

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Egbert Herting

**Genetische und umweltbezogene Einflussfaktoren auf das
Outcome sehr kleiner Frühgeborener - eine Zwillingsstudie**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Lena Schulz
aus Wedel/ Holstein

Lübeck 2012

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Wolfgang Göpel
2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. Daniel Beyer

Tag der mündlichen Prüfung: 04.06.2013

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 04.06.2013

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zwillinge und Frühgeburtlichkeit.....	1
1.1.1	Dizygote Zwillinge.....	2
1.1.2	Monozygote Zwillinge	2
1.1.3	Bestimmung der Zygocie von Zwillingen.....	4
1.2	Surfactant.....	6
1.2.1	Bestandteile und Funktion des Surfactants.....	6
1.2.2	Bedeutung von Surfactant für die Therapie Frühgeborener	7
1.2.3	Applikationsform von Surfactant	8
1.3	Risiken für männliche Frühgeborene	11
1.4	Fragestellung der Arbeit.....	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Allgemeine Vorgehensweisen.....	13
2.2	Studienpopulation.....	15
2.3	Definition der Endpunkte.....	15
2.4	Bestimmung der Zygocie.....	16
2.5	Statistik.....	19
3	Ergebnisse	20
3.1	Studienpopulation.....	20
3.2	Klinische Daten in Abhängigkeit von Mehrlingsstatus und Zygocie.....	20
3.3	Zygociebestimmung: klinisch vs. genetisch	25
3.4	Genetik und exogene Faktoren als prädiktiver Faktor	26
3.5	Neue Therapieform „Surfactantgabe ohne Intubation“	30

4	Diskussion	34
4.1	Outcome klinischer Parameter Einlinge vs. Zwillinge	35
4.2	Outcome klinischer Parameter zygotiebestimmter gleichgeschl. Zwillingen	37
4.3	Zygotiebestimmung gleichgeschl. Zwillinge: klinische vs. genetische Methode.....	39
4.4	Genetik und exogene Faktoren als prädiktiver Faktor	41
4.5	Neue Therapieform: Surfactantgabe ohne Intubation.....	44
4.6	Schlussfolgerung und Ausblick	47
5	Zusammenfassung	48
6	Literaturverzeichnis	49
7	Anhang	59
7.1	Anhang 1: Fragebögen	59
7.2	Anhang 2: Einverständniserklärung	62
7.3	Anhang 3: Ausdruck der DNA- Typisierung anhand von STR-Loci	63
8	Danksagung	64
9	Lebenslauf	65

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Plazentationsverhältnisse bei Zwillingsgraviditäten in Abhängigkeit von der Zygote und Zeitpunkt der Zygotenspaltung (nach: Bajoria und Kingdom (1997)).....	3
Abbildung 2:	Schema der DNA- Typisierung durch den ABI Prism 310 (Applied Biosystem): PCR amplifizierte STR Analyse (nach Lee et al., 2010).....	17
Abbildung 3:	Übersicht über die Art der Surfactantgabe im Gesamtkollektiv	26
Abbildung 4:	Häufigkeit der Surfactantgabe von einem oder beiden Kindern bei Zwillingspaaren mit genetisch determinierter Zygote in Abhängigkeit von der Zygote.....	27
Abbildung 5:	Häufigkeit der Behandlungsmethode Surfactantgabe ohne Intubation bei Zwillingen mit genetisch determinierter Zygote	30
Abbildung 6:	Häufigkeit der Behandlungsmethode Surfactantgabe ohne Intubation bei einem oder beiden Kindern von Zwillingspärchen mit genetisch determinierter Zygote in Abhängigkeit von der Zygote	31
Abbildung 7:	Surfactantgabe ohne Intubation in Bezug auf den Endpunkt Beatmung in Abhängigkeit vom Geschlecht.....	33

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Protokoll PCR - Reagenzien	18
Tabelle 2:	Protokoll PCR Zyklen	18
Tabelle 3:	Klinische Daten des Gesamtkollektives nach Mehrlingen und Geschlecht getrennt	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Tabelle 4:	prä- und perinatale klinische Daten von Zwillingen genetisch determinierter Zygotie	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Tabelle 5:	postnatale klinische Daten von Zwillingen genetisch determinierter Zygotie	24
Tabelle 6:	Genauigkeit der klinischen Einschätzung der Zygotie gleichgeschlecht- licher Zwillinge im Vergleich zur genetischen Analyse	25
Tabelle 7:	Wahrscheinlichkeiten für das Ereignis Surfactanttherapie im Gesamtkollektiv und in Subgruppen der zygotiebestimmten Zwillinge	27
Tabelle 8:	Surfactantgabe in Abhängigkeit von Zygotie und Geburtsgewicht < oder > 1500 g.....	28
Tabelle 9:	Surfactantgabe in Abhängigkeit von Zygotie und Geschlecht	29
Tabelle 10:	Surfactantgabe ohne Intubation in Bezug auf den Endpunkt Beatmung in Abhängigkeit vom Geburtsgewicht (kleiner bzw. größer als 1000g)	32
Tabelle 11:	Vergleich klinischer Outcomedaten verschiedener Studien zur Behandlung von RDS (nach Göpel et al., 2011).....	45

Abkürzungsverzeichnis

AMV	Avoid mechanical ventilation
BMP	Bone morphogenetic proteins, gehören zur TGF-beta Familie, spielen u.a. Rolle in der Embryonalentwicklung
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPAP	Continous Positive Airway Pressure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELBW	Extreme Low Birthweight (<1000g)
EPH Gestose	Erkrankung in der Schwangerschaft mit Ödemen (E dema), P roteinurie, und H ypertension
FFTS	Fetofetales Transfusionssyndrom
FGF	Fibroblast growth factors
FIP	Fokale intestinale Perforation
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
HELLP	Erkrankung in der Schwangerschaft mit Hämolyse (H aemolysis), erhöhten Leberwerten (E levated L iver enzyme levels, Thrombozytopenie (L ow P latelet counts)
Ile131Thr	Isoleucin/Threonin Polymorphismus in Exon 4 des SP-B kodierenden Gens
INSURE	Intubation-Surfactant-Extubation (Methode zur Surfactantapplikation)
IVH	Intraventrikuläre Hämorrhagie
kDa	Kilodalton
LBW	Low Birth Weight Infant (<2500g)
N	(lat.: numerus) Anzahl
NEC	Necrotisierende Enterocolitis
OP	Operation
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PVL	Periventrikuläre Leukomalazie
PEEP	Positive Endexpiratory Pressure
POP-4	4%-Dimethylpolyacrylamid (Gelpolymer)

RDS	Respiratory Distress Syndrom
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
ROP	Retinopathy of prematurity
Shh	Sonic Hedgehog Signalweg, spielt u.a. Rolle in der Embryonalentwicklung
SP-A, -B, -C, -D	Surfactantproteine A bis D
SSW	Schwangerschaftswoche
STR	Short Tandem Repeat
TGF beta	Rezeptor Serin/ Threoninkinase, spielt u.a. Rolle in der Embryonalentwicklung
VLBW	Very Low Birthweight (<1500g)
WHO	World Health Organisation
Wnt	Wingless / Int-1, Signalprotein, spielt u.a. Rolle in der Embryonalentwicklung

1 Einleitung

1.1 Zwillinge und Frühgeburtlichkeit

Laut gängiger Literatur kommt heute ca. jedes zehnte Kind in Deutschland als Frühgeborenes, das heißt nach WHO-Definition vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche (SSW), auf die Welt. Dabei unterscheidet man nach dem Geburtsgewicht des Kindes zwischen LBW- (< 2500g), VLBW- (< 1500g) und ELBW- (< 1000g) Frühgeborenen (Speer, 2004).

Trotz großer Bemühungen, die Frühgeburtlichkeitsrate zu senken, kam es in den meisten Ländern in den letzten 10-15 Jahren zu einem Anstieg der Frühgeburten, wie z.B. in den USA zwischen 1980 und 2006 um 36% (Martin et al., 2009). Zum einen liegt dies am erhöhten Durchschnittsalter der Gebärenden in den Industriestaaten, zum anderen sind die Fortschritte der Reproduktionsmedizin seit Ende der achtziger Jahre für die steigende Anzahl an Zwillings- und Mehrlingsgeburten mitverantwortlich (ESHRE Capri Workshop Group, 2000; Bornstein et al., 2009; Blickstein et al., 2011). Von 1915 bis 1970 lag die Inzidenz von Mehrlingsgeburten in den USA recht stabil bei 2%. Zwischen 1980 und 2009 stieg sie um 76 %. Während 1980 auf 53 Neugeborenen ein Zwilling kommt, ist 2009 schon jedes dreißigste Neugeborene ein Zwilling (Martin et al., 2012). Die Anzahl an höhergradigen Mehrlingsgeburten stieg zwischen 1980 und 1998 sogar um mehr als 400% (Martin et al., 2009)

Bereits im Jahr 1895 wurde von dem polnischen Pathologen Hellin eine Regel aufgestellt, mit deren Hilfe sich die Häufigkeit von Mehrlingsschwangerschaften in einer Population berechnen lässt. Sie sagt, wenn die Häufigkeit von Zwillingen in einer Population $1/N$ entspricht, dann beträgt die Wahrscheinlichkeit für Drillinge $1/N^2$ und für Vierlinge $1/N^3$. Durch die Eingriffe der Reproduktionsmedizin in die natürliche Evolution der Fortpflanzung in Form von Fertilitätsbehandlungen ist diese Regel auf die meisten Bevölkerungen der Industriestaaten heute nicht mehr anwendbar (Fellman et al., 2009). Die Anzahl der Zwillings- und höhergradigen Mehrlingsgeburten nimmt einen immer größer werdenden Prozentsatz der Gesamtzahl der Frühgeburten ein (Blondel et al., 2002). Die Frühgeburtenhäufigkeit wird für Zwillingsschwangerschaften mit 30% angegeben, was dem drei- bis fünffachen von Einlingsschwangerschaften entspricht (Dudenhausen und Maier, 2010). Ein durchschnittlich geringeres Geburtsgewicht und Reifungsstörungen bei Zwillingen führen zu einer perinatal erhöhten Mortalität von 10-20% gegenüber 2% bei

Einlingsschwangerschaften (Sadler, 2003). Das Grundproblem sehr kleiner Frühgeborener, die Unreife von Organsystemen und -funktionen, die zu einer Vielzahl an akuten und chronischen Erkrankungen führen kann, fällt bei Zwillingen durch die hohe Wahrscheinlichkeit einer zu frühen Geburt besonders ins Gewicht.

1.1.1 Dizygote Zwillinge

Dizygote Zwillinge entstehen bei der gleichzeitigen Befruchtung zweier Eizellen durch jeweils eine Spermatozyte. Beide Zygoten nisten sich anschließend separat im Uterus ein und entwickeln ihre eigene Plazenta, Chorionhülle und Amnionhülle. Dabei kann es dazu kommen, dass die Plazenten so dicht nebeneinander liegen, dass sie miteinander verschmelzen, siehe Abbildung 1 (Sadler, 2003). Dizygote Zwillinge entstehen durch Polyovulation. Dieses Phänomen ist häufiger zu beobachten bei größeren, älteren, schwereren Frauen und Frauen mit vorausgegangenen Geburten (Blickstein et al., 2011). Daneben ist eine deutliche Variation in der Häufigkeit von dizygoten Zwillingen in unterschiedlichen ethnischen Gruppen zu beobachten: Diamond fand ein deutlich niedrigeres Vorkommen bei Asiaten (3,9/ 1000 Geburten), im Gegensatz zu Kaukasiern (7,9/ 1000 Geburten). Die höchste Rate ergab sich bei Afrikanern (49/ 1000 Geburten), (Diamond, 1986). Die erhöhte Anzahl an dizygoten Zwillingen durch Infertilitätsbehandlungen, besonders die hormonelle Ovulationsinduktion, weist auf einen genetischen Zusammenhang zwischen Hormonspiegel (FSH) und der Entstehung zweieiiger Zwillinge hin (Marshall, 1970; Hall, 2003).

1.1.2 Monozygote Zwillinge

Die große Mehrheit von monozygoten Befruchtungen führt zum Heranwachsen eines einzigen Embryos. In nur 0,4% aller natürlichen Konzeptionen kommt es zur Entstehung von eineiigen Zwillingen durch die frühe Spaltung des Embryos. Monozygote Zwillinge besitzen somit den gleichen Chromosomensatz und demnach vollständig identische genetische Informationen (Blickstein et al., 2011). Eine Spaltung des frühen Embryos ist nur während der ersten zwei postkonzeptionellen Wochen möglich. Nach diesem Zeitpunkt ist dies nicht mehr denkbar, da sich die untrennbare Embryonalachse entwickelt hat (Benirschke, 1998). Der Zeitpunkt der Spaltung ist bei monozygoten Zwillingen entscheidend für die Anlage der Chorion- und Amnionverhältnisse des Fruchtsacks (Bajoria und Kingdom, 1997):

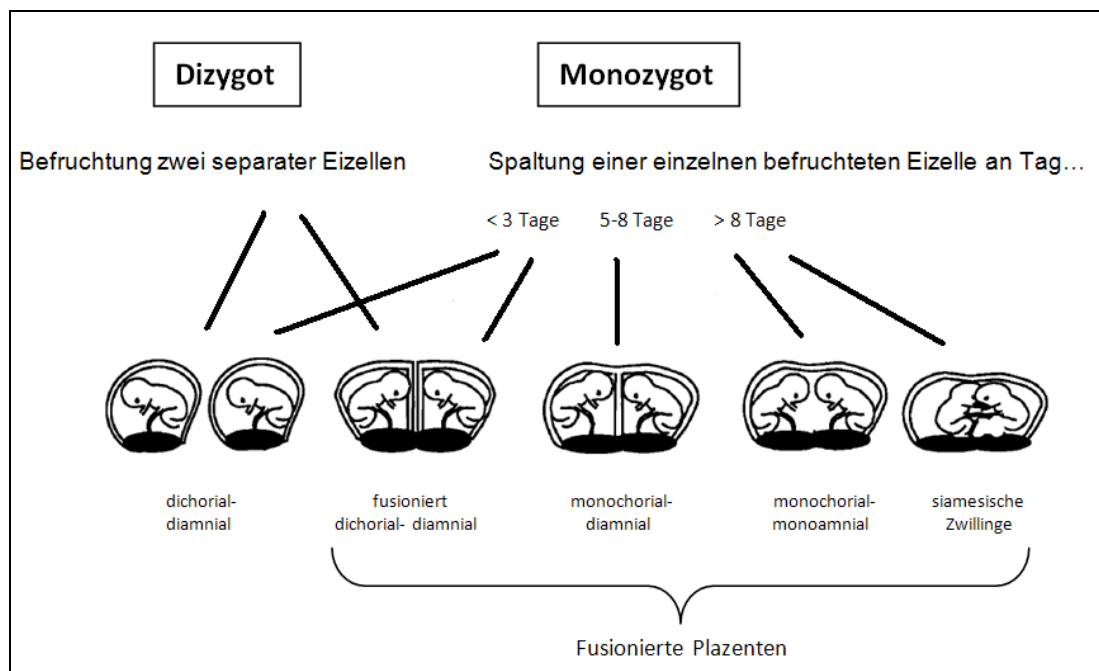


Abbildung 1: Plazentationsverhältnisse bei Zwillingsgraviditäten in Abhängigkeit von der Zygotie und Zeitpunkt der Zygotenspaltung (nach: Bajoria und Kingdom (1997))

- In einem Viertel der Fälle kommt es zu einer frühen Spaltung 2-3 Tage nach der Befruchtung im Morulastadium. Dies führt zu dichorialen-diamnialen Plazentationsverhältnissen (separat oder fusioniert), wie sie auch bei dizygoten Zwillingen vorkommen (siehe Abb. 1), (Bajoria und Kingdom, 1997; Hall, 2003).
- In drei Viertel der Fälle kommt es zu einer Spaltung der Zygote zwischen dem 5.-8. Tag postkonzeptionell. Zu diesem Zeitpunkt liegt eine entwickelte Blastozystenhöhle vor, die nicht mehr teilungsfähig ist. Es kommt zur Ausbildung einer gemeinsamen Chorionhöhle und zwei separaten Amnionhöhlen (monochorial-diamnial), (Bajoria und Kingdom, 1997).
- In seltenen Fällen (1-3%) geschieht eine Spaltung des Embryos nach dem 8. postkonzeptionellen Tag. Da die Amnionhöhle in dieser Entwicklungsphase schon ausgebildet ist, kommt es zu einer monochorialen-monoamnialen Zwillingsplazenta (Benirschke, 1998; Hall, 2003).

- In Ausnahmefällen (ca. 1:45000 Geburten) fällt der Zeitpunkt der Zygotenspaltung zwischen den 12.-14. Tag nach der Befruchtung. Dies führt zu einer inkompletten Spaltung des Embryos, sogenannten „Siamesischen Zwillingen“ (Benirschke, 1998).

Diese verschiedenen Plazentationsverhältnisse können für die klinische Untersuchung (z.B. pränatal mittels Ultraschall oder postnatal durch die makroskopische Untersuchung der Plazenta) wegweisend für die Bestimmung der Zygote des Zwillingspaars sein.

1.1.3 Bestimmung der Zygote von Zwillingen

Einer der ersten Wissenschaftler, der die Relevanz von Zwillingsgeschwistern für die Forschung erkannte, war Francis Galton (1822-1911), ein Cousin Charles Darwins. Er vertrat früh die Annahme, dass Zwillinge eine besondere Möglichkeit darstellen, Erkenntnisse über die unterschiedlichen Einflüsse von Vererbung und Umwelt auf den Menschen zu erlangen (Benirschke et al., 2006). Der grundlegende Unterschied zwischen monozygoten und dizygoten Zwillingen war mit dem damaligen Verständnis von Vererbung allerdings noch nicht möglich.

Bei der pränatalen Bestimmung der Zygote hat heute die Ultraschalldiagnostik die größte Bedeutung. Die Unterscheidung der Plazentationsverhältnisse anhand der interfetalen Membrandicke (Hertzberg et al., 1987), des Geschlechts und des von Finberg 1992 publizierten „twin peak sign“ als Zeichen für Dichorialität (Finberg, 1992) geben Hinweise auf die Zygote der Zwillinge.

