete Mediatoren wie Interferon- $\gamma$  wirken teilweise pro-inflammatorisch.<sup>61</sup>

Es entstehen Narben und Stenosen als resultierende Komplikationen aufgrund einer überschießenden Fibrosierung. In Anbetracht der Tatsache, dass das unreife Immunsystem von Frühgeborenen in der Genese der NEC als ein grundlegender Faktor diskutiert wird, ist es sehr gut denkbar, dass das hochkomplexe Zusammenspiel der Entzündungsmediatoren im unreifen Darm nach einem Gewebeschaden nur inadäquat reagiert und so Komplikationen vor allem der Narbenstenosen begünstigt werden. In der Literatur ist darüber hinaus gut beschrieben, dass nach operativer Versorgung einer akuten NEC das verbliebene Gewebe nur ungenügend reepithelialisiert und die mucosale Barriere teils insuffizient ist.<sup>29,62</sup> Somit ließe sich ein NEC-Rezidiv oder eine Allgemeinzustandsverschlechterung erklären.

Nekrotische Veränderungen: Eaton et al.<sup>50</sup> untersuchten einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Nekrose und dem Überleben bzw. Nicht-Überleben. Der Schweregrad der Nekrose wurde dabei dreistufig in eine Nekrose der Tunica Mucosa, eine Vollwandnekrose und einen blanden Befund eingeteilt. Hier zeigte sich jedoch wie in unserer Studie kein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Nekrose und der Vitalität der Resektate und dem klinischen Outcome<sup>50</sup>. Letztlich scheint das Ausmaß der Nekrose innerhalb der resezierten Segmente irrelevant zu sein, da das Ziel der chirurgischen Intervention die Heilung der NEC durch Entfernung der nekrotischen und avitalen Abschnitte ist.

Bakterielle Infiltration: In einer anderen Studie versuchten Remon et al. beispielsweise, das Ausmaß und die Tiefe der Nekrose, der Inflammation und der bakteriellen Invasion innerhalb des resezierten Darmgewebes zu quantifizieren.<sup>49</sup> Sie konnten zeigen, dass ein statistischer Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer transmuralen Nekrose mit bakterieller Invasion in die Darmwand und dem postoperativen Verlauf der Kinder zu bestehen scheint. Laut Remon et al. ist die Invasionstiefe der Bakterien ein Prädiktor für die Mortalität der Kinder.

Da sich, wie in Abschnitt 4.3 erwähnt, in HE-Schnitten nur bedingt Bakterienkolonien nachweisen lassen, war ein weiterer von Remon et al. beschriebener Zusammenhang zwischen der Tiefe der bakteriellen Invasion und dem klinischen Outcome anhand der Daten unserer Arbeit nicht nachvollziehbar. Abgesehen von dem nur geringen und eher postnekrotischen Vorliegen von Bakterien an einer Vollwandnekrose ließ sich mit unseren Daten des Weiteren kein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer transmuralen Nekrose im Resektionsrand und einer erhöhten Letalität nachweisen. Hier war die chirurgische Entfernung kurativ. Möglicherweise entfernten die Kinderchirurg:innen bei unserer Kohorte die nekrotischen Segmente großzügiger.

Perforation: Bislang konnte in der aktuellen Literatur,<sup>49,50</sup> analog zu unseren Daten der Erst-Operationen, das Vorliegen einer Perforation nicht als Risikofaktor für einen schwereren klinischen Verlauf identifiziert werden. Dem

entgegen zeigte sich in unseren Daten der Zweit-Operationen ein statistischer Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Perforation und dem häufigeren Auftreten von Komplikationen im Sinne einer weiteren, dritten Operation (p-Wert = 0,035, s. Tab. 14 im Anhang).

Definition des postoperativen Verlaufs: In den bislang veröffentlichten Studien über den Zusammenhang von Histopathologie und Outcome wurde letzteres nur dichotom im Sinne von Überleben oder Nicht-Überleben betrachtet.<sup>49,50</sup> Im Gegensatz dazu untersuchten wir die Kinder darüber hinaus auf eine postoperative Komplikation. Durch diese detailliertere Betrachtung ließ sich die Einblutung als Risikofaktor für Re-Operationen oder einen letalen Verlauf identifizieren. Eine noch gezieltere Differenzierung und möglicherweise ordinalskalierte Einteilung der postoperativen Komplikationen könnte dezidiert histopathologische Hinweise auf konkrete klinische Verläufe liefern.

## 4.5 Limitationen

Die Kohortengröße unserer Studie war mit knapp 60 Patient:innen im Vergleich zu anderen Studien relativ gering, jedoch stellt diese Kohorte auf das deutsche Gesundheitssystem betrachtet, eine große Zahl von operierten Kindern mit NEC an unserem Zentrum dar. Eine multizentrische Studie unter Einschluss mehrerer Patient:innen in einem prospektiven Studiendesign könnte die Aussagekraft erhöhen. Zudem schieden bei uns Patient:innen, von denen keine Schnittpräparate der Operationsresektate vorlagen, aus der Studie aus.