Studien über die Genauigkeit der Determination der Plazentationsverhältnisse bei Zwillingen berichten von einer Spezifität der Methode von 91% für Monozygote und 96% für Dizygote (Stenhouse et al., 2002). Eine Untersuchung der Häufigkeit der Plazentationsverhältnisse und die Korrelation zur genetisch bestimmten Zygote ergab, dass in 45% der Fälle (n=668 Zwillingspaare) die Kinder gleichgeschlechtlich und ihre Plazenten dichorial waren (Cameron, 1968). Über diese Gruppe lässt sich keine eindeutige Aussage über die Zygote treffen, sie können sowohl monozygot, als auch dizygot sein (siehe Abbildung 1). Diese Erkenntnis verdeutlicht, dass genauere Methoden zur Zygotebestimmung notwendig sind.

Die ersten Zwillingsforschungen, die sich mit der Zygotiebestimmung beschäftigten, konzentrierten sich auf die Gemeinsamkeiten und Ähnlichkeiten der Zwillingsgeschwister, wie z.B. Dermatoglyphen (Newman, 1931; Reed, 1975), Zahnmorphologie (Lundström, 1963), Blutgruppenantigene (Cameron, 1968; Selvin, 1970) und Plazenta- und Erythrozytenenzyme (Cameron, 1968).

Diese Verfahren sind nur eingeschränkt gültig und garantieren keine eindeutige Bestimmung der Zygotie. Besonders bei der Analyse von Blutgruppenantigenen muss beachtet werden, dass es bei dizygoten Zwillingen durch das Verschmelzen der Plazenten zur Ausbildung von Anastomosen zwischen den Choriongefäßen kommen kann. Über diese Gefäßverbindungen ist ein Austausch von Erythrozyten zwischen den Zwillingen möglich. Es kommt zum Erythrozytenmosaizismus: einer oder beide Zwillinge besitzen zwei verschiedene Arten von Erythrozyten unterschiedlicher genetischer Information (Sadler, 2003; Hall, 2003) Dies führt zu Missinterpretationen von Analysen auf Grundlage der Blutgruppenantigene.

Präziser wurde die Genotypisierung durch den direkten Vergleich von DNA Varianten: Dazu gehört die Analyse von chromosomalen C- und Q- Banden (McCracken et al., 1978), Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) (Derom et al., 1985), Microsatelliten (Hill und Jeffrey, 1985) und „short tandem repeats“ (STR) (Yang et al., 2006). Letztere Methode ist heute das gängigste Verfahren forensischer Typisierung und findet kommerzielle Verwendung bei der Durchführung von Abstammungsnachweisen, wie z.B. dem Vaterschaftstest. In dieser Arbeit wurde sie zur genetischen Determinierung von gleichgeschlechtlichen Zwillingspaaren unbekannter Zygotie verwendet (siehe 2.4 Bestimmung der Zygotie von Zwillingen, Methodenteil).

1.2 Surfactant

Die Entdeckung des pulmonalen Surfactants gelang 1929 Kurt von Neergaard. Ziel seiner Versuche war die Messung der Oberflächenspannung in der Lunge und das Erkennen ihrer Bedeutung für die Gesamtreaktion. Durch seine Ergebnisse kam er zu folgendem Schluss: Es bestehe die Möglichkeit, dass die Oberflächenspannung der Alveolen durch Anreicherung oberflächenaktiver Substanzen gegenüber anderen physiologischen Lösungen verringert sei. Diese Erkenntnis müsse in ihrer Bedeutung für das Neugeborene weiter erörtert werden, wobei der Oberflächenspannung in den Alveolen eine besondere Bedeutung zukäme (Von Neergaard, 1929).

R. Pattle (1955) und J.A. Clements (1957) waren es schließlich, die die physikalischen Eigenschaften des Surfactants aufklärten und damit ein neues wissenschaftliches Feld begründeten (Pattle, 1955; Halliday, 2008).

1.2.1 Bestandteile und Funktion des Surfactants

Die Hauptfunktion des Surfactants beim Menschen besteht in der Regulation der alveolären Oberflächenspannung im Verhältnis zur Alveolengröße. Da benachbarte Alveolen unterschiedlicher Größe durch Alveolargänge miteinander verbunden sind, muss die tatsächliche Oberflächenspannung in den kleinen Alveolen viel kleiner sein, als man aufgrund der geometrischen Bedingungen erwarten würde, damit das Kollabieren kleiner Alveolen zugunsten größerer verhindert werden kann (Fehrenbach, 2001). Durch die Existenz von Surfactant in der Lunge kann dieses Phänomen bewerkstelligt werden und ist wichtige Voraussetzung für eine effiziente Ventilation.

Surfactant ist eine Mischung aus verschiedenen Lipiden und Proteinen. 90% des Gewichtes besteht aus Lipiden, wovon 80% Phospholipide (Dipalmitoyl Phosphatidylcholine und Phosphatidylglycerol) und 10% neutrale Lipide ausmachen. Die restlichen 10% des Gewichtes bestehen aus variablen Anteilen von Serumproteinen und den vier speziellen Apoproteinen SP-A, -B, -C, und SP-D (Fehrenbach, 2001; Walther et al., 2007).

Die Apoproteine lassen sich in zwei funktionelle Gruppen teilen:

Die kleinen, hydrophoben Proteine SP-B (8.7 kDa) und SP-C (4.2 kDa) optimieren durch ihren lipophilen Charakter die Interaktion zwischen den Surfactantlipiden und

der Luft-Flüssigkeits-Schranke und damit die Ausbreitung und Adsorption des Surfactants in den Alveolen (Walther et al., 2007). SP-B spielt dabei eine größere Rolle als SP-C. Die biophysikalischen Eigenschaften des Surfactants sind im großen Ausmaß abhängig von der Existenz von SP-B. Während ein kongenitales Defizit von SP-B mit dem Leben nicht vereinbar ist (Nogee et al., 1994), verursachen Mutationen im SP-C codierenden Gen dagegen eine erhöhte Neigung zu interstitiellen Lungeninfektionen (Bridges et al., 2006). Beide Proteine sind heute wichtige Bestandteile von therapeutisch eingesetzten Surfactant Produkten (Whitsett, 2005).

Die beiden großen, hydrophilen Proteine SP-A (26-36 kDa) und SP-D gehören der Kollektinfamilie an. Sie haben wichtige immunmodulatorische Funktionen. Zum einen agieren sie als Teil der angeborenen Immunabwehr, da sie in der Lage sind, eine große Anzahl von Viren, Bakterien und Pilze zu binden und deren Phagozytose einzuleiten. Zum anderen spielen sie durch die Interaktion von T-Lymphozyten und dendritischen Zellen auch eine Rolle in der sekundären Immunantwort (Clark und Reid, 2003). SP-A hat zusätzlich eine Funktion in der Bildung von tubulärem Myelin, einer extrazellulären Form von Surfactant, und hält das homeostatische Gleichgewicht zwischen intra- und extrazellulärem Surfactant aufrecht (Hohlfeld et al., 2002).

Alle Bestandteile des Surfactants, Lipide und Proteine, werden von den Pneumozyten Typ II synthetisiert. Sämtliche Proteinbestandteile, außer SP-C, können auch durch Clara Zellen synthetisiert werden. Die Synthese von SP-C ist eine spezifische Eigenschaft der Pneumozyten Typ II (Fehrenbach, 2001).

1.2.2 Bedeutung von Surfactant für die Therapie Frühgeborener

Neben der Gefahr einer Vielzahl chronischer und akuter Erkrankungen, denen ein Frühgeborenes aufgrund seiner Unreife ausgesetzt ist (bronchopulmonale Dysplasie, Hirnblutung, periventrikuläre Leukomalazie, Retinopathia praematorum, nekrotisierende Enterokolitis, persistierender Ductus arteriosus), spielt das Atemnotsyndrom (RDS: Respiratory Distress Syndrom) als häufigste Todesursache in der Neonatalperiode, eine besonders bedrohliche Rolle. Erst ab der 35. Gestationswoche besteht beim Fötus normalerweise eine ausreichende körpereigene Surfactantsynthese (Speer, 2004).

Dass ein Mangel an Surfactant die Ursache des Atemnotsyndroms Frühgeborener ist, wurde 1959 von Every und Mead erstmals erkannt. Erste Studien zum therapeutischen Einsatz von Surfactant bei der Behandlung von RDS folgten bald nachdem Patrick Bouvier Kennedy (Sohn von Präsident Kennedy) 1963 kurz nach der Geburt an den Folgen dieser Krankheit verstarb und dieses Ereignis die öffentliche Aufmerksamkeit auf sich zog. Die 1980er Jahre brachten eine Vielzahl randomisierter kontrollierter Studien hervor, die die Wirksamkeit verschiedener synthetischer und natürlicher Surfactantpräparate untersuchten und belegten (Halliday, 2008).

In allen bisher publizierten Studien konnte unmittelbar nach der Surfactantapplikation bei Frühgeborenen eine Verbesserung der Oxygenierung und des Gasaustausches nachgewiesen werden. Zudem wurde eine Senkung der Mortalität und der Pneumothoraxinzidenz beobachtet (Parmigiani und Solari, 2003).

1.2.3 Applikationsform von Surfactant

Eine besondere Gefahr im Zusammenhang mit dem RDS ist die Entstehung eines chronischen Folgeschadens der Lunge, der bronchopulmonalen Dysplasie (BPD). Sie kann sich auf Grundlage des broncheoalveolären Traumas bei maschineller Beatmung entwickeln und u.a. zu starker Beeinträchtigung der Lungenfunktion, rezidivierenden bronchopulmonalen Infekten und psychomotorischen Entwicklungsstörungen führen (Speer, 2004).

Die in der Surfactanttherapie des RDS übliche Anwendung einer Intubation mit nachfolgender Surfactantgabe und Beatmung stellt nicht nur den größten Risikofaktor zur Entstehung einer BPD dar (Christou und Brodsky, 2005), sondern birgt auch die Gefahr eines erhöhten Infektionsrisikos und einer möglichen Verletzung der Atemwege. Besonders bei der Behandlung von sehr kleinen Frühgeborenen (unter 1500g) ist die maschinelle Beatmung Hauptrisikofaktor für die Entstehung chronischer Lungenerkrankungen (Van Marter et al., 2000). Die von Gregory 1971 eingeführte CPAP-Therapie ist eine Alternative zur maschinellen Beatmung. Bei dieser Methode wird statt eines endotrachealen Tubus eine Nasenbrille oder Maske verwendet, die einen kontinuierlichen positiven Atemwegsdruck erzeugt, gegen den der Patient ausatmet. Dies führt zum Offenhalten der Atemwege des Frühgeborenen und erreicht eine größere funktionelle Residualkapazität, eine Rekrutierung bereits kollabierter Alveolen und eine vergrößerte Gasaustauschfläche in der Lunge (Verder et al., 2009).

Studien, die den Einsatz von CPAP und die Intubation bei Frühgeborenen vergleichen, zeigen ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der Morbidität und Mortalität (Kribs, 2011). Allerdings hängt die Erfolgsrate der CPAP Methode stark vom Gestationsalter des Frühgeborenen ab. Gerade die sehr kleinen Frühgeborenen (25.-28. SSW) mit dem höchsten Risiko für ein schlechtes Outcome profitieren am wenigsten von der Methode (Morley et al., 2008; Aly et al., 2005).

Auf der einen Seite kann durch die Anwendung der CPAP-Methode zwar die für die Lunge schädliche Intubation umgangen und das Risiko einer BPD vermindert werden, auf der anderen Seite muss gleichzeitig auf die frühe Gabe von Surfactant verzichtet werden, was vor allem für die VLBW Kinder von Nachteil ist (Finer, 2006).

Mit dem Ziel, die Intubation und maschinelle Beatmung bei der Applikation von Surfactant zu umgehen, wurde nach alternativen Methoden gesucht.

Weder die Gabe von Surfactant in vernebelter Form (Berggren et al., 2000), die nasopharyngeale Applikation von Surfactant unmittelbar nach der Geburt (Kattwinkel et al., 2004) noch der Einsatz von Larynxmasken (Brimacombe et al., 2004; Trevisanuto et al., 2005) fanden in der Praxis routinemäßige Anwendung. Meist fanden die Studien nur an einer kleinen Gruppe von Kindern statt und hatten keine Vergleichsgruppe.

Die INSURE-Methode (Intubation-Surfactantgabe-Extubation) konnte sich dagegen in Skandinavien durchsetzen und erfolgreich die maschinelle Beatmungshäufigkeit vermindern. Das Konzept beruht auf einer kurzen Intubation, verbunden mit der Surfactantgabe, gefolgt von einer Extubation mit anschließender CPAP-Atemhilfe. Die maschinelle Beatmungshäufigkeit konnte um fast 50% gesenkt werden. Verstärkt wurde der Effekt durch die frühe Gabe von Surfactant, wie in einer Studie mit Frühgeborenen unter der 30. SSW gezeigt werden konnte (Verder et al., 1999, Verder et al. 2009).

Ein neues Verfahren zur Surfactantapplikation unter minimal invasiven Voraussetzungen wurde vor kurzem von Neonatologen am Kölner Universitätsklinikum entwickelt. Das Vorgehen beruht auf der Gabe von Surfactant an das spontan atmende Frühgeborene mittels einer dünnlumigen Magensonde, welche unter direkter Laryngoskopie mit Hilfe einer Magill-Zange anstatt eines Tubus in der Trachea platziert wird. Dabei wird das Kind mit CPAP unterstützt und atmet den Surfactant aktiv ein (Kribs et al., 2007). Neben dem Vorteil, dass die Irritation der Atemwege durch minimal invasives Vorgehen sehr gering und kurz ist und durch die CPAP Beatmung der PEEP kontinuierlich aufrecht gehalten wird, was die selbstständige

Lungenentfaltung fördert, könnte der Verzicht auf Narkosemittel, wie sie bei der Intubation nach herkömmlicher Methode benötigt wurden, zusätzlich positive Auswirkungen haben. Die Methode vereint die Effizienz der frühen, prophylaktischen Surfactantgabe, die als einzige kausale Therapie des RDS bekannt ist (Finer, 2006) mit der minimalinvasiven Atemunterstützung mittels CPAP.

Erste Ergebnisse zum Outcome von 29 Kindern, die mit der neuen Therapiemethode behandelt wurden im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, erschienen 2007. Es wurde gezeigt, dass die Mortalität, die Rate an IVH>II° und die Rate an interstitiellen Emphysemen durch die Surfactantgabe ohne Intubation signifikant gesenkt werden konnte (Kribs et al., 2007).

Eine weitere Studie analysierte retrospektiv den Einsatz der Surfactantgabe ohne Intubation über einen Zeitraum von vier Jahren. Insgesamt wurden 247 Kinder in die Studie eingeschlossen. Es wurde deutlich, dass es zu einem Anstieg des Einsatzes der neuen Methode von 75% auf 86% kam. Außerdem stieg die Überlebensrate bei der Versuchsgruppe von 76% auf 90%, die Überlebensraten ohne BPD von 65% auf 80%. Die Gruppe der Kinder die initial mit CPAP behandelt wurde, meist in Kombination mit der Surfactantgabe ohne Intubation, zeigte eine signifikant reduzierte Mortalitätsrate (7.7% vs. 42%), weniger BPDs (7.1% vs. 33.3%), IVHs>II° (5.2% vs. 33.3%), Pneumothoraces (2.6% vs. 6.7%) und weniger pulmonale interstitielle Emphyseme (3.9% vs. 20%) (Kribs et al., 2008; Kribs, 2011).

Die erste Multicenterstudie zu der neuen Therapieform erschien 2010. Dabei wurden insgesamt 1541 sehr kleine Frühgeborene mit einem Gestationsalter unter 31 SSW und einem Geburtsgewicht unter 1500 g eingeschlossen. 319 dieser Kinder wurden mit der neuen Therapieform behandelt. Obwohl die Kinder der Behandlungsgruppe signifikant kleiner (945 vs. 1018 g) und unreifer (27.3 vs. 27.9 Gestationswochen) waren als die Kinder der Standardtherapiegruppe, konnte auch hier ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der mechanischen Beatmung (29% vs. 53%) und der bronchopulmonalen Dysplasie (10.9% vs. 17,5%) nachgewiesen werden. Auch das Ereignis „Tod oder BPD“ war in der Behandlungsgruppe signifikant seltener als in der Standardtherapiegruppe (Kribs et al., 2010; Kribs, 2011).

Die kürzlich erschienen Ergebnisse der randomisierten, kontrollierten AMV Studie zeigen ebenfalls die Vorteile der Surfactantgabe ohne Intubation im Vergleich zu herkömmlichen Therapiemethoden. Bei der Analyse von 220 Kindern, von denen 108 der Interventionsgruppe und 112 der Kontrollgruppe angehörten, zeigten sich eine deutlich reduzierte Beatmungshäufigkeit an Tag 2 oder 3 nach Geburt (28% vs. 46%),

weniger Beatmungsfälle während des stationären Aufenthaltes (33% vs. 73%), signifikant weniger durchschnittliche Tage an denen beatmet wurde und ein niedrigerer Bedarf an Sauerstoff (30% vs. 45%) (Göpel et al., 2011).

1.3 Risiken für männliche Frühgeborene

Vorausgegangene Studien haben mehrfach belegt, dass der männliche Fötus mehr Risiken in Bezug auf den Verlauf der Schwangerschaft und das perinatale Outcome ausgesetzt ist als der weibliche. Schon die Rate an spontanen Aborten ist 30% höher als bei weiblichen Feten (Ingmarsson, 2003). Daneben stellt das männliche Geschlecht einen eigenständigen Risikofaktor für Frühgeburtlichkeit (McGregor et al. 1992; Ingmarsson, 2003), erhöhter Mortalität und neurologischer Entwicklungsverzögerung dar (Tyson et al., 2008). Das Risiko für Letzteres ist sogar vergleichbar mit einem einwöchigen Rückstand im Gestationsalter. Besonders in Bezug auf pulmonale Komplikationen haben die männlichen Frühgeborenen Nachteile: Elsmén und Kollegen zeigten, dass sie deutlich häufiger mechanische Beatmung benötigen, häufiger chronische Lungenerkrankungen wie BPD entwickeln und mehr Surfactant benötigen als die weiblichen Frühgeborene (Elsmén et al., 2004; Farstad et al., 2011). Die Erkenntnis aus Tierversuchen, dass Androgene einen hemmenden Einfluss auf die Entwicklung der Lunge haben (Hanley et al., 1996), leitet zu der Hypothese, dass diesen geschlechterspezifischen Unterschieden ein hormonell vermittelter intra-uteriner Nachteil des männlichen Feten zu Grunde liegt. Auch die Surfactantsynthese ist durch Sexualhormone reguliert. Während Androgene zu einer Hemmung der Surfactant-Protein Genexpression in den Typ II Alveolarzellen führen, werden sie durch Östrogene stimuliert (Carey et al., 2007).

Das erhöhte Risiko einer Frühgeburt, verbunden mit einer verzögerten Surfactantsynthese bei den männlichen Feten, ist eine besonders ungünstige Kombination für das perinatale und langfristige Outcome dieser Kinder und benötigt eine angemessene Therapie, speziell abgestimmt auf die Bedürfnisse der männlichen Frühgeborenen.

1.4 Fragestellung der Arbeit

- Wie präzise ist die klinische Einschätzung der Zygote gleichgeschlechtlicher Frühgeborener?
- Haben genetische Faktoren einen Einfluss auf die Surfactanttherapie von sehr kleinen Frühgeborenen?
- Welchen Einfluss hat das Geschlecht von Frühgeborenen auf die Surfactanttherapie?
- Welchen Einfluss hat die neue Therapieform „Surfactantgabe ohne Intubation“?

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine Vorgehensweisen

Im Rahmen der multizentrischen prospektiven Kohortenstudie „Krankheitsbezogene Analyse von Kandidaten-Polymorphismen für schwere Erkrankungen des Frühgeborenen“ und der Nachläuferstudie „German Neonatal Network- Deutsches Frühgeborenen Netzwerk“ wurden von September 2003 bis Ende Dezember 2009 Daten von 3708 Kindern (davon 31,6% Mehrlinge, n=1173) aus 28 deutschen neonatologischen Zentren in Lübeck gesammelt, zu denen Informationen über Mehrlingsstatus, Tod, Gestationsalter und Geburtsgewicht vorlagen. Voraussetzung der neonatologischen Stationen zur Teilnahme an der Studie war ihre Größe und eine geforderte Fallzahl von mindestens 40 Frühgeborenen unter 1500g pro Jahr.

Anhand drei standardisierter Fragebögen (siehe Anhang 1) wurden klinische Basisdaten über die Umstände der Geburt, antenatale Behandlung, Therapie, Medikation und Krankheitsverlauf des Kindes erhoben sowie je 2 Mundschleimhautabstriche von Mutter und Kind und, wenn möglich, ein kurzes Stück Nabelschnur des Kindes gesichert. Die Zustimmung der Eltern zur Speicherung der Daten ihrer Kinder sowie zur Entnahme des Mundschleimhautabstrichs und des Nabelschnurrestes erfolgte nach einer ausführlichen mündlichen und schriftlichen Aufklärung durch lokale Ärzte. Die Aufklärung wurde auf einem unterschriebenen Einverständnisbogen festgehalten und vor Ort abgeheftet (siehe Anhang 2). Nach dem Einschluss des Kindes in die Studie wurde der erste Datenbogen (1/3) gemeinsam mit den Mundschleimhautabstrichen nach Lübeck geschickt. Dort erfolgte die DNA- Isolierung, welche anschließend bis zur weiteren Verwendung eingefroren wurde.

Der zweite und dritte Dokumentationsbogen wurde erst nach der Entlassung des Kindes nach Lübeck geschickt. Im Labor erfolgte für jeden Patienten die Zuordnung einer DNA- Nummer. Unter dieser Nummer wurden die Datenbögen anschließend in eine Access-Datenbank übertragen. Dies hatte den Zweck, die Daten anonym, ohne Namen oder Geburtsdatum der Kinder, zu archivieren. Die Eingabe erfolgte doppelt kontrolliert, mit computergestütztem Abgleich der Datenbank auf Eingabefehler.

In halbjährlichen Abständen wurden die erhobenen Daten durch die Studienzentrale geprüft (Monitoring). Ein Arzt der Studienzentrale in Lübeck kontrollierte anhand der Patientenakte die Vollständigkeit der klinischen Daten und die Einschussrate der

Patienten. Dabei wurde auch das Vorliegen der unterschriebenen Einverständniserklärung geprüft, deren Nichtvorhandensein zum Ausschluss des Kindes aus der Studie führte. Außerdem wurde vom Monitor das Stationsbuch auf weitere Patienten überprüft, die die Einschlusskriterien erfüllten. Wenn Kinder trotz Erfüllung der Einschlusskriterien nicht eingeschlossen wurden, kam es zu einer nachträglichen, anonymen Registrierung des Geburtsgewichtes, einigen Outcomeparametern und dem Grund des fehlenden Einschlusses. Nach Kontrolle der Daten durch den Monitor wurden alle vollständigen Datensätze und die dazugehörigen DNA Proben pseudonymisiert.

Ein weiteres Ziel der Studie ist es, die eingeschlossenen Kinder über einen Zeitraum von sechs Jahren hinsichtlich ihrer körperlichen und neurologischen Entwicklung zu beobachten. Dafür werden zu zwei weiteren Zeitpunkten, bei einer ambulanten Wiedervorstellung im Alter von 2 und 6 Jahren, Daten zu den Patienten erhoben. Außerdem sendet die Studienzentrale in größeren Abständen nach der Entlassung Fragebögen an die Eltern der Kinder. Dabei werden die Fragebögen der „Studie zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland“ (www.KiGGS.de) verwendet, die schon von 17.000 Eltern beantwortet wurden, deren Kinder keine sehr kleinen Frühgeborenen sind. Die Fragebögen enthalten unter anderem Fragen zum Gesundheitsverhalten, sozialen Status, zur Bildung, Familiensituation und Ernährung. Dieses Vorgehen erlaubt einen Vergleich der Frühgeborenen mit reif geborenen Kindern.

Die Studie wurde von allen Ethikkommissionen der teilnehmenden Kliniken befürwortet (Aktenzeichen 08-022 der Ethikkommission Lübeck).

2.2 Studienpopulation

Einschlusskriterien waren ein Gestationsalter $\leq 36+6$ Schwangerschaftswochen sowie ein Geburtsgewicht unter 1500 Gramm.

Als Ausschlusskriterium galt die Verlegung des Kindes aus einer anderen Kinderklinik.

2.3 Definition der Endpunkte

Die Definition der Endpunkte ist durch die Studienleitung wie folgt festgelegt:

- Intraventrikuläre Hämorrhagie (IVH) wurde in vier Grade eingeteilt:
 - Grad 1: Subependymale Blutung
 - Grad 2: Ventrikel Einbruchsblutung, $<50\%$ des Ventrikelvolumens
 - Grad 3: Ventrikel Einbruchsblutung, $>50\%$ des Ventrikelvolumens
 - Grad 4: Periventrikuläre Hämorrhagie (PVH), unabhängig vom Ausmaß der begleitenden intraventrikulären Hämorrhagie
- Bronchopulmonale Dysplasie (BPD): Bestimmung der BPD gemäß Neonatalerhebung in Anlehnung an den Test nach Walsh im korrigierten Gestationsalter von 35+0 bis 36+6 SSW.
- Beatmung: jede Art von Beatmung während des stationären Aufenthaltes.
- Sepsis: alle Definitionen werden in Anlehnung an das NEO Kiss Surveillance-Protokoll verwendet. Unterschieden werden dabei: klinische Sepsis ohne Erregernachweis, mikrobiologisch gesicherte Sepsis (aber keine Koagulase negativen Staphylokokken) und mikrobiologisch bestätigte Sepsis mit Koagulase negativen Staphylokokken als alleiniger Erreger.
- Fetofetales Transfusionssyndrom (FFTS): klinische postnatale Einschätzung aufgrund aller verfügbaren Befunde.
- Antenatale Lungenreife: antenatale i.m. Gabe von 2 x 12mg Betamethason im Abstand von 24 h (alternativ 4 x 6mg Dexamethason) an die Mutter.
- Tokolyse/ antenatale Antibiose: nur Therapien, die in den letzten 24 h vor der Geburt eingesetzt wurden.
- Blasensprung: Blasensprung vor Beginn regelmäßiger zur Geburt führender Wehen, die mindestens alle 10 Min. auftraten, zervixwirksam und schmerzhaft waren.

2.4 Bestimmung der Zygote

Nach Eingang der Mundschleimhautabstriche des Kindes bzw. der Mutter im Labor wurde mit dem QIAamp® DNA Mini Kit der Firma QIAGEN die DNA isoliert und bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Die DNA-Isolierung mit Hilfe dieses Kits beruht auf dem Prinzip der Adsorptions-Chromatographie.

Zur Bestimmung der Zygote durchliefen die Proben das Testverfahren einer molekulargenetischen Analyse im Institut für Rechtsmedizin der Universität Kiel. Dabei handelt es sich um eine DNA-Typisierung mit einem Multiplex-PCR Kit zum Nachweis polymorpher Merkmale, welches ursprünglich zur Erstellung eines DNA-Abstammungs- oder eines Spurengutachtens genutzt wird („Vaterschaftstest“). Um die Zygote unserer Zwillingspärchen zu bestimmen, wurden die Proben einzeln in das Testverfahren geschickt und die Ergebnisse der zusammengehörigen Geschwister anschließend miteinander verglichen, was uns letztlich eindeutigen Aufschluss über die Zygote der Zwillinge gab.

Das Verfahren beruht auf der Untersuchung von bestimmten Orten im Genom, den sogenannten short tandem repeats (STRs). Das sind Bereiche der DNA, die sich durch spezifische Abfolgen von 2 bis 4 Basenpaaren auszeichnen, welche in 10 bis 40 Wiederholungen vorkommen können. Diese Wiederholungszahl ist individuell unterschiedlich und wird als Merkmal für jeden Genort kodominant vererbt (jeweils einmal von der Mutter und einmal vom Vater.) Bei Mischerbigkeit sind zwei unterschiedliche Fragmente (Allele) nachweisbar. Bei Reinerbigkeit dagegen liegen zwei identische Fragmente vor. Die STRs sind ausschließlich in den nicht kodierenden Bereichen der DNA lokalisiert, so dass über diese Methode weder auf Erkrankungen noch auf sonstige genetisch determinierte Eigenschaften des Kindes geschlossen werden kann. Bei dem von uns verwendeten „Identifiler“ Kit wurden die Allelgrößen (Anzahl der Basenpaar-Wiederholungen) in den STR Systemen D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, VWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA bestimmt.

Durch den Einsatz spezifischer fluoreszenzmarkierter Primer konnten diese relativ kurzen DNA-Fragmente durch das Polymerase-Ketten-Verfahren (PCR) (siehe Tabelle 1 und 2) vervielfältigt und in einer automatischen Fragmentanalyse mittels Kapillarelektrophorese und Laserdetektion (automatische Fluoreszenzdetektion) in einem Abi Prism 310 Genetic Analyzer bestimmt werden. Das Verfahren ist in der folgenden Abbildung (Abbildung 2) schematisch dargestellt.

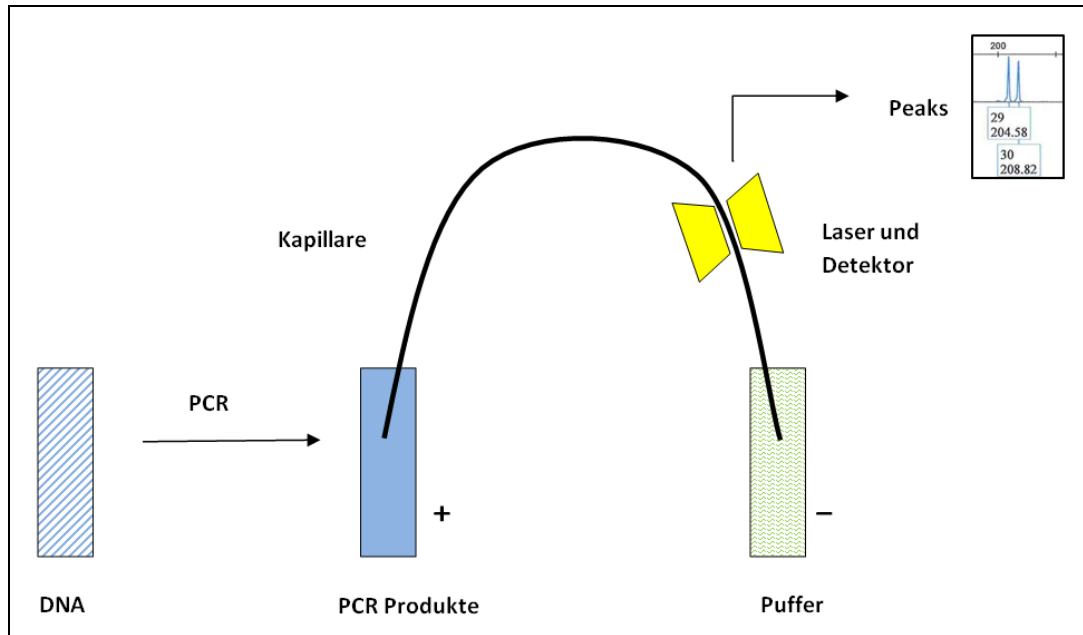


Abbildung 2: Schema der DNA- Typisierung durch den ABI Prism 310 (Applied Biosystem): PCR amplifizierte STR Analyse (nach Lee et al., 2010)

Bei dieser Analyse bewegten sich die DNA-Fragmente in Abhängigkeit von ihrer Größe unterschiedlich schnell durch das Trennmedium (hier POP-4, Applied Biosystems). Die Fragmente sind negativ geladen, was dazu führte, dass sie durch die Kapillare zur Anode wanderten. Am Ende dieser Kapillaren passierten die Amplifikate eine Fensterung, die vor einem Laser platziert war. Ein Laserstrahl regte bei Passage der Fragmente am Fenster die Fluoreszenzmarkierung an den Primersequenzen der spezifischen Fragmente zur Emission von elektromagnetischer Strahlung in definierten Wellenlängen an. Diese konnten von einem Detektor registriert werden. Anhand der Wanderungszeit, die die Fragmente in der Kapillare benötigten, wurden im Vergleich zu Fragmenten definierter Länge (Größenstandard) die Fragmentlängen der neu amplifizierten Amplicons bestimmt. Diese wurden, je nach Basenpaaren-Anzahl, mit dem Auswertungsprogramm GeneMapper als graphisch unterschiedlich hohe Peaks dargestellt (Anhang 3). Um von den unterschiedlichen Peaks auf die Zygote der Zwillingspärchen schließen zu können, wurden die Größen der Peaks der beiden Geschwister miteinander verglichen: Im Fall von Monozygotie waren die Ausschläge der Peaks (Anzahl der Wiederholungen der Basenpaare) bei beiden Geschwistern vollkommen identisch. War dies nicht der Fall, handelte es sich bei den Zwillingen um ein dizygotes Paar.

Die klinische Einschätzung der Zygote wurde durch die lokalen Studienärzte anhand des Geschlechts (gleichgeschlechtliche vs. getrenntgeschlechtliche Paare), der postnatalen Untersuchung der Plazenta und der Diskordanz im Geburtsgewicht (als Hinweis auf Monozygotie) vorgenommen und auf den oben erwähnten Fragebögen angegeben.

Tabelle 1: Protokoll PCR - Reagenzien

Reagenz	Hersteller / Firma	Menge in μl pro Probe
AmpFISTR Identifiler Primer Set	Applied Biosystems	1,375
AmpliTaQGold DNA Polymerase (5u/ μl)	Applied Biosystems	0,125
AmpFISTR PCR Reaction Mix	Applied Biosystems	3,75
PCR Puffer	Applied Biosystems	2,625
Proben DNA		2,5 (Verdünnung 1:30)
AmpFISTR Identifiler Primer Set	Applied Biosystems	3,8125
AmpliTaQGold DNA Polymerase (5u/ μl)	Applied Biosystems	4,55

Tabelle 2: Protokoll PCR Zyklen

Gerät: GeneAmp 9700	Temperatur [C°]	Zeit (min)
Initiale Denaturierung	95	11
Zyklen (28)		
Denaturierung	94	1
Annealing	59	1
Extension	72	1
Abschließende Extension	60	60
Final Stepp	20	∞

2.5 Statistik

Zur statistischen Analyse der Daten wurde die SPSS-Software (Version 15) verwendet. Zur Beschreibung der kontinuierlichen Variablen wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Zur Prüfung auf Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde für stetige Parameter (Gestationsalter und Geburtsgewicht) der verteilungsfreie (nicht-parametrische) Mann-Whitney-U-Test eingesetzt. Für binäre Variablen wurde zum Vergleich unabhängiger Gruppen der exakte Test nach Fisher, für die IVH Grade der Chi-Quadrat Test nach Pearson verwendet. Alle in dieser Arbeit genannten p-Werte sind zweiseitig. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als signifikantes Ergebnis interpretiert. Die Genauigkeit der genetischen Bestimmung der Zygotie im Vergleich mit der klinischen Einschätzung wurde mit Hilfe der Vier-Felder-Tafel (Sensitivität und Spezifität) ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Studienpopulation

Im Zeitraum von September 2003 bis Ende 2009 wurden aus 28 deutschen neonatologischen Zentren Daten von 3708 Kindern gesammelt, zu denen Informationen über Mehrlingsstatus, Tod, Gestationsalter und Geburtsgewicht vorlagen. Darunter befanden sich 31,6% Mehrlinge (n=1173).

Die Bestimmung der Zygote bei den gleichgeschlechtlichen Zwillingspärchen unseres Kollektives wurde bei insgesamt 208 Paaren (n=416 Kinder) im Institut für Rechtsmedizin in Kiel vorgenommen.

Folgende Zwillingspaare konnten nicht in unsere Auswertung eingeschlossen werden:

11 Paare (n=22 Kinder) konnten aufgrund mangelnder DNA-Qualität nicht eindeutig bestimmt werden.

2 Paare (n=4 Kinder) waren irrtümlicherweise als gleichgeschlechtlich in der Datenbank gespeichert, in Wahrheit aber unterschiedlichen Geschlechts.

4 Paare (n=8 Kinder) wurden bei der Datenübertragung direkt als höhergradige Mehrlinge identifiziert und ausgeschlossen und

26 Paare (n=52 Kinder) wurden nachträglich über die statistische Auswertung als höhergradige Mehrlinge ausgeschlossen.

Demnach konnten wir 165 genetisch eindeutig bestimmte Zwillingspärchen (n=330 Kinder) für unsere Auswertung heranziehen.

Die Zygote der untersuchten Zwillinge ist in unseren Kollektiv folgendermaßen verteilt: unter den 165 Pärchen befinden sich 87 (n=174 Kinder, 52,7%) monozygote und 78 (n=156 Kinder, 47,3%) dizygoten Paare.