Darüber hinaus ließe sich durch eine weitere Differenzierung der postoperativen Komplikationen möglicherweise spezifische histopathologische Befunde als Prädiktoren für beispielsweise Fibrosen oder Anastomoseninsuffizienzen ermitteln. In dieser Studie wurde vor allem das Wiederauftreten einer NEC, eine Allgemeinzustandsverschlechterung und einen Ileus als postoperative Komplikationen betrachtet. Weitere klinische Komplikationen, die nicht einer chirurgischen Operation bedurften, wurden bei dieser Arbeit nicht eingeschlossen. Wie bei Horwitz et al.<sup>38</sup> wäre eine klinische Beobachtung auf beispielsweise Nierenversagen oder DIC zur weiteren Differenzierung denkbar. Auch die Untersucher:innen-abhängige Subjektivität einer lichtmikroskopischen Befundung kann diskutiert werden. In unserer Studie ist dieser Faktor jedoch aufgrund der Befundung von drei unabhängigen Untersucher:innen zu vernachlässigen. Eine Computer-gestützte Analyse der HE-Schnitte zur genaueren Quantifizierung des histopathologischen Befundes mit Kontrolle durch einen Untersucher könnte die Aussagekraft in Zukunft eventuell erhöhen.

## 4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Entscheidung über das therapeutische Vorgehen der Kinder mit NEC, die bei uns retrospektiv eingeschlossen wurden, erfolgte gemäß der deutschen AWMF-Leitlinie.<sup>26</sup> Ist die Indikation einer chirurgischen Intervention bei NEC gestellt, ist das therapeutische Ziel die sparsame Resektion der nekrotischen Segmente, um möglichst viel Darm zu erhalten und Komplikationen wie ein Kurzdarmsyndrom zu vermeiden. Intraoperativ wird die Entscheidung über die Resektionsgrenzen anhand makroskopischer Befunde getroffen. Klar nekrotische Segmente, wie in Abbildung 2 zu sehen, werden reseziert. Bisher existiert keine Leitlinie, die einen Resektionsrand klar definiert. Der klinische Eindruck scheint im Zusammenspiel mit dem intraoperativ auf makroskopischen Gesichtspunkten gewählten Resektionsrand ausreichend zu sein, um das Outcome der Patient:innen signifikant zu verbessern. Die histologische Vitalität des Resektionsrandes ist nicht ausschlaggebend für das Überleben und den Krankheitsverlauf des Kindes. In einigen Studien wurde zwar bereits das Ausmaß des Gewebeschadens in Abhängigkeit von der ausgeübten Manipulation näher untersucht und ein Zusammenhang festgestellt.<sup>63,64</sup> Da jedoch in den Studien minimalinvasiv vorgegangen wurde und der ausgeübte Druck der Operationsinstrumente quantifiziert werden konnte, ist die Übertragung auf das laparotomische, notfallmäßige Vorgehen bei Frühgeborenen in dieser Arbeit untersucht worden. Eine intraoperative Schnellschnittuntersuchung der Resektionsränder ist somit klinisch nicht sinnvoll. Es ist nicht davon auszugehen, damit zur Verbesserung der Prognose der Kinder beizutragen.

Der von uns gefundene signifikante Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer frischen intraoperativen Einblutung im Resektionsrand und dem postoperativen Verlauf ist in dieser Form erstmals beschrieben. Da die Genese der NEC multifaktoriell ist und teils aus einer Unreife des Darms entsteht,<sup>15</sup> ist es denkbar, dass die Unreife des Frühgeborenen auf Zellebene oder Mediatorebene zu einer insuffizienten Heilung führt. Eine Ausweitung der Studie auf alle Frühgeborenen mit darmchirurgischen Eingriffen wäre interessant und könnte mehr Aufschluss über andere Darmerkrankungen bei Frühgeborenen geben.

## **5 Zusammenfassung**

### **Hintergrund**

Die NEC ist eine sehr häufige Erkrankung von Frühgeborenen und Kindern mit geringem Geburtsgewicht innerhalb der ersten zwei Lebenswochen. Mit einer Inzidenz von bis zu 11% bei Frühgeborenen<sup>7</sup> und einer Letalität von 15-30%,<sup>26</sup> stellt diese einen ernstzunehmenden Notfall auf neonatalen Intensivstationen dar. Die Pathophysiologie und Ätiologie sind bis heute nicht endgültig geklärt. Es besteht jedoch der allgemeine Konsens über eine multifaktorielle Genese. Im Vordergrund steht dabei die Unreife des Frühgeborendarms. Hinzu kommen eine abnorme bakterielle Kolonisation des Darms und Hypoxien im Splanchnikusgebiet.<sup>15-18</sup> In der aktuellen Literatur gibt es unterschiedliche Aussagen über einen möglichen Zusammenhang zwischen den histopathologischen Befunden der Resektionspräparate und dem postoperativen Verlauf.<sup>50</sup> Teilweise wird von einem Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Nekrose im Resektionsrand mit einer bakteriellen Besiedlung und dem Outcome berichtet.<sup>49</sup> Das Ziel unserer Studie war es, diesen Zusammenhang weiter zu untersuchen und einen möglichen Unterschied zwischen den Resektionsrändern und den zentralen Segmenten zu beschreiben.