3.2 Klinische Daten in Abhängigkeit von Mehrlingsstatus und Zygote

Die folgenden drei Tabellen stellen wichtige klinische Daten der Frühgeborenen dar. In Tabelle 3 wird dabei zunächst ein Überblick über das Gesamtkollektiv gegeben. Die Tabellen 4 und 5 dagegen konzentrieren sich auf wichtige prä- und postnatale klinische Daten im Subkollektiv der genetisch determinierten gleichgeschlechtlichen Zwillingspärchen.

Tabelle 3: Klinische Daten des Gesamtkollektives nach Mehrlingen und Geschlecht getrennt

	Gesamt (n=3709)	Einling (n=2535)	Zwilling gleichgeschl. (n=481)	Zwilling getrenntgeschl. (n=236)	Höhergradiger Mehrling (n=194)	Zwilling ungepaart (n=252)
Gestationsalter* [Wochen]	28,8/ 2,7	28,6/ 2,7	28,6/ 2,2	28,4/ 2,2	29,3/ 2,5	30,6/ 3
Geburtsgewicht* [g]	1067/ 299	1038/ 300	1107/ 273	1097/ 284	1124/ 291	1204/ 300
Tod [%]	2,9	3,3	2,3	2,5	2,6	1,2
Mädchen [%]	49,4	48,2	48,2	50	59,3	56,3
Junge [%]	50,6	51,8	51,8	50	40,7	43,7
Hirnblutung [%]	18,3	17,9	23,5	22,3	12,5	13,1
IVH Grad 1/2 [%]	11,8	11,8	14,4	11,6	8,9	8
IVH Grad 3/4 [%]	6,5	6,1	9,2	10,4	3,7	5,2
OP ROP [%]	3,8	3,7	4	4,3	2,6	5,2
Beatmung [%]	45,9	47,2	49,9	46,6	39,7	29,8
BPD [%]	13,9	15,1	11,7	10,2	11,2	11,1
Sepsis mit pos. Blutkultur [%]	15,1	15,9	12,1	16,4	11,4	13,2
OP wegen NEC od. FIP [%]	4,7	4,9	5,2	3,8	4,2	3,2

*Mittelwert/ Standardabweichung

Auffällige Unterschiede beim Betrachten des Gesamtkollektives (Tabelle 3) zeigen sich zunächst für die Ereignisse Tod und BPD, die bei Einlingen gehäuft vorkommen, genauso wie die Endpunkte Sepsis und OP wegen NEC oder FIP. Bei den gleich- und getrenntgeschlechtlichen Zwillingen finden sich Hirnblutungen häufiger als bei den anderen Gruppen (v.a. Grad 1/2 bei gleichgeschlechtlichen Zwillingen). Während die getrenntgeschlechtlichen Zwillinge zudem eine erhöhte Sepsisrate zeigen, kommt die OP wegen NEC oder FIP bei gleichgeschlechtlichen Zwillingen gehäuft vor. Eine Sonderposition nehmen die Kinder der Gruppe „ungepaarter Zwilling“ ein: Hier finden sich auffällig wenig Todesfälle, Hirnblutungen und notwendige Beatmungen. Gleichzeitig fallen ein vorteilhaftes höheres Geburtsgewicht und ein etwas höherer Anteil an weiblichen Frühgeborenen auf als in den anderen Gruppen. Allerdings kommt der Eingriff OP wegen ROP bei diesen Kindern häufiger vor.

Die folgende Tabelle (Tabelle 4) zeigt einen Vergleich der antenatalen Daten von gleichgeschlechtlichen mono- und dizygoten Zwillingen. Für die dizygoten Zwillinge finden sich signifikante Häufungen von antenataler Antibiotikagabe ($p=0,008$), dem Auftreten des Amnioninfektionsrisikos ($p=0,012$) und des höheren Geburtsgewichts ($p=0,04$). Nicht signifikant, aber auffallend vermehrt sind auch das Vorkommen eines Blasensprungs und der Entbindungsmodus Notsectio bei Dizygoten.

Das Fetofetale Transfusionssyndrom kann natürlich nur bei monozygoten Zwillingen auftreten. Außerdem findet sich gehäufte Wachstumsretardierung bzw. pathologische Doppler-Befunde ($p=0,005$) bei monozygoten Zwillingen.

Tabelle 4: prä- und perinatale klinische Daten von Zwillingen genetisch determinierter Zygote

	Monozygot (n= 174)	Dizygot (n=156)	p[#]
Gestationsalter [Wochen]*	28,6/ 2	28,7/ 2,3	0,174
Geburtsgewicht [g]*	1086/ 263	1139/ 276	0,04
Fetofetale Transfusion [%]	25,6	0	0
Blasensprung [%]	23,9	42,9	0,072
<i>Entbindungsmodus</i>			
Spontan [%]	4,3	2,5	0,51
Sectio [%]	94,2	91,7	0,51
Notsectio [%]	1,4	5,8	0,17
Inborn [%]	94,8	96,2	0,607
Antenatale Lungenreife [%]	95,4	89,7	0,057
Nabelarterien-ph	7,32	7,32	1
Tokolyse [%]	64,4	71,8	0,158
Antenatale Antibiotika [%]	46,6	61,5	0,008
<i>Geburtsursachen</i>			
Unhemmbare Wehen [%]	43,7	45,5	0,741
Amnioninfektionssyndrom [%]	20,1	32,7	0,012
EPH-Gestose [%]	1,1	2,6	0,427
HELLP [%]	4,2	0	0,495
Pathologisches CTG [%]	18,4	14,1	0,302
Wachstumsretardierung, pathologische Doppler [%]	33,3	8,7	0,005
Plazentalösung [%]	3,4	5,1	0,586
sonstige Ursachen [%]	58,6	46,8	0,036

* Mittelwert / Standardabweichung, # Monozygot vs. Dizygot, Mann-Whitney-U Test für Gestationsalter und Geburtsgewicht und Fisher's exact Test für alle anderen Parameter.

Bei der Betrachtung der postnatalen klinischen Daten (Tabelle 5) finden sich in der Statistik nur für das Geburtsgewicht signifikante Unterschiede ($p=0,04$), welches bei den dizygoten Zwillingen höher liegt als bei den monozygoten. Bemerkenswert bleiben das häufigere Vorkommen von BPD und Hirnblutungen bei dizygoten Zwillingen und der Beatmung bei monozygoten Zwillingen, allerdings ohne Signifikanz.

Tabelle 5: postnatale klinische Daten von Zwillingen genetisch determinierter Zygote

	Monozygot (n= 174)	Dizygot (n=156)	p[#]
Gestationsalter* [Wochen]	28,6/ 2	28,7/ 2,3	0,174
Geburtsgewicht* [g]	1086/ 263	1139/ 276	0,04
Tod [%]	1,7	1,3	1
Mädchen [%]	48,3	39,7	0,12
Junge [%]	51,7	60,3	0,12
Hirnblutung [%]	22	26,3	0,37
IVH Grad 1/2 [%]	13,3	14,9	0,88
IVH Grad 3/4 [%]	8,6	11,6	0,88
OP ROP [%]	3,5	4,5	0,59
Beatmung [%]	54,6	48,1	0,27
BPD [%]	10,2	12,9	0,3
Sepsis mit pos. Blutkultur [%]	11,8	13,5	0,74
OP wegen NEC od. FIP [%]	4,6	4,5	1

* Mittelwert / Standardabweichung, # Monozygot vs. Dizygot, Mann-Whitney-U Test für Gestationsalter und Geburtsgewicht, Chi-Quadrat nach Pearson für IVH Grade und Fisher's exact Test für alle anderen Parameter.

3.3 Zygotiebestimmung: klinisch vs. genetisch

Bei 123 frühgeborenen gleichgeschlechtlichen Zwillingspaaren unseres Kollektivs liegt parallel die klinische und genetische Einschätzung der Zygotie vor. 51 dieser Kinder wurden genetisch als monozygote Zwillinge erfasst, wovon 32 Kinder zuvor auch klinisch als solche erkannt wurden. Das entspricht einer Sensitivität der klinischen Einschätzung von 62%.

Tabelle 6: Genauigkeit der klinischen Einschätzung der Zygotie gleichgeschlechtlicher Zwillinge im Vergleich zur genetischen Analyse

	Monozygot (DNA)	Dizygot (DNA)	Gesamt
Monozygot (klinische Einschätzung)[%]	67,7	11,1	32,5
Anzahl	32	8	40
Dizygot (klinische Einschätzung)[%]	37,3	88,9	67,5
Anzahl	19	64	83

Die anderen 72 Paare wurden genetisch als dizygote Zwillinge identifiziert. Von diesen Kindern wurden 64 auch klinisch als solche erkannt, was einer Spezifität der klinischen Einschätzung von 88% entspricht.

3.4 Genetik und exogene Faktoren als prädiktiver Faktor für den Behandlungsablauf

Bei insgesamt 3638 Kindern unseres Gesamtkollektives wurden gültige Angaben zur Art der Surfactantgabe gemacht. Bei n= 71 Kindern fehlten die Angaben.

Die folgende Abbildung (Abbildung 3) gibt eine Übersicht über die Art und Weise der Surfactantapplikation. Die Hälfte der Patienten erhielt kein Surfactant, 31% der Patienten erhielt Surfactant nach konventioneller Methode nur über den Tubus und 17% der Kinder wurden nach der neuartigen Methode, der Surfactantgabe ohne Intubation behandelt. Bei 2% unseres Kollektivs wurde keine Angabe zur Art und Weise der Surfactantgabe gemacht.

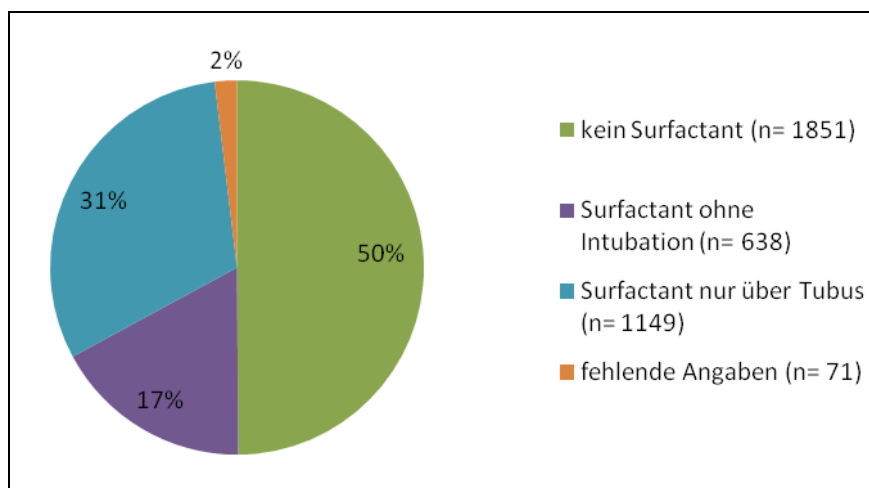


Abbildung 3: Übersicht über die Art der Surfactantgabe im Gesamtkollektiv

Bei n=111 Paaren unserer zygotiebestimmten Zwillinge wurde Surfactant verabreicht. Die nächste Abbildung (Abbildung 4) zeigt die Wahrscheinlichkeit für die Behandlung mit Surfactant von beiden Kindern eines Zwillingspärchens in Abhängigkeit von der Zygote.

Die erwarteten Wahrscheinlichkeiten für die Therapie mit Surfactant in den unterschiedlichen Subgruppen ergeben sich aus der vorangestellten Tabelle 7 und betragen 57% für das Gesamtkollektiv, 45% für Kinder mit einem Geburtsgewicht >1000g (nicht ELBW), 79% für Kinder mit einem Geburtsgewicht <1000g (ELBW), 60% für männliche Frühgeborene und 53% für weibliche Frühgeborene.

Tabelle 7: Wahrscheinlichkeiten für das Ereignis Surfactanttherapie im Gesamtkollektiv und in Subgruppen der zygotiebestimmten Zwillinge

	keine Surfactantgabe	Surfactantgabe	Gesamt
Gesamtkollektiv gleichgeschlechtliche Zwillinge [%]	43	57	
Anzahl	141	187	328
Geburtsgewicht >1000g [%]	54,9	45,1	
Anzahl	117	96	213
Geburtsgewicht <1000g [%]	20,9	79,1	
Anzahl	24	91	115
Geschlecht männlich [%]	39,6	60,4	
Anzahl	72	110	182
Geschlecht weiblich [%]	47,3	52,7	
Anzahl	69	77	146

Die Abbildung 4 verdeutlicht, dass es bei monozygoten Zwillingen häufiger vorkommt, dass beide Kinder mit Surfactant (72,9%, n=43) behandelt werden als bei den dizygoten Zwillingen (63,5%, n=33). Der Unterschied ist allerdings statistisch nicht signifikant ($p=0,312$).

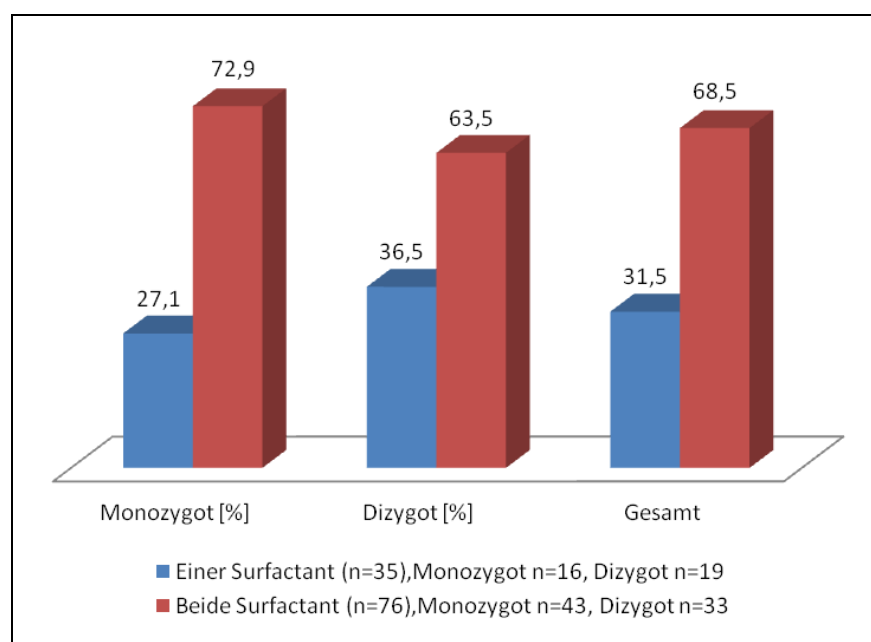


Abbildung 4: Häufigkeit der Surfactantgabe von einem oder beiden Kindern bei Zwillingspaaren mit genetisch determinierter Zygotie in Abhängigkeit von der Zygotie

Die Tabelle 8 zeigt, dass bei den schwereren Kindern, die nicht der ELBW Gruppe angehören, die dizygoten Zwillinge (66,7%) im Vergleich zu monozygoten (84,4%) seltener gleichzeitig mit Surfactant behandelt werden. Die monozygoten Zwillinge liegen dabei fast doppelt so hoch wie der Wert der erwarteten Wahrscheinlichkeit für diese Subgruppe (45,1%, siehe Tabelle 8). Trotzdem ist die Differenz zwischen Monozygoten und Dizygoten statistisch nicht signifikant ($p=0,14$). Bei den leichteren Kindern, die der ELBW Gruppe angehören, ist dagegen kein Unterschied zwischen den Monozygoten und Dizygoten festzustellen (77,3% vs. 77,6%), die Werte entsprechen der erwarteten Wahrscheinlichkeit von 79,1%.

Tabelle 8: Surfactantgabe in Abhängigkeit von Zygotie und Geburtsgewicht < oder > 1500 g

	Einer Surfactantgabe (n=26)	Beide Surfactantgabe (n=85)	Gesamt (n=111)	p [#]
Geburtsgewicht <1000g (ELBW)				
monozygote[%]	22,2	77,8		
Anzahl	6	21	27	
dizygote[%]	22,7	77,3		
Anzahl	5	17	22	1
gesamt[%]	22,4	77,6		
Anzahl	11	38	49	
Geburtsgewicht >1000g (kein ELBW)				
monozygote[%]	15,6	84,4		
Anzahl	5	27	32	
dizygote[%]	33,3	66,7		
Anzahl	10	20	30	0,141
gesamt[%]	24,2	75,8		
Anzahl	15	47	62	

Monozygot vs. Dizygot, Fisher's exact Test

Anhand der Tabelle 9 lässt sich nachvollziehen, dass bei den monozygoten männlichen Zwillingen ein auffällig erhöhter Surfactantbedarf beider Kinder eines Zwillingspärchens zu beobachten ist (81,8%) im Gegensatz zu den dizygoten Paaren (68,8%). Das Ergebnis ist nicht signifikant (Fisher's exact Test, $p=0,26$), zeigt aber trotz der kleinen Fallzahl von 111 Pärchen eine deutliche Tendenz. Die dizygoten Zwillinge liegen dabei nah an der erwarteten Wahrscheinlichkeit für die Surfactantgabe bei männlichen Frühgeborenen (60,4%, siehe Tabelle 7), die monozygoten dagegen liegen deutlich darüber.

Auch bei den weiblichen Zwillingspärchen ist die Behandlung beider Kinder mit Surfactant häufiger bei monozygoten (80,8%), als bei weiblichen dizygoten Paaren (75%). Die Differenz ist aber viel geringer als bei den männlichen Zwillingen ($p=0,726$).

Tabelle 9: Surfactantgabe in Abhängigkeit von Zygotie und Geschlecht

	Einer Surfactantgabe (n=26)	Beide Surfactantgabe (n=85)	Gesamt (n=111)	p [#]
Geschlecht männlich				
monozygote[%]	18,2	81,8		
Anzahl	6	27	33	
dizygote[%]	31,3	68,8		
Anzahl	10	22	32	0,26
gesamt[%]	24,6	75,4		
Anzahl	16	49	65	
Geschlecht weiblich				
monozygote[%]	19,2	80,8		
Anzahl	5	21	26	
dizygote[%]	25	75		
Anzahl	5	15	20	0,726
gesamt[%]	21,7	78,3		
Anzahl	10	36	46	

Monozygot vs Dizygot, Fisher's exact Test

3.5 Neue Therapieform „Surfactantgabe ohne Intubation“ in Bezug auf den Endpunkt maschinelle Beatmung

Im Folgenden stellt die Abbildung 5 die Häufigkeit der neuen Behandlungsmöglichkeit „Surfactantgabe ohne Intubation“ in Abhängigkeit von der Zygotie der Zwillingspaare dar. Insgesamt haben 69 Kinder unserer zygotiebestimmten Zwillinge Surfactant ohne Intubation erhalten. Zwischen Mono- und Dizygoten ist dabei kein erwähnenswerter Unterschied zu beobachten. In beiden Gruppen wurden fast gleich viele Kinder mit der neuen Methode versorgt (monozygot= 19,2%, dizygot= 23,1%, $p=1$).

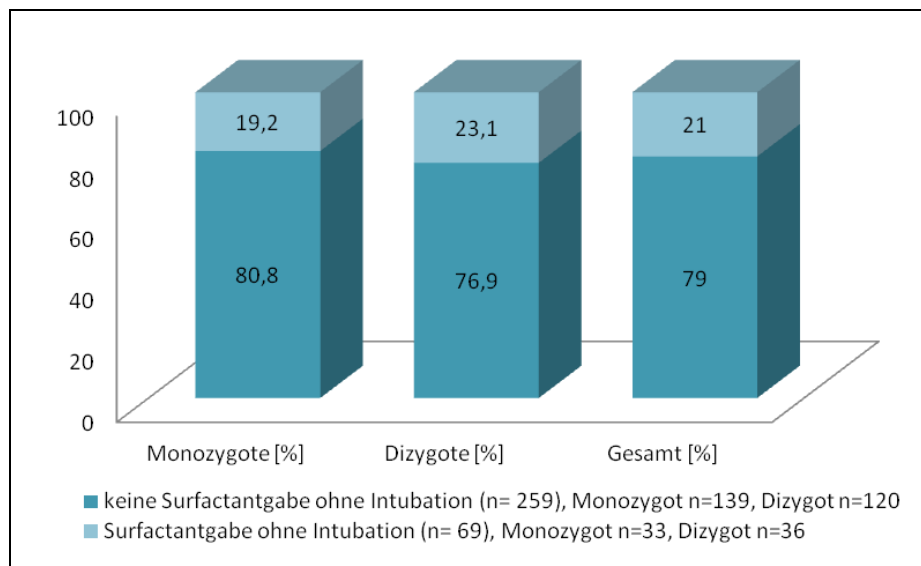


Abbildung 5: Häufigkeit der Behandlungsmethode Surfactantgabe ohne Intubation bei Zwillingen mit genetisch determinierter Zygotie

Die folgende Abbildung (Abbildung 6) zeigt dieselbe Analyse wie schon in Abbildung 4 durchgeführt, diesmal aber für den Endpunkt "Surfactantgabe ohne Intubation". Hierfür finden sich keine Differenzen zwischen mono- und dizygoten Zwillingen. Bei 56,5% (n= 13) der monozygoten und 54,2% (n=13) der dizygoten Zwillinge hat nur ein Zwilling eines Paares Surfactant ohne Intubation erhalten. Bei 43,5% (n=10) der monozygoten und 45,8% (n=11) der dizygoten Zwillinge haben beide Geschwisterkinder Surfactant nach der neuen Methode bekommen.

Da sich im Gesamtkollektiv keine Differenz zeigt, wurde auf die Analyse von Subgruppen (Geschlecht, ELBW) verzichtet.

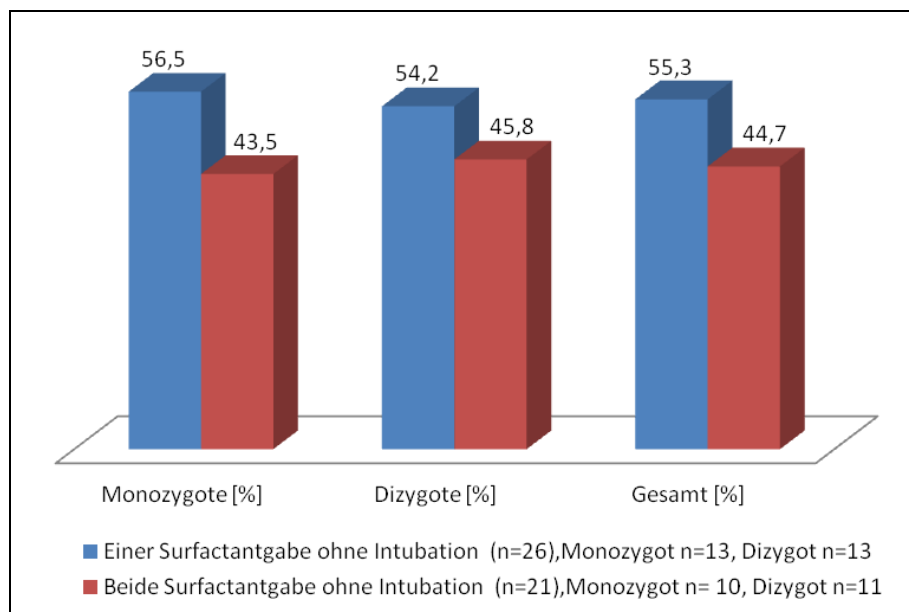


Abbildung 6: Häufigkeit der Behandlungsmethode Surfactantgabe ohne Intubation bei einem oder beiden Kindern von Zwillingspärchen mit genetisch determinierter Zygotie in Abhängigkeit von der Zygotie

Im Folgenden (Tabelle 10 und Abbildung 7) wurde die neue Surfactanttherapie in Bezug auf den Endpunkt „Beatmung“ untersucht. Dabei lag ein besonderes Augenmerk auf der Abhängigkeit von Geburtsgewicht und Geschlecht.

Tabelle 10: Surfactantgabe ohne Intubation in Bezug auf den Endpunkt Beatmung in Abhängigkeit vom Geburtsgewicht (kleiner bzw. größer als 1000g)

	Geburtsgewicht>1000g (n=2079)	Geburtsgewicht<1000g (n=1622)	Gesamt (n=3701)
keine Surfactantgabe ohne Intubation			
keine Beatmung[%]	71,1	27,7	53,4
Anzahl	1292	345	1637
Beatmung[%]	28,9	72,3	46,6
Anzahl	524	902	1426
Surfactantgabe ohne Intubation			
keine Beatmung[%]	70	48	57,1
Anzahl	184	180	364
Beatmung[%]	30	52	42,9
Anzahl	79	195	274

Es fällt auf, dass besonders kleine Kinder mit einem Geburtsgewicht unter 1000g (ELBW), einen deutlichen Vorteil von der Surfactantgabe ohne Intubation haben: Bei diesen Kindern war nur in 52% der Fälle eine Beatmung unter der neuen Therapieform nötig. Wohingegen es 72,3% der Kinder bei Anwendung der herkömmlichen Methode waren, die beatmet werden mussten. Bei den Kindern mit einem Geburtsgewicht größer als 1000g (VLBW) dagegen unterscheidet sich die Beatmungshäufigkeit kaum (28,9% vs. 30%). Besonders deutlich wird der Unterschied der beiden Therapiemöglichkeiten in Bezug auf die Beatmungshäufigkeit beim Vergleich der Differenzen zwischen den beiden Kindergruppen in der jeweiligen Therapiekategorie. Bei der herkömmlichen Art der Surfactantgabe beträgt die Differenz der Beatmungshäufigkeit zwischen den Kindern der ELBW und nicht-ELBW Gruppe $\Delta=43,4\%$. Bei der neuen Methode, Surfactantgabe ohne Intubation, beträgt dieselbe Differenz nur $\Delta=22\%$. Dieser Unterschied kommt durch die deutlich gesenkte Beatmungshäufigkeit bei Kindern der ELBW Gruppe bei der Surfactantgabe ohne Intubation zu Stande und unterstreicht den großen klinischen Vorteil dieser Behandlungsmethode.

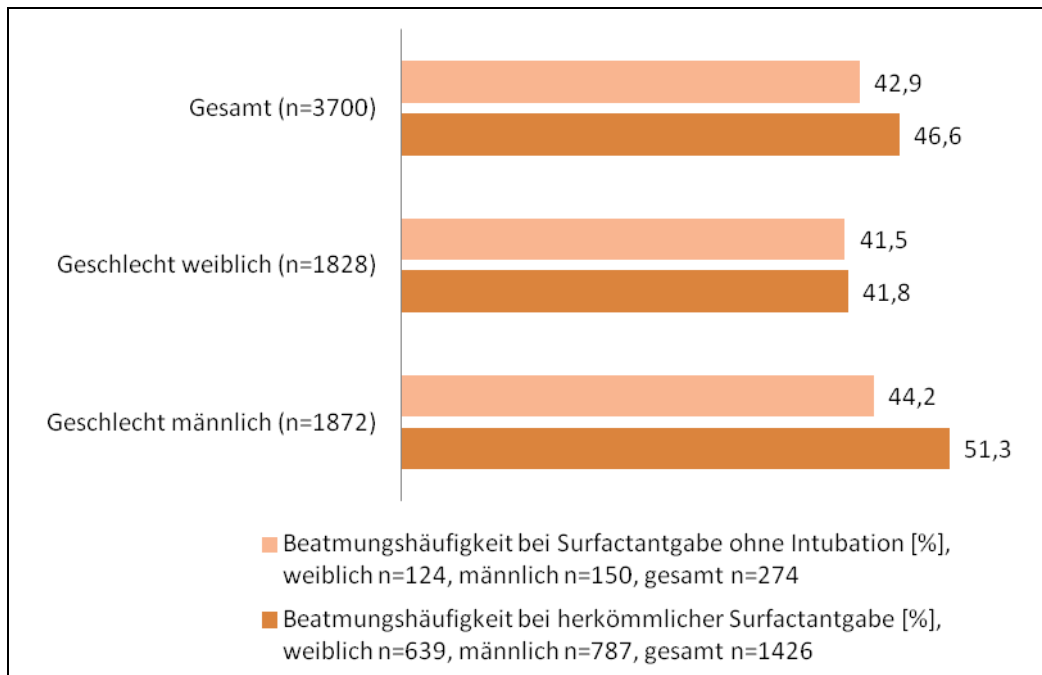


Abbildung 7: Surfactantgabe ohne Intubation in Bezug auf den Endpunkt Beatmung in Abhängigkeit vom Geschlecht

Anhand von Abbildung 7 lässt sich nachvollziehen, dass die männlichen Frühgeborenen bei der herkömmlichen Art der Surfactantgabe auffällig häufiger beatmet werden müssen (51,3%, n=787), als bei der Surfactantgabe ohne Intubation (44,2%, n=150). Dies macht einen Unterschied von 7,1% zwischen den Behandlungsmethoden aus. Bei den weiblichen Frühgeborenen dagegen beträgt diese Differenz nur 0,3%, da die Beatmungshäufigkeit keinen Unterschied zwischen den Behandlungsmethoden aufweist (41,5%, n=124 vs. 41,8%, n=69). Es fällt auf, dass die Surfactantgabe ohne Intubation zu einem Angleich der Beatmungshäufigkeit zwischen den Geschlechtern führt. Männliche Kinder werden im Vergleich zu den weiblichen Kindern nur noch um 2,7% häufiger beatmet, im Gegensatz zu 9,5% beim herkömmlichen Vorgehen. Die Surfactantgabe ohne Intubation zeigt einen deutlichen Vorteil für männliche Frühgeborene.

4 Diskussion

Prospektive Kohortenstudien gehören zu der Gruppe der analytischen Studien. Durch ihre standardisierten Fragebögen (siehe Anhang 1) und die Anwendung von standardisierten Scores (CRIB Score, Kriterien für Sepsis NEC und Pneumonie nach NEO-KISS) weist die Datenerhebung eine hohe Reproduzierbarkeit auf.

Auch die Zygotiebestimmung anhand der DNA Untersuchungen mit Multiplex-PCR Kits und STR-Typisierung weist in Studien eine Genauigkeit von 99,99 % auf, selbst wenn nur fünf oder sechs STR-Loci untersucht werden konnten (Von Wurmb-Schwark et al., 2004) und stellt damit eine sehr zuverlässige Methode dar.

Hinsichtlich der neuen Therapieform „Surfactantgabe ohne Intubation“ ist davon auszugehen, dass bei der Anwendung der Methode Erfahrungsschatz, Handfertigkeiten und Schulung des Personals situationsabhängig waren und Auswirkungen auf die Effektivität der Therapie und unsere Ergebnisse hatten. Allerdings entspricht dies den Bedingungen des klinischen Alltags, der niemals frei von subjektiven Momenten ist. Da es sich bei unserer Studie nicht um eine blinde Randomisierung handelt, ist es möglich, dass die anschließende Behandlung der Kinder durch das Wissen um den Einschluss beeinflusst war. Außerdem waren die Bedingungen und Indikationen für die Surfactantgabe nicht klar definiert.

Besonders im letzten Teil der Auswertung (die neue Therapieform mit Surfactant betreffend) handelt es sich um die Analyse einer sehr kleinen Patientenzahl. Obwohl die Ergebnisse eine deutliche Tendenz zeigen, ist von einer ausreichenden statistischen Sicherheit nicht auszugehen.

4.1 Outcome klinischer Parameter Einlinge vs. Zwillinge

Viele Studien, die frühgeborene Einlinge und Zwillinge miteinander vergleichen, zeigen, dass es keine signifikanten Unterschiede im Outcome der beiden Gruppen gibt (Friedmann et al., 1997; Lee et al. 2003; Garite et al., 2004; Kirkby et al., 2010). Ähnlich ist es auch beim Betrachten unseres Gesamtkollektivs. Dennoch sind einige auffällige Tendenzen zu beobachten.

Die Datenlage zur perinatalen Mortalität und Morbidität von Zwillingen, verglichen mit Einlingen, ist kontrovers. Unsere Ergebnisse zeigen eine erhöhte Mortalität für Einlinge im Vergleich zu Zwillingen und höhergradigen Mehrlingen.

Der aktuelle (2008) europäische Gesundheitsbericht der EURO-PERISTAT Gruppe (<http://www.europeristat.com/bm.doc/european-perinatal-health-report.pdf>) zeigt einen deutlichen Trend erhöhter Mortalität für Zwillinge in der Neonatalperiode. Die Wahrscheinlichkeit in der Neonatalperiode zu sterben liegt für Mehrlinge vier- bis achtmal höher als für Einlinge. Diese Beobachtung wurde von Hayes et al. (2007) bei der Analyse von 1769 Frühgeborenen unter 1500g (465 Zwillingen und 1304 Einlingen) bestätigt. Auch in der aktuellen Studie von Petit et al. (2011) wurde eine signifikant erhöhte Mortalität von Zwillingen bei sehr unreifen Kindern unter der 28. SSW beobachtet. Zwischen der 32. und 36. SSW ist dagegen die Mortalität für die Einlinge, wie in unseren Ergebnissen, erhöht. Diesen, vom Gestationsalter abhängigen Unterschied, zeigen auch weitere Studien (Yu et al., 1986; Kilpartick et al., 1996; Rettwitz-Volk, 2003; Garg et al., 2010, Papiernik et al., 2010).

Eine Erklärung bietet die Tatsache, dass Zwillinge physiologischerweise dazu tendieren, früher geboren zu werden als Einlinge mit gleichem Gestationsalter (Bornstein et al., 2009). Die Arbeitsgruppe um Leveno et al. (1984) konnte zeigen, dass Zwillinge ab der 31. SSW in utero eine beschleunigte Lungenreifung erfahren, um auf die vorzeitige Geburt „vorbereitet“ zu sein. Diese Unterschiede in der Entwicklung der Lunge könnten für das positive Outcome der Zwillinge bezüglich der Mortalität im höheren Gestationsalter verantwortlich sein. Zudem könnte dies auch eine plausible Ursache für das häufigere Auftreten der BPD bei Einlingen sein, wie bei unseren Ergebnissen beobachtet.

Die Arbeitsgruppe um Picaud vergleicht in einer jüngsten Studie Frühgeborenen, die unter reproduktionsmedizinischen Maßnahmen (ART) entstanden sind mit spontan empfangenen (SC). Die Ergebnisse zeigen ein vorteilhaftes Outcome hinsichtlich des Überlebens ohne schwere Morbidität für die ART Gruppe. Erklären tun die Autoren

dies mit einem höheren Anteil an Mehrlingsschwangerschaften in der ART-Gruppe (70%) und Einlingsschwangerschaften in der SC-Gruppe (Picaud et al., 2012). Diese Schlussfolgerung passt zu den von uns beobachteten Vorteilen für die Mehrlinge unserer Kohorte. Um diese Tatsache genauer untersuchen zu können, wäre es von Interesse wie viele Mehrlinge unserer Studie unter reproduktionsmedizinischen Maßnahmen entstanden sind.

In der vorliegenden Untersuchung haben Zwillinge ein erhöhtes Risiko für Hirnblutungen. Besonders Grad 1/2 Blutungen, aber auch Grad 3/4 Blutungen treten gehäuft bei gleichgeschlechtlichen Zwillingen auf. Auch vorherige Studien berichten von einer erhöhten Hirnblutungsneigung für Zwillinge (Hayes et al. 2007; Nielsen et al., 1997). In ihrer Gültigkeit unterstützt werden unsere Beobachtungen durch die Ergebnisse von Papiernik et al. (2010), die in ihrer Studie ein signifikant erhöhtes Risiko für gleichgeschlechtliche Zwillinge (Gestationsalter 24-27 Woche) hinsichtlich Grad 3/4 Blutungen finden.

Eine mögliche Erklärung für die Ursache des erhöhten Hirnblutungsrisikos bei Zwillingen gibt Lindner et al. (2003) der Fertilitätsbehandlungen, insbesondere in vitro Fertilisationen, für den erhöhten Anteil an Mehrlingen mit IVH als möglichen Risikofaktor vermutet. Andere Studien widerlegen diese Annahme mit gegenteiligen Ergebnissen: Zwillinge und Drillinge, die mit reproduktionsmedizinischen Maßnahmen gezeugt wurden, hatten ein geringeres Risiko für IVH als natürlich empfangene Kinder (Stewart et al., 2002; Picaud et al., 2012).

Bei der Untersuchung von 157 Kindern, die vor der 35. SSW geboren wurden und an einer PVL erkrankten, fanden sich ebenfalls erhöhte IVH Raten (Grad 2) für Einlinge (9%) im Gegensatz zu Mehrlingen (0%). Dabei stammen 3% der Zwillinge und 100% der Drillinge von in vitro Fertilisationen. Fraglich bleibt in diesem Fall, welchen Einfluss die Diagnose PVL auf die Ergebnisse hat (Resch et al., 2012)

Blickstein et al. (2006) zeigten an einer sehr großen Kohorte (5022 Einlinge, 2032 Zwillinge und 582 Drillinge), dass die IVH Rate sowohl bei Einlingen als auch Mehrlingen davon abhängt, ob der Zyklus der antenatalen Steroidgabe vollendet werden konnte. Eine signifikante Reduktion der IVH Rate war bei allen Gruppen durch eine komplette Zyklusgabe antenataler Steroide erreichbar; bei Zwillingen konnte das Auftreten einer IVH sogar um die Hälfte reduziert werden. Die höhere IVH Rate bei Zwillingen in unserer Auswertung könnte also auch mit einer unvollendeten antenatalen Steroidgabe aufgrund von häufigeren pränatalen Komplikationen bei Mehrlingen zusammenhängen.