### **Material und Methoden**

In dieser Studie wurden die Operationspräparate von Frühgeborenen, die zwischen 2010 und 2019 in der kinderchirurgischen Abteilung des Universitätsklinikums der Goethe-Universität in Frankfurt am Main mit dem Verdacht auf eine NEC operiert wurden, retrospektiv und doppelt verblindet histologisch untersucht und befundet. Die Befundung der zentralen Segmente und Resektionsränder der Operationspräparate erfolgte von drei Untersucher:innen unabhängig. Der postoperative Verlauf wurde retrospektiv mithilfe der klinikinternen Dokumentationssoftware ermittelt und die Patient:innen wurden in drei Gruppen eingeteilt: komplikationsfrei, Komplikationen und Exitus letalis. Anschließend erfolgte sowohl eine uni- als auch eine multivariate Zusammenhangsanalyse zwischen dem Befund und dem postoperativen Verlauf. Die Durchführung der Studie wurde von dem Ethikkomitee des Universitätsklinikums der Goethe-Universität genehmigt.

## **Ergebnisse**

Es wurden die Präparate von insgesamt 59 Kindern mit Verdacht auf NEC untersucht. Bei 49 Kindern bestätigte sich der initiale Verdacht. Bei 10 Kindern lagen andere Darmerkrankungen wie eine FIP, ein Volvulus oder ein Mekonium-ileus vor. 29 der 59 Kinder (49%) blieben postoperativ frei von Komplikationen, 25 (42%) zeigten im Verlauf Komplikationen im Sinne einer gravierenden Allgemeinzustandsverschlechterung, eines Ileus oder einer erneuten NEC und fünf Kinder (9%) verstarben.

Diese Studie zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Einblutung in das Gewebe des Resektionsrandes und dem postoperativen, klinischen Verlauf ( $p = 0,032$ ). Lag eine Einblutung in die Resektionsränder vor, kam es häufiger zu Komplikationen oder einem Exitus letalis. Dem entgegen konnte kein weiterer Zusammenhang zwischen der Vitalität der Tunica Mucosa oder der Tunica Muscularis im Resektionsrand und dem klinischen Verlauf gefunden werden. Außerdem konnte kein Zusammenhang zwischen den histopathologischen Befunden in den zentralen Anteilen des resezierten Präparates und dem klinischen Verlauf nachgewiesen werden.

## **Schlussfolgerung**

Mit dieser Studie ermittelten wir einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer frischen Hämorrhagie in den Resektionsrand und dem postoperativen klinischen Verlauf. Vergleicht man die Ergebnisse mit der aktuellen Literatur,<sup>49,50</sup> besteht Einigkeit darüber, dass die histologische Vitalität der Resektionsränder alleine für das Outcome nicht maßgeblich zu sein scheint. Den Kinderchirurg:innen kann an Hand dieser Studie bei gleichbleibender Wahl der Resektionsränder eine möglichst atraumatische Operationstechnik mit Ausräumung makroskopisch sichtbarer Hämatome empfohlen werden. Die Schnellschnittuntersuchung der Resektionsränder im Hinblick auf die Vitalität des Gewebes ist nicht nötig.

## **6 Summary**

### **Background**

NEC is a very common condition in preterm and low birth weight infants within the first two weeks of life. With an incidence of up to 11% in preterm infants and a lethality of 15-30% it represents a serious emergency in neonatal intensive care units. The aetiology has not been definitively clarified to date. However, there is a general consensus on a multifactorial genesis. In the foreground is the immaturity of the premature infant's intestine. In addition, there is an abnormal bacterial colonisation of the intestine and hypoxia in the splanchnic area. In the current literature, there are different statements about a possible connection between the histopathological findings of the resection specimens and the postoperative course. In some cases, a correlation between the extent of necrosis in the resection margin with bacterial colonisation and outcome is reported. The aim of our study was to further investigate this association and to describe a potential difference between the resection margins and the central segments.

### **Material and methods**

In this study, the surgical specimens of preterm infants who underwent surgery for suspected NEC between 2010 and 2019 in the paediatric surgery department of the University Hospital of Goethe University in Frankfurt am Main, Germany, were retrospectively and double-blinded examined and found histologically. The findings of the central segments and resection margins of the surgical specimens were made independently by three examiners. The postoperative course was determined retrospectively with the help of the hospital's internal documentation software and the patients were divided into three groups: complication-free, complications and exitus lethalis. Subsequently, a uni- and multivariate correlation analysis between the findings and the postoperative course was carried out. The study was approved by the Ethics Committee of the Goethe University Hospital.

## **Results**

The preparations of a total of 59 children with suspected NEC were examined. In 49 children, the initial suspicion was confirmed. In 10 children, other intestinal diseases such as FIP, volvulus or meconium ileus were present. 29 of the 59 children (49%) remained free of complications postoperatively, 25 (42%) showed a serious deterioration in general condition, an ileus or a recurrence of NEC during the course and five children (9%) died.

This study shows a significant association between the presence of haemorrhage into the tissue of the resection margin and the postoperative clinical course. If there was haemorrhage into the resection margins, complications or exitus lethalis occurred more frequently. In contrast, no further correlation could be found between the vitality of the tunica mucosa or the tunica muscularis in the resection margin and the clinical course. Furthermore, no correlation between the histopathological findings in the central parts of the resected specimen and the clinical course could be demonstrated.

## **Conclusion**

In this study, we found a statistically significant correlation between the presence of fresh hemorrhage in the resection margins and the postoperative clinical outcome. Comparing the results with the current literature<sup>49,50</sup> there is agreement that the histologic vitality of the resection margins alone does not appear to be decisive for the outcome.