Besonders auffällig ist das Outcome der Gruppe „ungepaarter Zwilling“ im Vergleich zum Gesamtkollektiv. Die klinischen Daten dieser Gruppe zeigen insgesamt ein relativ günstiges Outcome: eine niedrige Todesrate, weniger Hirnblutungen und Beatmungsfälle. In diese Gruppe fallen Kinder, die ein Geschwisterkind haben, das entweder verstorben ist, oder aufgrund des zu hohen Geburtsgewichtes (>1500g) nicht eingeschlossen wurde. Dabei handelt es sich um Kinder mit einem durchschnittlich höheren vorteilhaften Gestationsalter und einem etwas höheren Anteil an weiblichen Frühgeborenen, was wahrscheinlich zum positiven Outcome beigetragen hat (siehe 1.3 Risiken für männliche Frühgeborene). Wie die auffällige Häufung „OP wegen ROP“ in dieser Gruppe zu erklären ist, bleibt unklar. Mehrlinge weisen eine niedrigere oder gleiche ROP Rate im Vergleich zu Einlingen auf (Lee et al., 2003; Qui et al., 2008). Ein niedriges Gestationsalter, Sauerstoffgabe und mechanische Beatmung dagegen sind signifikante Risikofaktoren für die Entwicklung einer ROP (Chen et al., 2011). Dies steht im Widerspruch mit den Kindern unserer Gruppe, die ein höheres Gestationsalter haben und weniger häufig beatmet wurden als die Vergleichsgruppen.

4.2 Outcome klinischer Parameter bei zygotiebestimmten gleichgeschlechtlichen Zwillingen

Eine Vielzahl an Studien hat das Outcome von Zwillingen anhand der Bestimmung von Chorionverhältnissen untersucht: Hack et al. (2008) verglichen monochoriale und dichoriale Zwillinge und zeigten eine erhöhte Mortalität für monochoriale Zwillinge (11.6% vs 5.0%). Auch die Risiken für intrauterinen Tod und NEC waren erhöht. Das mediane Gestationsalter und das Geburtsgewicht waren signifikant niedriger für monochoriale Zwillinge. Eine frühere Studie mit gleicher Vorgehensweise fand für monochoriale Zwillinge ebenfalls ein niedrigeres Gestationsalter und eine erhöhte perinatale Mortalität (50% vs. 15%) (Snijder und Wladimiroff, 1998).

Dass die Verhältnisse der Eihäute nicht automatisch eindeutige Information über die Zygotie der Zwillingspaare geben, wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt (3.3 Zygotiebestimmung: klinisch vs. genetisch). Ergebnisse, die auf dieser Vorgehensweise basieren, sind in ihrer Aussagekraft in Frage zu stellen. Papiernik et al (2010) zeigten anhand einer Untersuchung von „frühchentypischen“ Erkrankungen an einer großen Kohorte von 4840 sehr kleinen Frühgeborenen, dass Zwillinge mit einem Gestationsalter zwischen 24-27 Wochen einem erhöhten Risiko für Mortalität und IVH

Grad III / IV unterlagen, wenn sie gleichgeschlechtlich waren und ein diskordantes Geburtsgewicht hatten. Dies lässt vermuten, dass die Zygotie Einfluss auf die Beobachtung hat, da sich unter den gleichgeschlechtlichen Zwillingen der Anteil an monozygoten, genetisch identischen Zwillingen befindet. Eine genetisch eindeutige Zygotiebestimmung wurde in dieser Studie versäumt.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig nach genetisch eindeutig determinierter Zygotie der umfangreiche Vergleich von typischen neonatalen Erkrankungen und pränatalen Komplikationen bei monozygoten und dizygoten Zwillingen vorgenommen. Für monozygote Zwillinge fand sich eine signifikant erhöhte Anwendung an antenataler Lungenreife und FFTS. Letzteres war physiologischerweise zu erwarten und bestätigt abermals die Sicherheit der Methode zur Zygotiebestimmung. Daneben wurden Monozygote häufiger beatmet und weisen eine Wachstumsretardierung mit pathologischem Doppler auf, allerdings ist der Unterschied nicht signifikant. Die signifikante Häufung der antenatalen Lungenreife in Kombination mit der vermehrten postnatalen Beatmung bei Monozygoten gibt einen ersten Hinweis darauf, dass die Lungenparameter unter Einfluss genetischer Faktoren stehen könnten, denn obwohl eine antenatale Lungenreifung bei monozygoten Zwillingen häufiger durchgeführt wurde als bei dizygoten, müssen sie postnatal mehr beatmet werden. Dies steht im Widerspruch zueinander. Die Mortalität ist, im Gegensatz zu den vorherigen Studien bei monochorialen Zwillingen, für monozygote Zwillinge nicht erhöht. Auch das Gestationsalter unterscheidet sich bei unseren Ergebnissen kaum zwischen Monozygoten und Dizygoten. Dizygoten haben, wie in den Studien, die auf den Chorionverhältnissen basieren, ein signifikant erhöhtes Geburtsgewicht. Die von uns beobachtete Häufung der IVH bei dizygoten Zwillingen, steht im Gegensatz zu den von Papiernik et al. (2010) berichteten höheren IVH-Prävalenzen bei gleichgeschlechtlichen Zwillingen.

Unerwartet ist die von uns beobachtete höhere Prävalenz einer Chorioamnionitis gemeinsam mit gehäufter antenataler Antibiose bei dizygoten Zwillingen. Ältere Studien berichten von einer (signifikant) niedrigeren Prävalenz von Chorioamnionitiden bei Zwillingen im Vergleich zu Einlingen (Myles et al., 1997; Mizrahi et al., 1999). Neuere Studien kommen zu gleichen Ergebnissen (Hayes et al., 2007; Ehsanipoor et al., 2011). Romero et al. (1990) zeigten zudem, dass die mikrobielle Invasion der Amnionhülle in 11,9% der Zwillingsschwangerschaften und in 21,6% der Einlingsschwangerschaften vorkommt. Wie allerdings das gehäufte Auftreten der Chorioamnionitis speziell bei dizygoten Zwillingen zu erklären ist, bleibt unklar und

bedarf weiterer Untersuchungen, die vor allem eine zweifelsfreie genetische Bestimmung der Zygote als Grundlage haben sollten. Bei den genannten Studien wurde die Zygote anhand unsicherer Parameter festgemacht. Die Annahme, dass die Chorioamnionitis in Zusammenhang mit einer erhöhten BPD-Rate steht (Watterberg et al., 1996; Van Marter et al., 2002), wird durch unsere Ergebnisse bestärkt: Nicht signifikant, aber auffällig erhöht ist auch die Rate an BPD bei Dizygoten. Auch die auffällige Häufung vorzeitiger Blasensprünge passt in das Gesamtbild des höheren intrauterinen Infektionsrisikos bei dizygoten Zwillingen.

4.3 Zygotebestimmung gleichgeschlechtlicher Zwillinge: klinische vs. genetische Methode

Die genetische Zygotebestimmung von gleichgeschlechtlichen Zwillingspaaren nach der Geburt wurde wiederholt von Genetikern und Ärzten empfohlen (Derom et al., 1985; Bajoria und Kingdom, 1997). Die Information über die Zygote ist für viele Bereiche von Wert: Für die Bestimmung der Kompatibilität bei Organtransplantationen, für die genetische Zwillingsforschung in Hinsicht auf die Biologie und Pathologie von monozygoten Zwillingen und für die Erkenntnis genetischer Einflüsse auf eine Vielzahl von Krankheiten und multifaktoriell bedingten Störungen. Auch für pränatale klinische Entscheidungen kann die Zygotebestimmung anhand des Probenmaterials einer Amniozentese wertvoll sein (Chen et al., 2000). Im Falle des Ablebens eines Feten während der Schwangerschaft ohne Kenntnis der Chorionverhältnisse ist die Zygotebestimmung von therapeutischer Bedeutung: So kann eine dizygotische Schwangerschaft wohlmöglich aufrechterhalten werden, eine monozygotische dagegen sollte schnellstmöglich entbunden werden, wenn der lebende Zwilling reif genug ist. (Norton et al., 1997). Aufgrund der Ausbildung fetoplazentarer Anastomosen bei Eineiigen ist der monozygotische Zwilling höheren peripartalen Risiken, unter anderem dem ausschließlich bei Monozygoten vorkommenden Fetofetalen Transfusionssyndrom, ausgesetzt (Bajoria und Kingdom, 1997).

Studien über die Genauigkeit der antenatalen Determination der Plazentationsverhältnisse bei Zwillingen mittels Ultraschall berichten von einer Spezifität der Methode von 91% für Monozygote und 96% für Dizygoten (Stenhouse et al., 2002). Eine Untersuchung der Häufigkeit der Plazentationsverhältnisse und die Korrelation zur genetisch bestimmten Zygote bei 668 Zwillingspaaren ergab, dass in 45% der

Fälle die Kinder gleichgeschlechtlich und ihre Plazenten dichorial waren (Cameron, 1968). Über diese Gruppe lässt sich keine eindeutige Aussage über die Zygote treffen, sie können sowohl monozygot, als auch dizygot sein. In der Studie von Cameron erwiesen sich nach genetischer Bestimmung dieser gleichgeschlechtlichen, dichorialen Kinder 37% als dizygot und 8% als monozygot, die ohne Zygotebestimmung als zweieiig eingestuft worden wären. Diese Erkenntnis verdeutlicht, dass von den Chorionverhältnissen nicht auf die Zygote der Zwillinge geschlossen werden darf und genauere Methoden zur Zygotebestimmung notwendig sind.

Der Einsatz von DNA Untersuchungen mit Multiplex-PCR Kits und STR-Typisierung hat die Determination der Zygote in der Zwillingsforschung revolutioniert. Yang et al. nutzten dieses Verfahren bei der DNA -Untersuchung von 73 Zwillingspaaren zur Zygotebestimmung und verglichen die Ergebnisse mit der klinischen postnatal erhobenen Einschätzung der Zygote anhand der Chorion- und Plazentationsverhältnisse. Die Genauigkeit der Zygoteeinschätzung anhand der Chorionverhältnisse zeigte eine Sensitivität von 68,8% und eine Spezifität von 82,7%. Basierend auf den Plazentationsverhältnissen zeigten sich eine Sensitivität von 50% und eine Spezifität von 87,5%. Von den 73 Zwillingspaaren waren 27 gleichgeschlechtlich und dichorial. Davon wurden 9 Paare als monozygot, 18 als dizygot determiniert. Wäre man davon ausgegangen, dass Gleichgeschlechtlichkeit und Dichorialität automatisch für Dizygotie sprechen, hätte man in einem Drittel der Fälle, ähnlich wie bei der Studie von Cameron, eine falsche Annahme getroffen (Yang et al., 2006).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind mit den in der Literatur berichteten Daten vergleichbar: Die Sensitivität der klinischen Einschätzung, welche mehrere Faktoren (Gleichgeschlechtlichkeit, Diskordanz im Geburtsgewicht, Plazenta- und Chorionverhältnisse) beinhaltete, betrug 62% (vs. 68,8% und 50%) und die Spezifität 88% (vs. 82,7% und 87,5%). Es wird deutlich, dass selbst beim Heranziehen einer Vielzahl von klinischen Parametern, wie es im Rahmen dieser Arbeit der Fall war, die Erfolgsrate der klinischen Einschätzung der Zygote bei Zwillingen nicht ausreichend zuverlässig bestimmt werden kann. Nur eine genetisch determinierte Zygote kann zu 100% valide Aussagen liefern und Grundlage verlässlicher Zwillingsstudien sein. Zwar haben die Chorionverhältnisse gravierendere Auswirkungen auf das perinatale Outcome Frühgeborener Zwillinge als die Zygote (Dubé et al., 2002; Carroll et al., 2005; Lee et al., 2010), jedoch ist die genetische Determination der Zygote unverzichtbar, um anhand von Studien zuverlässige und reproduzierbare Aussagen machen zu können.

4.4 Genetik und exogene Faktoren als prädiktiver Faktor für den Behandlungsablauf von sehr kleinen Frühgeborenen

Bei unserer Untersuchung von Subgruppen sehr kleiner Frühgeborener in Hinblick auf die Therapie mit Surfactant zeigte sich wiederholt, dass bei monozygoten Zwillingen häufiger beide Kinder eines Paares behandelt wurden als bei den Dizygoten. Dies konnte man sowohl im Gesamtkollektiv, als auch bei den „nicht- ELBW“ Kindern und den weiblichen und männlichen Frühgeborenen beobachten. Bei den ELBW Kindern dagegen zeigte sich diesbezüglich kein Unterschied. Vermutlich liegt das daran, dass diese Kinder aufgrund des mit ihrem geringen Geburtsgewicht verbundenem niedrigen Gestationsalters so extrem unreif sind, dass fast alle Frühgeborenen dieser Gruppe automatisch mit Surfactant behandelt wurden und damit etwaige Differenzen nicht mehr erkenntlich sind.

Weiter auffällig ist der Vergleich der Geschlechter. Während beide Gruppen eine Häufung der Surfactantgabe bei monozygoten Zwillingen zeigen, so ist diese Tendenz bei männlichen Frühgeborenen sehr viel ausgeprägter als bei weiblichen. Die Beobachtung, dass monozygote, männliche Frühgeborene häufiger ein RDS entwickeln und Surfactant erhalten als andere Kinder unseres Gesamtkollektivs, legt den Verdacht nahe, dass genetische Eigenschaften dieser Subgruppe Ursache dafür sein können. Mehrere Zwillingsstudien haben den genetischen Einfluss auf die Entstehung von RDS untersucht und sind dabei zu verschiedenen Ergebnissen gekommen. Myriantopoulos et al. (1971) werteten die Daten von 31 Zwillingspaaren aus und fanden eine Konkordanz für RDS bei 85% der monozygoten und 44% der dizygoten Zwillinge. Van Sonderen et al. (2002) fanden ebenfalls eine erhöhte RDS-Konkordanzrate für monozygote Zwillinge von 67% im Vergleich zu dizygoten mit 29% (gesamt n=80). Die Ergebnisse deuten auf einen starken genetischen Einfluss hin, verlieren aber an Aussagekraft, da die Bestimmung der Zygotie anhand von Plazentationsverhältnissen und Blutproben vorgenommen wurde und damit unpräzise ist. Eine jüngere Studie untersuchte 100 gleichgeschlechtliche Zwillingspaare mit RDS und fand einen Konkordanzunterschied zwischen Monozygoten und Dizygoten von nur 10%, ohne Signifikanz ($p=0.35$) (Marttila et al., 2003). In einer weiteren Studie der gleichen Arbeitsgruppe wurde die Anfälligkeit für RDS zwischen Geschwistern von Zwillingspaaren untersucht. Da zwischen gleichgeschlechtlichen und getrenntgeschlechtlichen Zwillingen kein Konkordanzunterschied von RDS aufzufinden war, folgerten die Autoren, dass Umweltfaktoren einen größeren Einfluss auf die

Entstehung von RDS haben als genetische Faktoren (Marttila et al., 2004). Obwohl diese Studie eine große Zahl von Zwillingspaaren einschloss (gleichgeschlechtliche Zwillinge $n=3171$, getrenntgeschlechtliche Zwillinge $n=1512$), erscheint die Bestimmung der Zygote ausschließlich anhand des Geschlechtes mangelhaft und stellt das Ergebnis in Frage, Zudem wurde versäumt die Zwillingskinder in gestationsaltersspezifischen Gruppen zu betrachten. Da alle zwischen den Jahren 1987 bis 2000 in Finnland lebend geborene Kinder in die Studie eingeschlossen wurden, ist davon auszugehen, dass physiologischerweise nur ca. 1% der Kinder dieser Kohorte zu der VLBW- Gruppe gehören, die sich zum Vergleich mit unseren Daten eignen würde. Dies würde nur 32 gleichgeschlechtlichen und 16 getrenntgeschlechtlichen Zwillingen entsprechen und mindert die Aussagekraft der Daten.

Auch wenn nur eine kleine Fallzahl ($n = 330$ Zwillingskinder) Grundlage unserer Studie ist, hat unsere Auswertung aufgrund des präzisen Vorgehens bei der Zygotebestimmung eine starke Aussagekraft. Der häufigere Einsatz von Surfactant bei monozygoten Zwillingen unabhängig vom Geschlecht und Gewicht, bestätigt die Resultate von Van Sonderen et al. und Myriantopoulos et al.

Aufgrund der fehlenden Evidenz für einen zweifelsfreien Einfluss genetischer Komponenten auf die Entstehung von RDS, haben andere Studien die Identifizierung spezifischer Gene zum Ziel, die zum Risiko von RDS beitragen könnten. Die in unserer Auswertung beobachteten, geschlechtsabhängigen Unterschiede mit einem deutlichen Nachteil für männliche Frühgeborene im Outcome der Lungenparameter, lassen sich anhand jüngerer Studien nachvollziehen. Die geschlechterspezifischen Unterschiede der Lungenentwicklung in der Fetalperiode sind schon lange bekannt: Männliche Lungen reifen verzögert, und die Surfactantsynthese setzt im Vergleich zur weiblichen Lunge um durchschnittlich 1.4 Wochen später ein (Fleisher et al., 1985; Hallman et al., 2002). Obwohl das Vorkommen höherer Androgenspiegel in männlichen Feten diesen geschlechterspezifischen Unterschied erklärt (Carey et al., 2007), sind die Gene, die abhängig vom Geschlecht die Lungenreife steuern, unbekannt. Simard et al. (2006) konnten durch Tierversuche zeigen, dass der geschlechterspezifische Unterschied der Reifung von Alveolar Typ II Zellen auch mit einer Vielzahl anderer Gene, die für die Surfactantproduktion und Lungenentwicklung zuständig sind, verbunden ist. Neben Genen, die Hormonmetabolismus und -regulation (Steroidesynthese), Apoptose und Signaltransduktion steuern, befinden sich auch Gene, die die in den Lipidtransport involvierten Apolipoproteine codieren. In

einer weiteren Studie, die unterschiedliche Gene von Mäusefeten zum Zeitpunkt der beginnenden fetalen Surfactantsynthese untersuchte, konnten genauere Erkenntnisse gewonnen werden: Zum einen zeigt die männliche Lunge zu diesem Zeitpunkt noch eine viel intensivere transkriptionelle Aktivität proliferativer Vorgänge bezüglich der Lungenentwicklung als die weibliche, bei der diese Vorgänge schon abgeschlossen sind. Dies bestätigt unsere Beobachtung, dass die männlichen Frühgeborenen den Nachteil einer verzögerten Lungenentwicklung haben und mehr Surfactant benötigen (Bresson et al., 2010). Zum anderen identifizierte die Arbeitsgruppe Gene mit geschlechtsabhängigen Unterschieden, die mit dem Androgenrezeptor interagieren, die Surfactantsynthese (i.B. den Phospholipidanteil) beeinflussen und regulatorische Funktionen in Bezug auf die Lungenentwicklung haben, die einen Nachteil für männliche Feten darstellen. Bei Letzteren handelt es sich vor allem um Gene, die im Zusammenhang mit Signaltransduktionswegen stehen und Proteine codieren, die u.a. die Lungenreifung steuern, wie FGF, Wnt, Shh, TGF-beta und BMP (Bresson et al., 2010).