From our point of view, we can recommend pediatric surgeons to use an atraumatic surgical technique with evacuation of large macroscopically visible hematomas while maintaining the same choice of resection margins. The frozen section examination of the resection margins with regard to the vitality of the tissue does not appear to be helpful and is not necessary.

## 7 Anhang

Tabelle 12 Kreuztabelle: Univariate Zusammenhangsanalyse der histopathologischen Befunde aller Fälle und dem postoperativen Verlauf

<b>Histopathologischer Befund der Resektionsränder</b>						
	Komplikationsfrei	Komplikationen	Tode	Gesamt	%	<i>p</i>
Vitale Mucosa	20	15	3	38	64	0,781
Avitale Mucosa	9	10	2	21	36	
Vitale Muscularis	25	21	3	49	83	0,321
Avitale Muscularis	4	4	2	10	17	
Keine Vollwandnekrose	26	18	5	49	83	0,162
Vollwandnekrose	3	7	0	10	17	
Ohne Einblutung	20	10	1	31	53	0,032
Mit Einblutung	9	15	4	28	47	
Keine Peritonitis	20	20	2	42	79	0,193
Peritonitis	9	5	3	17	21	
<b>Histopathologischer Befund der zentralen Anteile</b>						
	Komplikationsfrei	Komplikationen	Tode	Gesamt	%	<i>p</i>
Vitale Mucosa	19	13	3	35	59	0,580
Avitale Mucosa	10	12	2	24	41	
Vitale Muscularis	13	6	2	21	36	0,301
Avitale Muscularis	16	19	3	38	64	
Keine Vollwandnekrose	16	13	4	33	56	0,586
Vollwandnekrose	13	12	1	26	44	
Keine Perforation	12	16	2	30	51	0,187
Perforation	17	9	3	29	49	
Keine Peritonitis	15	15	3	33	56	0,855
Peritonitis	14	10	2	26	44	
Keine Stenose	25	19	3	37	63	0,251
Stenose	4	6	2	12	37	
<b>Gesamt</b>	29	25	5	59		

Tabelle 13 Kreuztabelle: Univariate Zusammenhangsanalyse der histopathologischen Befunde aller NEC-Fälle und dem postoperativen Verlauf

<b>Histopathologischer Befund der Resektionsränder</b>						
	Komplikationsfrei	Komplikationen	Tode	Gesamt	%	<i>p</i>
Vitale Mucosa	15	12	3	30	61	1,00
Avitale Mucosa	9	8	2	19	39	
Vitale Muscularis	21	16	3	40	82	0,304
Avitale Muscularis	3	4	2	9	18	
Keine Vollwandnekrose	21	14	5	40	82	0,217
Vollwandnekrose	3	6	0	9	18	
Ohne Einblutung	20	6	1	27	55	<0,001
Mit Einblutung	4	14	4	22	45	
Keine Peritonitis	17	15	2	34	69	0,406
Peritonitis	7	5	3	15	31	
<b>Histopathologischer Befund der zentralen Anteile</b>						
Vitale Mucosa	15	10	3	28	57	0,772
Avitale Mucosa	9	10	2	21	43	
Vitale Muscularis	10	4	2	16	33	0,283
Avitale Muscularis	14	16	3	33	67	
Keine Vollwandnekrose	13	11	4	28	57	0,654
Vollwandnekrose	11	9	1	21	43	
Keine Perforation	11	13	2	26	53	0,388
Perforation	13	7	3	23	47	
Keine Peritonitis	13	11	3	27	55	1,000
Peritonitis	11	9	2	22	45	
Keine Stenose	21	14	3	38	78	0,214
Stenose	3	6	2	11	22	
<b>Gesamt</b>	24	20	5	49		

Tabelle 14 Kreuztabelle: Zusammenhangsanalyse zwischen dem histopathologischen Befund der Re-Operationen und dem postoperativen Verlauf

<b>Histopathologischer Befund der Resektionsränder</b>						
	Komplikationsfrei	Komplikationen	Tode	Gesamt	%	<i>p</i>
Vitale Mucosa	4	5	1	10	59	0,471
Avitale Mucosa	5	2	0	7	41	
Vitale Muscularis	6	7	1	14	82	0,351
Avitale Muscularis	3	0	0	3	18	
Keine Vollwandnekrose	6	5	1	12	71	1,000
Vollwandnekrose	3	2	0	5	29	
Ohne Einblutung	5	2	1	8	47	0,335
Mit Einblutung	4	5	0	9	53	
Keine Peritonitis	8	6	1	15	88	1,000
Peritonitis	1	1	0	2	12	
<b>Histopathologischer Befund der zentralen Anteile</b>						
	Komplikationsfrei	Komplikationen	Tode	Gesamt	%	<i>P</i>
Vitale Mucosa	4	3	1	8	47	1,000
Avitale Mucosa	5	4	0	9	53	
Vitale Muscularis	3	0	1	4	24	0,065
Avitale Muscularis	6	7	0	13	76	
Keine Vollwandnekrose	4	4	1	9	53	1,000
Vollwandnekrose	5	3	0	8	47	
Keine Perforation	8	2	1	11	65	0,035
Perforation	1	5	0	6	35	
Keine Peritonitis	5	5	1	11	65	0,762
Peritonitis	4	2	0	6	35	
Keine Stenose	6	4	1	11	65	1,000
Stenose	3	3	0	6	35	
<b>Gesamt</b>	9	7	1	17		