Gegenstand weiterer Forschungen ist die Untersuchung von Polymorphismen, die Gene betreffen, welche Surfactantproteine codieren. Allerdings bezieht sich dabei keine Studie auf einen geschlechterspezifischen Unterschied. Marttila et al. (2003) zeigten, dass der Ile131Thr Polymorphismus von SP-B mit RDS assoziiert ist. Hallman et al. (2002) berichten ebenfalls über einen Zusammenhang zwischen genetischen Varianten der Surfactantproteine SP-A und SP-B und einer erhöhten Anfälligkeit für RDS. Die SP-A Allele $6A^2$ und $1A^0$ gelten als Hochrisiko-Allele, die Varianten $6A^3$ und $1A^1/1A^2$ dagegen als protektive Faktoren. Besonders gravierend wirkt sich das gleichzeitige Vorliegen der SP-A Hochrisikoallele und des SP-B Ile131Thr Genotyps auf den Schweregrad des RDS aus.

In Bezug auf unsere Ergebnisse ist demnach zu vermuten, dass ein oder mehrere Gene dafür verantwortlich sind, dass in unseren Ergebnissen der Trend zu beobachten ist, dass monozygote männliche Frühgeborene einen Nachteil in der Lungenentwicklung haben. Inwiefern genetische und umweltbezogene Faktoren Einfluss auf die Entstehung des RDS ausüben und auf welche Art und Weise sie sich gegenseitig beeinflussen, ist nicht vollständig geklärt. Eine geschlechterspezifische Untersuchung dieser Genvarianten könnte ein tieferes Verständnis für die bisher bekannten Grundlagen leisten.

4.5 Neue Therapieform: Surfactantgabe ohne Intubation - Outcome für spezielle Subgruppen sehr kleiner Frühgeborener

Bei der Untersuchung der neuen Therapieform „Surfactant ohne Intubation“ zeigen sich keine Unterschiede zwischen monozygoten und dizygoten Zwillingen bezüglich des Ereignisses, dass beide Kinder eines Paares Surfactant erhalten haben. Vermutlich ist die Methode so wenig invasiv, dass die Schwelle für den Einsatz von Surfactant ohne Intubation relativ niedrig ist, so dass eventuelle genetische Unterschiede in der Ausprägung des RDS für die Entscheidung zur Surfactanttherapie nicht mehr relevant sind.

In Bezug auf den Endpunkt Beatmung zeigt die Surfactantgabe ohne Intubation zwei wichtige Resultate: Im Gegensatz zu „nicht ELBW“ Kindern werden die „ELBW“ Kinder unter der neuen Therapieform deutlich weniger beatmet. Ebenso zeigen männliche Frühgeborene einen größeren Benefit von der neuen Methode der Surfactantgabe als weibliche. Damit schließt die Surfactantgabe ohne Intubation eine wichtige therapeutische Lücke für eine besonders gefährdete Patientengruppe: Sehr kleine männliche Frühgeborene mit einem hohen Risiko für ein nachteiliges Outcome.

Die neue Therapieform kombiniert die Vorteile der CPAP- und der Surfactant-Therapie und führt somit zu günstigen Bedingungen bei der Behandlung von sehr kleinen Frühgeborenen (Kribs, 2011). Den Vorteil der Surfactantgabe ohne Intubation gegenüber allen vorherigen Therapieverfahren haben Göpel et al. (2011) in Zusammenhang mit der AMV-Studie in tabellarischer Form zusammengefasst (Tabelle 11). In allen bisher publizierten Studien zeigt die neue Therapieform einen signifikanten Vorteil für das Outcome der Kinder.

Tabelle 11: Vergleich klinischer Outcomedaten verschiedener Studien zur Behandlung von RDS (nach Göpel et al., 2011)

Studie	AMV (26-28 SSW)		SUPPORT (26-27 SSW) *1		COIN (26-27 SSW)*2		CURAP (25-28 SSW)*3	
	Surfactant ohne Intubation (n=108)	CPAP mit Rescue Intubation (n=112)	CPAP mit Rescue Intubation (n=378)	Intubation (n=373)	CPAP mit Rescue Intubation (n=207)	Intubation (n=198)	CPAP mit Rescue Intubation (n=103)	Intubation, frühe Extubation (n=105)
Vergleich von Vorgehensweisen bei der Behandlung von RDS								
Geburtsgewicht (g; Mittelwert, Standardabweichung)	975 (244)	938 (205)	834(188)*	825(198)*	964(212)*	952(217)*	913(200)	967(221)
Surfactantbehandlung (%)	74%	65%	67%*	99%*	38%*	77%*	49%	100%
Mechanische Beatmung (%)	33%	73%	83%*	100%*	59%*	100%*	33%	100%
Dauer der mechanischen Beatmung (Tage; Median (IQP))	0 (0-3)	2 (0-5)	4 (0-15)	6 (2-21)	3(0-11)	4(1-14)	6(1-11)§	5(1-61)§
Pneumothorax (%)	4%	7%	6%	6%	9%*	3%*	1%	7%
Bronchopulmonale Dysplasie im Alter von 36 Wochen oder Tod (%)	14%	15%	38%	44%	25%	31%	21%	22%

*Daten gelten für alle Kinder der Studie (SUPPORT 24-27 SSW Gestationsalter, COIN 25-28 SSW); § in der CURAP Studie ist die Beatmungsdauer als Median für intubierte Kinder angegeben.

*1: Support Study Group off he Eunice Kennedy Shriver NICHD, N Engl Med J (2010)

*2: Morley et al., N Engl Med J (2008)

*3: Sandri et al., Pediatrics (2010)

Erstmalig beschrieben wurde die Methode 2007 an einem kleinen Kollektiv von 29 Kindern mit einem Gestationsalter von 23-27 SSW. Im Vergleich zur Kontrollgruppe, die mit CPAP und „Rescue“ Surfactantgabe behandelt wurde, wird von einer signifikant niedrigeren Mortalität, IVH- und Beatmungsrate berichtet. Die darauf folgende Studie (Kribs et al., 2008) bestätigte an einer größeren Kohorte, die mit der neuen Therapieform versorgt wurde (Interventionsgruppe n=196, Kontrollgruppe n=51 Kinder) die Vorteile und zeigte gleichzeitig, dass es keinerlei Nachteile bezüglich nichtpulmonaler Parameter gibt. Die jüngste Studie zur neuen Therapieform (AMV Studie) berichtet erstmals über eine randomisierte Kontrollgruppe. 108 Kinder wurden mit der Surfactantgabe ohne Intubation behandelt, 112 Kinder mit CPAP und „Rescue“ Surfactantgabe. Die Kinder der Versuchsgruppe zeigten signifikante Vorteile bezüglich der wichtigsten pulmonalen Parameter wie die Endpunkte „mechanische Beatmung während des gesamten Krankenhausaufenthaltes“ (46% vs. 73%), „mechanische Beatmung an Tag 2 und 3 postnatal“ (46% vs. 28%), sowie „Mittelwert der Tage mechanischer Beatmung“ (0 Tage vs. 2 Tage) und „Sauerstoffbedarf“ am 28. Lebenstag (30% vs. 45%) (Göpel et al., 2011).

Besonders interessant in Bezug auf unsere Ergebnisse ist die Multicenterstudie von 2010. Kribs et al. (2010) berichten von einem deutlichen Vorteil der Surfactantgabe ohne Intubation für das Outcome besonders kleiner Frühgeborener. Von insgesamt 1541 eingeschlossenen Kindern wurden 1222 mit der Standardmethode (Intubation und Surfactantgabe) und 319 Kinder mit der Surfactantgabe ohne Intubation behandelt. Obwohl die Kinder der Versuchsgruppe ein niedrigeres Geburtsgewicht (945 g vs. 1018 g) und Gestationsalter (27.3 vs. 27.9 Gestationswochen) hatten, war ihr pulmonales Outcome besser als das der Kinder der Kontrollgruppe. Die Häufigkeit von mechanischer Beatmung, BPD, Sauerstoffbedarf und Tod war signifikant niedriger. Dies macht deutlich, dass gerade die kleinsten, am meisten gefährdeten Kinder von der neuen Methode, insbesondere der Umgehung der Intubation, profitieren.

Unsere Daten in Bezug auf den Endpunkt Beatmung bestätigen diese Beobachtung und zeigen zudem einen vorher nicht bekannten Vorteil der Methode für männliche Frühgeborene. Da die neue Therapieform noch jung ist, liegen bisher keine weiteren Daten vor, die diese geschlechtsbedingte Tendenz überprüft haben. Sie kann aber durch die physiologisch verzögerte Lungenreifung bei männlichen Frühgeborenen, wie im vorangegangenen Abschnitt der Diskussion erläutert, erklärt werden. Die neue Methode scheint dazu fähig, dieses Defizit des männlichen Geschlechtes zu beheben. Um die an unserem relativ kleinen Kollektiv gemachte Beobachtung zu überprüfen, sollten an einem größeren Kollektiv weitere Studien folgen, die genauere Untersuchungen der geschlechterspezifischen Differenzen bei sehr kleinen Frühgeborenen zum Ziel haben.

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Grundlage dieser Arbeit ist die genetische Determination der Zygote bei gleichgeschlechtlichen Zwillingen. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass nur mit diesem Hintergrund gültige Aussagen über genetische Assoziationen getroffen werden können. Zudem erwies sich die DNA-Typisierung anhand von STR-Loci als zuverlässige, schnelle und praktikable Methode. Durch den Einsatz in folgenden Studien mit größeren Kohorten wird die Methode langfristig die Datenqualität populationsbezogener Auswertungen erhöhen und damit eine genauere prognostische Abschätzung der Mortalität und Langzeitmorbidity von mono- und dizygoten Zwillingen ermöglichen.

Auch wenn unsere Studie nur eine kleine Kohorte umfasst, gibt sie wichtige Informationen über Tendenzen in den unterschiedlichen Subgruppen. Es bleibt abzuwarten ob diese Trends sich bei der Analyse größerer Kohorten als signifikant herausstellen werden.

Insbesondere die Betrachtung der Beatmungshäufigkeit bei den unterschiedlichen Methoden der Surfactantapplikation in Bezug auf Zygote und Geschlecht könnte in weiteren Studien das Verständnis für die Physiologie des Frühgeborenen erweitern und klinische Konsequenzen haben.

Bei der Durchführung folgender Zwillingsstudien könnte es sinnvoll sein, eine zusätzliche Analyse von Subgruppen anhand des Gestationsalters vorzunehmen. Studien, die Kohorten unter diesem Kriterium betrachtet haben, geben den Hinweis, dass das Gestationsalter neben dem Geburtsgewicht Anhaltspunkt für wichtige Meilensteine in der Entwicklung des Feten ist und Einfluss auf das Outcome der Frühgeborenen hat (Yu et al., 1986; Kilpartick et al., 1996; Rettwitz-Volk, 2002; Garg et al., 2010; Papiernik et al., 2010). Auch die gezielte Untersuchung von Surfactant betreffenden Genen (z.B. dem Ile131Thr Polymorphismus) sollte mit unseren Ergebnissen als Grundlage geschlechterspezifisch analysiert werden.

5 Zusammenfassung

Frühgeborene Kinder sind einer Vielzahl an Risiken ausgesetzt, da noch nicht alle Organe und Funktionen ihres Körpers voll ausgereift sind. Die Unreife der Lunge und das damit verbundene Atemnotsyndrom (RDS: Respiratory Distress Syndrom) stellt dabei die größte Gefahr für sehr kleine Frühgeborene dar.

Ziel dieser Arbeit war es, einen Zusammenhang zwischen endogenen, genetischen und exogenen, umweltbedingten Faktoren auf die Entstehung von Krankheitsbildern bei sehr kleinen frühgeborenen Patienten zu untersuchen.

Dafür wurde von September 2003 bis Ende 2009 eine Anzahl von 3708 Kindern unter 1500g aus 28 neonatalen Intensivstationen in unsere Studie eingeschlossen. Anhand drei standardisierter Fragebögen wurden Daten zu den Umständen der Geburt, der Behandlung und dem Therapieverlauf der Kinder erhoben. Daneben wurden jeweils von Mutter und Kind DNA Proben (Nabelschnur und Mundschleimhautabstriche) gesammelt. Mittels molekulargenetischer Analysen wurde von 165 gleichgeschlechtlichen Zwillingspaaren unseres Kollektivs die Bestimmung der Zygote vorgenommen.

Die Ergebnisse unserer Studie verdeutlichen, dass die genetische Bestimmung der Zygote für eine valide Durchführung von Zwillingstudien essentielle Bedeutung hat: Ein genetischer Einfluss auf das Outcome sehr kleiner Frühgeborener konnte mehrfach nachgewiesen werden. Während beim direkten Vergleich der Outcomeparameter von monozygoten und dizygoten Zwillingen die zweieiigen Zwillinge unerwartet mit signifikanten Häufungen von typischen Erkrankungen Frühgeborener auffielen, zeigte die Analyse von Subgruppen hinsichtlich der Endpunkte Beatmung und Surfactanttherapie eine deutlich häufigere Anwendung von Surfactant bei monozygoten, männlichen Frühgeborenen und eine deutliche Senkung der Beatmungsrate bei männlichen, sehr kleinen (<1000g) Kindern im Rahmen der neuen Therapiemethode „Surfactant ohne Intubation“. Insbesondere die Ergebnisse bezüglich der Lungenparameter „Surfactantgabe“ und „Surfactantgabe ohne Intubation“ bestätigen unsere Hypothese, dass genetische Faktoren einen wichtigen Einfluss auf das Outcome von sehr kleinen Frühgeborenen haben.

Langfristig wird die genetische Bestimmung der Zygote gleichgeschlechtlicher Zwillingspaare die Datenqualität populationsbezogener Auswertungen erhöhen und damit eine genauere prognostische Abschätzung der Mortalität und Langzeitmorbidity von mono- und dizygoten Zwillingen ermöglichen können.

6 Literaturverzeichnis

Aly H, Massaro AN, Patel K, El-Mohandes AA.: Is it safer to intubate premature infants in the delivery room? *Pediatrics* 115, 1660-1665 (2005)

Bajoria R, Kingdom J: The case for routine determination of chorionicity and zygosity in multiple pregnancy. *Prenat Diagn* 17, 1207- 1225 (1997)

Benirschke K: Klassifikation und Plazentationsverhältnisse bei der Mehrlingsgravidität, *Der Gynäkologe* 31, 198-202, (1998)

Benirschke K: Multiple pregnancy. In: Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R: *Pathology of the human placenta*. 3. Aufl., 877-1000, Springer Science+Business Media. Inc, New York (2006)

Berggren E, Liljedahl M, Winbladh B, Andreasson B, Curstedt T, Robertson B, Schollin J: Pilot study of nebulized surfactant therapy for neonatal respiratory distress syndrome. *Acta Paediatr* 89, 460-464 (2000)

Blickstein I, Shinwell ES: Obstetric management of multiple pregnancies and births. In: Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh MC (Hrsg.): *Fanaroff and Martin`s neonatal- perinatal medicine: Diseases of the fetus and infant*, 9. Aufl., 343-351, Saunders Elsevier (2011)

Blickstein I, Reichman B, Lusk A, Shinwell ES: Plurality- dependent risk of severe intraventricular hemorrhage among very low birth weight infants and antepartum corticosteroid treatment. *Am J Obstet Gynecol* 194, 1329-33 (2006)

Blondel B, Kogan MD, Alexander GR, Dattani N, Kramer MS, Macfarlane A, Wen SW: The impact of the increasing number of multiple birth on the rates of preterm birth and low birthweight: An international study. *Am J Public Health* 92,1323- 1330 (2002)

Bornstein E, Proudfit CL, Keeler SM: Prematurity in twin pregnancies. *Minerva Ginecol* 61, 113-126 (2009)

Bresson E, Seaborn T, Côté M, Cormier G, Provost PR, Piedboeuf B, Tremblay Y: Gene expression profile of androgen modulated genes in the murine fetal developing lung. *Reprod Biol Endocrinol* 8, keine Seitenangaben verfügbar (2010).