**Protokoll - CD15.**

Version: 3/1/2019 3:45 PM

Wachsentfernung					
IHC-Zwei-Phasen-Wachsentfernung					
Lösungsmittel	Transportflüssigkeit	Temperatur	Inkubation oben	Inkubation unten	Zyklen
Cleanly Clearing Agent	DI Water	25 °C	10 s	1 min	1
IHC-Waschen Zwei-Phasen-Wachsentfernung					
Reagenz	Inkubation	Zyklen			
DI Water	5 s	1			
Demaskierung					
Demaskierungs-IHC					
Reagenz	Temperatur	Inkubation	Kühlflüssigkeit		
EnV FLEX TRS, High pH	97 °C	20 min	DI Water		
Färbung					
EnVision FLEX					
Waschen	Reagenz	Inkubation	Zyklen		
	Wash Buffer	2:40 min	2		
Primärer Antikörper	Reagenz	Inkubation			
	CD15	15 min			
Waschen	Reagenz	Inkubation	Zyklen		
	Wash Buffer	2 min	10		
Endogen-Enzymblock	Reagenz	Inkubation			
	EnV FLEX Peroxidase-Blocking Reagent	3 min			
Waschen	Reagenz	Inkubation	Zyklen		
	Wash Buffer	2 min	10		
Markiertes Polymer	Reagenz	Inkubation			
	EnV FLEX/HRP	20 min			
Waschen	Reagenz	Inkubation	Zyklen		
	Wash Buffer	2 min	10		

Gedruckt 1/10/2024 11:55 AM von NS

Seite 1 von 2

Waschen	Reagenz	Inkubation	Zyklen		
	Wash Buffer	2 min	10		
Waschen	Reagenz	Inkubation	Zyklen		
	DI Water	31 s	1		
Waschen	Reagenz	Inkubation	Zyklen		
	Wash Buffer	2 min	10		
Substrat-Chromogen	Reagenz	Inkubation			
	EnV FLEX Substrate Working Solution	5 min			
Waschen	Reagenz	Inkubation	Zyklen		
	Wash Buffer	2 min	10		
Waschen	Reagenz	Inkubation	Zyklen		
	DI Water	31 s	1		
Waschen	Reagenz	Inkubation	Zyklen		
	Wash Buffer	2 min	10		
Gegenfärbung					
Gegenfärbemittel					
Reagenz	Inkubation				
Hematoxylin	5 min				
Waschen					
Reagenz	Inkubation	Zyklen			
DI Water	2 min	10			
Waschen					
Reagenz	Inkubation	Zyklen			
Wash Buffer	2 min	10			

Gedruckt 1/10/2024 11:55 AM von NS

Seite 2 von 2

Abbildung 18 Färbeprotokoll Immunhistochemie CD15-Antikörper

**Protokoll - CD68 KP1.**

Version: 6/23/2021 8:55 PM

Wachsentfernung					
<b>IHC-Zwei-Phasen-Wachsentfernung</b>					
Lösungsmittel	Transportflüssigkeit	Temperatur	Inkubation oben	Inkubation unten	Zyklen
Clearly Clearing Agent	DI Water	25 °C	10 s	1 min	1
<b>IHC-Waschen Zwei-Phasen-Wachsentfernung</b>					
Reagenz	Inkubation	Zyklen			
DI Water	5 s	1			
Demaskierung					
<b>Demaskierungs-IHC</b>					
Reagenz	Temperatur	Inkubation	Kühlflüssigkeit		
EnV FLEX TRS, High pH	97 °C	20 min	DI Water		
Färbung					
<b>EnVision FLEX</b>					
Waschen	Reagenz	Inkubation	Zyklen		
	Wash Buffer	2:40 min	2		
Primärer Antikörper	Reagenz	Inkubation			
	CD68 KP1	20 min			
Waschen	Reagenz	Inkubation	Zyklen		
	Wash Buffer	2 min	10		
Endogen-Enzymblock	Reagenz	Inkubation			
	EnV FLEX Peroxidase-Blocking Reagent	3 min			
Waschen	Reagenz	Inkubation	Zyklen		
	Wash Buffer	2 min	10		
Markiertes Polymer	Reagenz	Inkubation			
	EnV FLEX/HRP	20 min			
Waschen	Reagenz	Inkubation	Zyklen		
	Wash Buffer	2 min	10		

Gedruckt 1/10/2024 11:56 AM von NS

Seite 1 von 2

Waschen	Reagenz	Inkubation	Zyklen			
	Wash Buffer	2 min	10			
Waschen	Reagenz	Inkubation	Zyklen			
	DI Water	31 s	1			
Waschen	Reagenz	Inkubation	Zyklen			
	Wash Buffer	2 min	10			
Substrat-Chromogen	Reagenz	Inkubation				
	EnV FLEX Substrate Working Solution	5 min				
Waschen	Reagenz	Inkubation	Zyklen			
	Wash Buffer	2 min	10			
Waschen	Reagenz	Inkubation	Zyklen			
	DI Water	31 s	1			
Waschen	Reagenz	Inkubation	Zyklen			
	Wash Buffer	2 min	10			
Gegenfärbung						
<b>Gegenfärbemittel</b>						
Reagenz	Inkubation					
Hematoxylin	5 min					
Waschen	Inkubation	Zyklen				
	DI Water	2 min	10			
Waschen	Inkubation	Zyklen				
	Wash Buffer	2 min	10			