Bridges JP, Xu Y, Na CL, Wong HR, Weaver TE: Adaption and increased susceptibility to infection associated with constitutive expression of misfolded SP-C. *J Cell Biol* 172, 395-407 (2006)

Brimacombe J, Gandini D, Keller C: The laryngeal mask airway for administration of surfactant in two neonates with respiratory distress syndrome. *Paediatr Anaesth* 14, 188-190 (2004)

Cameron AH: The Birmingham twin survey. *Proc R Soc Med* 61, 229-234 (1968)

Carey MA, Card JW, Voltz JW, Germolec DR, Korach KS, Zeldin DC: The impact of sex and sex hormones on lung physiology and disease: lesson from animal studies. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293, 272-278 (2007)

Carroll SG, Tyfield L, Reeve L, Porter H, Soothill P, Kyle PM: Is zygosity or chorionicity the main determinant of fetal outcome in twin pregnancies? *Am J Obstet Gynecol* 193, 757-61 (2005)

Chen CP, Chern SR, Wang W.: Rapid determination of zygosity and common aneuploidies of amniotic fluid cells using quantitative fluorescent polymerase chain reaction following genetic amniocentesis in multiple pregnancies. *Hum Reprod* 15, 929-934 (2000)

Chen M, Citil A, McCabe F, Leicht KM, Fiascone J, Dammann CE, Dammann O: Infection, oxygen, and immaturity: interacting risk factors for retinopathy of prematurity. *Neonatology* 99, 125-32 (2011)

Christou H, **Brodsky** D: Lung injury and bronchopulmonary dysplasia in newborn infants. *J Intensive Care Med* 20, 76-87 (2005)

Clark H, **Reid** K: The potential of recombinant surfactant protein D therapy to reduce inflammation in neonatal chronic lung disease, cystic fibrosis, and emphysema. *Arch Dis Child* 88, 981-984 (2003)

Derom C, Bakker E, Vlietinck R, Derom R, Van den Berghe H, Thiery M, Pearson P: Zygosity determination in newborn twins using DNA variants. *J Med Genet* 22, 279- 282 (1985)

Diamond JM: Variation in human testis size: ethnic differences. *Nature* 320, 488-489 (1986)

Dubé J, Dodds L, Armson BA: Does chorionicity or zygosity predict adverse perinatal outcomes in twins? *Am J Obstet Gynecol.* 186, 579-83 (2002)

Dudenhausen JW, **Maier** RF: Perinatal Problems in multiple births. *Dtsch Arztebl Int* 107, 663-668 (2010)

Ehsanipoor RM, Arora N, Lagrew DC, Wing DA, Chung JH: Twin versus singleton pregnancies complicated by preterm premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med*, [Epub ahead of print] (2011)

Elsmén E, Hansen Pupp I, Hellström-Westas L: Preterm male infant need more initial respiratory and circulatory support than female infants. *Acta Paediatr* 93, 529-533 (2004)

ESHRE Capri Workshop Group: Multiple gestation pregnancy. *Hum Reprod* 15, 1856-1864 (2000)

European Perinatal Health Report (2008)

<http://www.europeristat.com/bm.doc/european-perinatal-health-report.pdf>

(Tag des Zugriffs: 14.11.2011)

Farstad T, Bratlid D, Medbø S, Markestad T: Bronchopulmonary dysplasia- prevalence, severity and predictive factors in a national cohort of extremely premature infants. *Acta Paediatr* 100, 53-58 (2011)

Fehrenbach H: Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir Res* 2, 33-46, (2001)

Fellman J, Eriksson AW: Statistical analyses of Hellin's law. *Twin Res Hum Genet* 12, 191-200 (2009)

Finberg HJ: The "twin peak" sign: reliable evidence of dichorionic twinning. *J Ultrasound Med* 11, 571- 577 (1992)

Finer N: To intubate or not - that is the question: continuous positive airway pressure versus surfactant and extremely low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 91, 392-394 (2006)

Fleisher B, Kulovich MV, Hallman M, Gluck L: Lung profile: sex differences in normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 66, 327-330 (1985)

Friedman SA, Schiff E, Kao L, Kuint J, Sibai BM: Do twins mature earlier than singletons? Results from a matched cohort study. *Am J Obstet Gynecol* 176, 1193-9 (1997)

Garg P, Abdel-Latif ME, Bolisetty S, Bajuk B, Vincent T, Lui K: Perinatal characteristics and outcome of preterm singleton, twin and triplet infants in NSW and the ACT, Australia (1994-2005). *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 95, 20-24 (2010)

Garite TJ, Clark RH, Elliott JP, Thorp JA: Twins and triplets: the effect of plurality and growth on neonatal outcome compared with singleton infants. *Am J Obstet Gynecol*; Sep; 191, 700-7 (2004)

Göpel W, Kribs A, Ziegler A, Laux R, Hoehn T, Wieg C, Siegel J, Avenarius S, von der Wense A, Vochem M, Groneck P, Weller U, Möller J, Härtel C, Haller S, Roth B, Herting E: Avoidance of mechanical ventilation by surfactant treatment of spontaneously breathing preterm infants (AMV): an open-label, randomised, controlled trial. *Lancet* 378, 1627-1634 (2011)

Hack KE, Derks JB, Elias SG, Franx A, Roos EJ, Voerman SK, Bode CL, Koopman- Esseboom C, Visser GH: Increased perinatal mortality and morbidity in monochorionic versus dichorionic twin pregnancies: clinical implications of a large Dutch cohort study. *Br J Obstet Gynaecol* 115, 58-67 (2008)

Hall JG: Twinning. *Lancet* 362, 735-743 (2003).

Halliday, HL: Surfactants: past, present and future. *J Perinatol* 28, 47-56 (2008)

Hallman M, Haataja R, Marttila R: Surfactant proteins and genetic predisposition to respiratory distress syndrome. *Semin Perinatol* 26, 450-60 (2002)

Hanley K, Rassner U, Jiang Y, Vansomphone D, Crumrine D, Komüves L, Elias PM, Feingold KR, Williams ML: Hormonal basis for the gender difference in epidermal barrier formation in the fetal rat. *J Clin Invest* 97, 2576-2584 (1996)

Hayes EJ, Paul D, Ness A, Mackley A, Berghella V: very low birthweight neonates: Do outcome differ in multiple compared with singleton gestations? *Am J Perinatol* 24, 373-376 (2007)

Hertzberg BS, Kurtz AB, Choi HY, Kaczmarczyk JM, Warren W, Wapner RJ, Needleman L, Baltarowich OH, Pasto ME, Rifkin MD: Significance of membrane thickness in the sonographic evaluation of twin gestations. *Am J Roentgenol* 148, 151-153 (1987)

Hill AV, **Jeffreys** AJ: Use of minisatellite DNA probes for determination of twin zygosity at birth. *Lancet* 2, 1394-1395 (1985)

Hohlfeld JM, Erpenbeck VJ, Krug N: Surfactant Proteins SP-A and SP-D as Modulator of the allergic Inflammation in Asthma. *Pathobiology* 70, 287-292, (2002-03)

Ingmarsson I: Gender aspects of preterm birth. *BJOG* 110, 34-38 (2003)

Kattwinkel J, Robinson M, Bloom BT, Delmore P, Ferguson JE: Technique for intrapartum administration of surfactant without requirement for an endotracheal tube. *J Perinatol* 24, 360-365 (2004)

Kilpatrick SJ, Jackson R, Croughan-Minihane MS: Perinatal mortality in twins and singletons matched for gestational age at delivery at $>$ or $=$ 30 weeks. *Am J Obstet Gynecol* 174, 66-71 (1996)

Kirkby S, Genen L, Turenne W, Dysart K: Outcomes and milestone achievement differences for very low- birth- weight multiples compared with singleton infants. *Am J Perinatol* 27, 439-44 (2010)

Kribs A, Pillekamp F, Hünseler C, Vierzig A, Roth B: Early administration of surfactant in spontaneous breathing with nCPAP: feasibility and outcome in extremely premature infants (postmenstrual age \leq 27 weeks). *Pediatr Anaesth* 17: 364-369 (2007)

Kribs A, Vierzig A, Hünseler C, Eifinger F, Welzing L, Stützer H, Roth B: Early surfactant in spontaneously breathing with nCPAP in ELBW infants-a single centre four year experience. *Acta Paediatr* 97, 293-8 (2008)

Kribs A, Härtel C, Kattner E, Vochem M, Küster H, Möller J, Müller D, Segerer H, Wieg C, Gebauer C, Nikischin W, Wense A, Herting E, Roth B, Göpel W: Surfactant without intubation in preterm infants with respiratory distress: first multi-center data. *Klin Padiatr* 222,13-7 (2010)

Kribs A: How best to administer surfactant to VLBW infants? *Arch Dis Child Fetal Neonatal* Ed 96, 238-240 (2011)

Lee KH, Hwang SJ, Kim SH, Lee SH, Yu DK, Hwang JH, Choi CW, Shim JW, Chang YS, Park WS: Comparison of mortality and morbidity in multiple versus singleton very low birth weight infants in a neonatal intensive care unit. *J Korean Med Sci* 18, 779-82 (2003)

Leveno KJ, Quirk JG, Whalley PJ, Herbert WN, Trubey R: Fetal lung maturation in twin gestation. *Am J Obstet Gynecol* 148, 405-411 (1984)

Linder N, Haskin O, Levit O, Klinger G, Prince T, Naor N, Turner P, Karmazyn B, Sirota L: Risk factors for interventricular hemorrhage in very low birth weight premature infants: a retrospective case- control study. *Pediatrics* 111, e590-595 (2003)

Lundstroem A: Tooth morphology as a basis for distinguishing monozygotic and dizygotic twins. *Am J Hum Genet* 15, 34-43 (1963)

- Marshall JR:** Ovulation induction. *Obstet Gynecol* 35, 963–970 (1970)
- Martin JA,** Hamilton BE, Sutton PD, Ventura SJ, Menacker F, Kirmeyer S, Mathews TJ, Division of Vital Statistic: Births: Final data for 2006. *National vital statistics report* (2009). http://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr57/nvsr57_07.pdf (Tag des Zugriffs 10.11.2011)
- Martin JA,** Hamilton BE, Osterman MJ: Three decades of twin births in the United States, 1980-2009. *NCHS Data Brief* 80, 1-8 (2012)
- Marttila R,** Kaprio J, Hallman M: Respiratory distress syndrome in twin infants compared with singletons. *Am J Obstet Gynecol* 191, 271–276 (2004)
- Marttila R,** Haataja R, Rämetsä M, Löfgren J, Hallman M: Surfactant protein B polymorphism and respiratory distress syndrome in premature twins. *Hum Genet* 112, 18–23 (2003)
- McCracken AA,** Daly PA, Zolnick MR, Clark AM: Twins and Q-banded chromosome polymorphisms. *Hum Genet* 45, 253–258 (1978)
- McGregor JA,** Leff M, Orleans M, Baron A: Fetal gender differences in preterm birth: Findings in a north American Cohort. *Am J Perinatol* 9, 43-48 (1992)
- Mizrahi M,** Furman B, Shoham-Vardi I, Vardi H, Maymon E, Mazor M: Perinatal outcome and peripartum complications in preterm singleton and twin deliveries: a comparative study. *Eur J Obstet Gynecol and Reprod Biol* 87, 55-61 (1999)
- Morley CJ,** Davis PG, Doyle LW, Brion LP, Hascoet JM, Carlin JB: Nasal CPAP or Intubation at Birth for Very Preterm Infants. *N Engl J Med* 358, 700-708 (2008)
- Myles TD,** Espinoza R, Meyer W, Bieniarz A: Preterm premature rupture of membranes: comparison between twin and singleton gestations. *J Matern Fetal Med* 6, 159-163 (1997)
- Myriantopoulos NC,** Churchill JA, Baszynski AJ: Respiratory distress syndrome in twins. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)* 20, 199-204 (1971)
- Newman HH:** Palm-print patterns in twins: on the use of dermatoglyphics as an aid in the diagnosis of monozygotic and dizygotic twins. *J Hered* 22, 41-49 (1931)
- Nielsen HC,** Harvey-Wilkes K, MacKinnon B, Hung S: Neonatal outcome of very premature infants from multiple and singleton gestations. *Am J Obstet Gynecol* 177, 653-9 (1997)

Nogee LM, Garnier G, Dietz HC, Singer L, Murphy AM, de Mello DE, Colten HR: A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. *J Clin Invest* 93, 1860-1863 (1994)

Norton ME, D'Alton ME, Bianchi DW: Molecular zygosity studies aid in the management of discordant multiple gestations. *J Perinatol* 17, 202-7 (1997)

Papiernik E, Zeitlin J, Delmas D, Blondel B, Künzel W, Cuttini M, Weber T, Petrou S, Gortner L, Kollée L, Draper ES: Differences in outcome between twins and singletons born very preterm: results from a population-based European cohort. *Hum Reprod* 25, 1035- 1043 (2010)

Parmigiani S, **Solari** E: The era of pulmonary surfactant from Laplace to nowadays. *Acta Biomed* 74, 69-75, (2003)

Pattle RE: Properties, function and origin of the alveolar lining layer. *Nature* 175, 1125–1126 (1955)

Petit N, Cammu H, Martens G, Papiernik E: Perinatal Outcome of twins compared to singletons of the same gestational age: a case-control study. *Twin Res Hum Genet* 14, 88-93 (2011)

Picaud JC, Chailionis S, Combes C, Mercier G, Dechaud H, Cambonie G: Neonatal mortality and morbidity in preterm infants born from assisted reproductive technologies. *Acta Paediatr* 101, 846-851 (2012).

Qiu X, Lee SK, Tan K, Piedboeuf B, Canning R; Canadian Neonatal Network: Comparison of singleton and multiple-birth outcomes of infants born at or before 32 weeks of gestation. *Obstet Gynecol* 111, 365-71 (2008)

Reed T, Sprague FR, Kang KW, Nance WE, Christian JC: Genetic analysis of dermatoglyphic patterns in twins. *Hum Hered* 25, 263–275 (1975)

Resch B, Resch E, Freidl T, Maurer U, Haas J, Müller W: Preterm twin and triplet pregnancies are at increased risk for the development of cystic periventricular leukomalacia. *Eur J Paediatr Neurol*. 2012 Jul 11. [Epub ahead of print]

Rettwitz-Volk W: Mortalität und Morbidität von Frühgeborenen- eine Zusammenfassung der deutschen Neonatalerhebungen 2001. *Z Geburtshilfe Neonatol* 207, 143-147 (2003)

Romero R, Shamma F, Avila C, Jimenez C, Callahan R, Nores J, Mazor M, Brekus CA, Hobbins JC: Infection and labor.VI. Prevalence, microbiology and clinical significance of intraamniotic infection in twin gestations with preterm labor. *Am J Obst Gynecol* 163, 757-61 (1990)

Sadler TW: Die Entwicklung der Eihäute und der Plazenta. In: *Medizinische Embryologie*. 10. Aufl., 104-125, Thieme, Stuttgart (2003).

Sandri F, Plavka R, Ancora G, Simeoni U, Stranak Z, Martinelli S, Mosca F, Nona J, Thomson M, Verder H, Fabbri L, Halliday H: Prophylactic or early selective surfactant combined with nCPAP in very preterm infants. *Pediatrics* 125, 1402-1409 (2010)

Selvin S: Twin zygosity diagnosis by blood group antigens. *Hum Hered* 20, 540–548 (1970)

Simard M, Provost PR, Tremblay Y: Sexually dimorphic gene expression that overlaps maturation of type II pneumocytes in fetal mouse lungs. *Reprod Biol Endocrinol* 4, keine Seitenangaben verfügbar (2006)

Snijder MJ, **Wladimiroff JW**: Fetal biometry and outcome in monochorionic vs. dichorionic twin pregnancies; a retrospective cross- sectional matched- control study. *Ultrasound Med Biol* 24, 197-201 (1998)

Speer CP: Neonatologie. In :Koletzko B (Hrsg): *Kinderheilkunde und Jugendmedizin*. 12. Aufl., 49- 116, Springer Verlag, Berlin 2004.

Stenhouse E, Hardwick C, Maharaj S, Webb J, Kelly T, Mackenzie FM.: Chorionicity determination in twin pregnancies: how accurate are we? *Ultrasound Obstet Gynecol* 19, 350-352 (2002)

Stewart JE, Allred EN, Collins M, Abbott J, Leviton A, Paneth N, Reuss ML, Susser M, Hegyi T, Hiatt M, Sanocka U, Shahrivar F, Van Marter LJ, Banogan P, Genest D, Heller D, Shen-Schwarz S, Dammann O, Kuban KC, Pagano M: Risk of cranial ultrasound abnormalities in very- low-birth-weight infants conceived with assisted reproductive techniques. *J Perinatol* 22, 37-45 (2002)

SUPPORT Study Group of the Eunice Kennedy Shriver NICHD Neonatal Research Network, Finer NN, Carlo WA, Walsh MC, Rich W, Gantz MG, Lupton AR, Yoder BA, Faix RG, Das A, Poole WK, Donovan EF, Newman NS, Ambalavanan N, Frantz ID 3rd, Buchter S, Sánchez PJ, Kennedy KA, Laroia N, Poindexter BB, Cotten CM, Van Meurs KP, Duara S, Narendran V, Sood BG, O'Shea TM, Bell EF, Bhandari V, Watterberg KL, Higgins RD: Early CPAP versus surfactant in extremely preterm infants. *N Engl J Med* 362, 1970-1979 (2010)

Trevisanuto D, Grazzina N, Ferrarese P, Micaglio M, Verghese C, Zanardo V: Laryngeal mask airway used as a delivery conduit for the administration of surfactant to preterm infants with respiratory distress syndrome. *Biol Neonate* 87, 217-220 (2005)

Tyson JE, Parikh NA, Langer J, Green C, Higgins RD: intensive care for extreme prematurity- moving beyond gestational age. *N Engl J Med* 358, 1672-81 (2008)

Van Marter LJ, Allred EN, Pagano M, Sanocka U, Parad R, Moore M, Susser M, Paneth N, Leviton A: Do clinical markers of barotrauma and oxygen toxicity explain interhospital variation in rates of chronic lung disease? The Neonatology Committee for the Developmental Network. *Pediatrics* 105, 1194-201 (2000)

Van Marter LJ, Dammann O, Allred EN, Leviton A, Pagano M, Moore M, Martin C: Chorioamnionitis, mechanical ventilation, and postnatal sepsis as modulators of chronic lung disease in preterm infants. *J Pediatr* 140, 171-176 (2002)

Van Sonderen L, Halsema EF, Spiering EJ, Koppe JG: Genetic influences in respiratory distress syndrome: a twin study. *Semin Perinatol* 26, 447-449 (2002)

Verder H, Albertsen P, Ebbesen F, Greisen G, Robertson B, Bertelsen A, Agertoft L, Djernes B, Nathan E, Reinholdt J: Nasal continuous positive airway pressure and early surfactant therapy for respiratory distress syndrome in newborns of less than 30 weeks' gestation. *Pediatrics* 103, 24-29 (1999)

Verder H, Bohlin K, Kamper J, Lindwall R, Jonsson B: Nasal CPAP and surfactant for treatment of respiratory distress syndrome and prevention of bronchopulmonary dysplasia. *Acta Paediatr* 98, 1400-1408 (2009)

Von Neergaard K: Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik. Die Retraktionskraft der Lunge, abhängig von der Oberflächenspannung in den Alveolen. *Z Ges Exp Med* 66, 373-394 (1929)

Von Wurmb-Schwark N, Schwark T, Christiansen L, Lorenz D, Oehmichen M: The use of different multiplex PCRs for twin zygosity determination and its application in forensic trace analysis. *Legal Med (Tokyo)* 6, 125-130 (2004)

Walther FJ, Waring AJ