Gedruckt 1/10/2024 11:56 AM von NS

Seite 2 von 2

Abbildung 19 Färbeprotokoll Immunhistochemie CD68-Antikörper

## 8 Literaturverzeichnis

1. Kosloske A. Epidemiology of necrotizing enterocolitis. *Acta Pædiatrica*. Published online 1994. doi:10.1111/j.1651-2227.1994.tb13232.x
2. Berner R, Roos R. *Duale Reihe Pädiatrie*. 5. Auflage. (Gortner L, ed.); 2018: 164-165. doi:10.1055/b-005-145246
3. Knell J, Han SM, Jaksic T, Modi BP. Current Status of Necrotizing Enterocolitis. *Curr Probl Surg*. Published online 2019. doi:10.1067/j.cpsurg.2018.11.005
4. Crissinger K. Regulation of hemodynamics and oxygenation in developing intestine: insight into the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Acta Pædiatrica*. Published online 1994. doi:10.1111/j.1651-2227.1994.tb13233.x
5. Neu J. Neonatal necrotizing enterocolitis. In: *Probiotic Bacteria and Their Effect on Human Health and Well-Being*. ; 2013. doi:10.1159/000345739
6. Stoll BJ. Epidemiology of necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol*. Published online 1994. doi:10.1016/s0095-5108(18)30341-5
7. Guillet R, Stoll BJ, Cotten CM, et al. Association of H2-blocker therapy and higher incidence of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics*. Published online 2006. doi:10.1542/peds.2005-1543
8. Gordon P V., Swanson JR, MacQueen BC, Christensen RD. A critical question for NEC researchers: Can we create a consensus definition of NEC that facilitates research progress? *Semin Perinatol*. Published online 2017. doi:10.1053/j.semperi.2016.09.013
9. Leistner R, Piening B, Gastmeier P, Geffers C, Schwab F. Nosocomial infections in very low birthweight infants in Germany: Current data from the national surveillance system NEO-KISS. *Klin Padiatr*. Published online 2013. doi:10.1055/s-0033-1334886
10. Hodzic Z, Bolock AM, Good M. The role of mucosal immunity in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Front Pediatr*. Published online 2017. doi:10.3389/fped.2017.00040
11. Ostlie DJ, Spilde TL, St Peter SD, et al. Necrotizing enterocolitis in full-

- term infants. *J Pediatr Surg*. Published online 2003. doi:10.1016/S0022-3468(03)00187-8
12. Fisher JG, Jones BA, Gutierrez IM, et al. Mortality associated with laparotomy-confirmed neonatal spontaneous intestinal perforation: A prospective 5-year multicenter analysis. *J Pediatr Surg*. Published online 2014. doi:10.1016/j.jpedsurg.2013.11.051
  13. Collins A, Weitkamp JH, Wynn JL. Why are preterm newborns at increased risk of infection? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. Published online 2018. doi:10.1136/archdischild-2017-313595
  14. Niño DF, Sodhi CP, Hackam DJ. Necrotizing enterocolitis: New insights into pathogenesis and mechanisms. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. Published online 2016. doi:10.1038/nrgastro.2016.119
  15. Neu J, Walker WA. Dextran sodium sulfate (DSS) induces necrotizing enterocolitis-like lesions in neonatal mice. *N Engl J Med*. Published online 2011.
  16. Nowicki PT, Nankervis CA. The role of the circulation in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol*. Published online 1994. doi:10.1016/s0095-5108(18)30342-7
  17. Ginzel M, Yu Y, Klemann C, et al. The viral dsRNA analogue poly (I:C) induces necrotizing enterocolitis in neonatal mice. *Pediatr Res*. Published online 2016. doi:10.1038/pr.2015.261
  18. Musemeche CA, Kosloske AM, Bartow SA, Umland ET. Comparative effects of ischemia, bacteria, and substrate on the pathogenesis of intestinal necrosis. *J Pediatr Surg*. Published online 1986. doi:10.1016/S0022-3468(86)80228-7
  19. Snyder CL, Hall M, Sharma V, St. Peter SD. Seasonal variation in the incidence of necrotizing enterocolitis. *Pediatr Surg Int*. Published online 2010. doi:10.1007/s00383-010-2675-5
  20. Bell MJ, Ternberg JL, Feigin RD, et al. Neonatal necrotizing enterocolitis. Therapeutic decisions based upon clinical staging. *Ann Surg*. Published online 1978. doi:10.1097/00000658-197801000-00001
  21. Isani MA, Delaplain PT, Grishin A, Ford HR. Evolving understanding of neonatal necrotizing enterocolitis. *Curr Opin Pediatr*. Published online 2018. doi:10.1097/MOP.0000000000000629

22. Niemarkt HJ, De Meij TG, Van De Velde ME, et al. Necrotizing enterocolitis: A clinical review on diagnostic biomarkers and the role of the intestinal microbiota. *Inflamm Bowel Dis*. Published online 2015. doi:10.1097/MIB.000000000000184
23. Lu P, Sodhi CP, Hackam DJ. Toll-like receptor regulation of intestinal development and inflammation in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Pathophysiology*. Published online 2014. doi:10.1016/j.pathophys.2013.11.007
24. Leaphart CL, Cavallo J, Gribar SC, et al. A Critical Role for TLR4 in the Pathogenesis of Necrotizing Enterocolitis by Modulating Intestinal Injury and Repair. *J Immunol*. Published online 2007. doi:10.4049/jimmunol.179.7.4808
25. Lin PW, Stoll BJ. Necrotising enterocolitis. *Lancet*. Published online 2006. doi:10.1016/S0140-6736(06)69525-1
26. Genzel-Boroviczeny O, Jenke A, Mihatsch W, Schmittenebecher P. S2k-Leitlinie: Nekrotisierende Enterokolitis. *AWMF Online*. Published online 2017. [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/024-009l\\_S2k\\_Nekrotisierende\\_Enterokolitis\\_2018-02-abgelaufen.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/024-009l_S2k_Nekrotisierende_Enterokolitis_2018-02-abgelaufen.pdf), Accessed March 22, 2024.
27. Walsh MC, Kliegman RM. Necrotizing enterocolitis: Treatment based on staging criteria. *Pediatr Clin North Am*. Published online 1986. doi:10.1016/S0031-3955(16)34975-6
28. Ballance WA, Dahms BB, Shenker N, Kliegman RM. Pathology of neonatal necrotizing enterocolitis: A ten-year experience. *J Pediatr*. Published online 1990. doi:10.1016/S0022-3476(05)81124-2
29. Schaart MW, De Bruijn ACJM, Bouwman DM, et al. Epithelial functions of the residual bowel after surgery for necrotising enterocolitis in human infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. Published online 2009. doi:10.1097/MPG.0b013e318186d341
30. Hsueh W, Caplan MS, Qu XW, Tan X Di, De Plaen IG, Gonzalez-Crussi F. Neonatal necrotizing enterocolitis: Clinical considerations and pathogenetic concepts. *Pediatr Dev Pathol*. Published online 2003. doi:10.1007/s10024-002-0602-z
31. Stocker JT, Dehner LP, Husain AN. Neonatal Necrotizing Enterocolitis. In:

- Pediatric Pathology*. ; :626-627.
32. Chan KYY, Leung KT, Tam YH, et al. Genome-wide expression profiles of necrotizing enterocolitis versus spontaneous intestinal perforation in human intestinal tissues: Dysregulation of functional pathways. *Ann Surg*. Published online 2014. doi:10.1097/SLA.0000000000000374
  33. Blencowe H, Cousens S, Chou D, et al. Born Too Soon: The global epidemiology of 15 million preterm births. *Reprod Health*. Published online 2013. doi:10.1186/1742-4755-10-S1-S2
  34. Jeschke E, Biermann A, Günster C, et al. Mortality and major morbidity of very-low-birth-weight infants in Germany 2008-2012: A report based on administrative data. *Front Pediatr*. Published online 2016. doi:10.3389/fped.2016.00023
  35. Gephart SM, Spitzer AR, Effken JA, Dodd E, Halpern M, McGrath JM. Discrimination of GutCheck NEC: A clinical risk index for necrotizing enterocolitis. *J Perinatol*. Published online 2014. doi:10.1038/jp.2014.37
  36. Hull MA, Fisher JG, Gutierrez IM, et al. Mortality and management of surgical necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates: A prospective cohort study. *J Am Coll Surg*. Published online 2014. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2013.11.015
  37. Fitzgibbons SC, Ching Y, Yu D, et al. Mortality of necrotizing enterocolitis expressed by birth weight categories. *J Pediatr Surg*. Published online 2009. doi:10.1016/j.jpedsurg.2009.02.013
  38. Horwitz JR, Lally KP, Cheu HW, David Vazquez W, Grosfeld JL, Ziegler MM. Complications after surgical intervention for necrotizing enterocolitis: A multicenter review. *J Pediatr Surg*. Published online 1995. doi:10.1016/0022-3468(95)90328-3
  39. Sheng Q, Lv Z, Xu W, et al. Short-term surgical outcomes of preterm infants with necrotizing enterocolitis: A single-center experience. *Med (United States)*. Published online 2016. doi:10.1097/MD.00000000000004379
  40. Schwartz MZ, Hayden CK, Richardson CJ, Tyson KRT, Lobe TE. A prospective evaluation of intestinal stenosis following necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*. Published online 1982. doi:10.1016/S0022-3468(82)80443-0

41. Phad N, Trivedi A, Todd D, Lakkundi A. Intestinal Strictures Post-Necrotising Enterocolitis: Clinical Profile and Risk Factors. *J Neonatal Surg*. Published online 2014. doi:10.47338/jns.v3.134
42. Heida FH, Loos MHJ, Stolwijk L, et al. Risk factors associated with postnecrotizing enterocolitis strictures in infants. *J Pediatr Surg*. Published online 2016. doi:10.1016/j.jpedsurg.2015.09.015
43. Gorbatyuk OM, Babuci SI, Martinyuk T V., Bertsun KT. Obturation Intestinal Obstruction in the Course of Necrotizing Enterocolitis in Newborn Children. *Wiad Lek*. Published online 2021. doi:10.36740/wlek202104105
44. Stringer MD, Brereton RJ, Drake DP, Kiely EM, Capps SNJ, Spitz L. Recurrent necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*. Published online 1993. doi:10.1016/0022-3468(93)90496-8
45. Thyoka M, Eaton S, Hall NJ, et al. Advanced necrotizing enterocolitis part 2: Recurrence of necrotizing enterocolitis. *Eur J Pediatr Surg*. Published online 2012. doi:10.1055/s-0032-1306264
46. Sonntag J, Grimmer I, Scholz T, Metze B, Wit J, Obladen M. Growth and neurodevelopmental outcome of very low birthweight infants with necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr Int J Paediatr*. Published online 2000. doi:10.1111/j.1651-2227.2000.tb00332.x
47. Vohr BR, Wright LL, Dusick AM, et al. Neurodevelopmental and functional outcomes of extremely low birth weight infants in the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, 1993-1994. *Pediatrics*. Published online 2000. doi:10.1542/peds.105.6.1216
48. Zhang HY, Wang F, Feng JX. Intestinal microcirculatory dysfunction and neonatal necrotizing enterocolitis. *Chin Med J (Engl)*. Published online 2013. doi:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.20121741
49. Remon JI, Amin SC, Mehendale SR, et al. Depth of bacterial invasion in resected intestinal tissue predicts mortality in surgical necrotizing enterocolitis. *J Perinatol*. Published online 2015. doi:10.1038/jp.2015.51
50. Eaton S, Sebire N, Thyoka M, Pierro A. Histologic and immunohistochemical features associated with outcome in neonatal necrotizing enterocolitis. *Eur J Pediatr Surg*. Published online 2014.

- doi:10.1055/s-0033-1349716
51. Joshi V V., Winston YE, Kay S. Neonatal Necrotizing Enterocolitis: Histologic Evidence of Healing. *Am J Dis Child*. Published online 1973. doi:10.1001/archpedi.1973.02110190101022
  52. DeSa DJ. The spectrum of ischemic bowel disease in the newborn. *Perspect Pediatr Pathol*. Published online 1976.
  53. Ginzl M, Feng X, Kuebler JF, et al. Dextran sodium sulfate (DSS) induces necrotizing enterocolitis-like lesions in neonatal mice. *PLoS One*. Published online 2017. doi:10.1371/journal.pone.0182732
  54. Ring HC, Theut Riis P, Bay L, Kallenbach K, Bjarnsholt T, Jemec GBE. Haematoxylin and eosin staining identifies medium to large bacterial aggregates with a reliable specificity: A comparative analysis of follicular bacterial aggregates in axillary biopsies using peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridization and h. *Exp Dermatol*. Published online 2017. doi:10.1111/exd.13338
  55. Santulli T V., Schullinger JN, Heird WC, et al. Acute necrotizing enterocolitis in infancy: a review of 64 cases. *Pediatrics*. Published online 1975. doi:10.1542/peds.55.3.376
  56. Wilkinson HN, Hardman MJ. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes: Cellular Mechanisms of Wound Repair. *Open Biol*. Published online 2020. doi:10.1098/rsob.200223
  57. Vanvooren DM, Bradshaw WT, Blake SM. Disseminated intravascular coagulation in the neonate. *Neonatal Netw*. Published online 2018. doi:10.1891/0730-0832.37.4.205
  58. Kostadinova-Petrova I, Mitevka E, Janeska B. Histological characteristics of bruises with different age. *Open Access Maced J Med Sci*. Published online 2017. doi:10.3889/oamjms.2017.207
  59. Oshima K, Hinoki A, Uchida H, et al. Single-cell RNA sequencing of intestinal immune cells in neonatal necrotizing enterocolitis. *Pediatr Surg Int*. Published online 2023. doi:10.1007/s00383-023-05461-7
  60. Eming SA, Wynn TA, Martin P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science (80- )*. Published online 2017. doi:10.1126/science.aam7928
  61. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- $\gamma$ : an overview of

- signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. Published online 2004.  
doi:10.1189/jlb.0603252
62. Vieten D, Corfield A, Ramani P, Spicer R. Proliferative response in necrotising enterocolitis is insufficient to prevent disease progression. In: *Pediatric Surgery International*. ; 2006. doi:10.1007/s00383-005-1588-1
63. De S, Rosen J, Dagan A, Hannaford B, Swanson P, Sinanan M. Assessment of tissue damage due to mechanical stresses. In: *International Journal of Robotics Research*. ; 2007.  
doi:10.1177/0278364907082847
64. Chandler JH, Mushtaq F, Moxley-Wyles B, West NP, Taylor GW, Culmer PR. Real-Time Assessment of Mechanical Tissue Trauma in Surgery. *IEEE Trans Biomed Eng*. Published online 2017.  
doi:10.1109/TBME.2017.2664668

## 9 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Prognose des postoperativen klinischen Verlaufs von Neugeborenen nach chirurgischem Eingriff bei Nekrotisierender Enterokolitis – Ist die histologische Untersuchung des Operationspräparates hilfreich?**

Im Dr.-Senckenbergischen-Institut für Pathologie der Johann Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. med. Peter Wild mit Unterstützung durch Dr. med. Elise Gradhand und PD Dr. med. Jens Köllermann ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

---

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift)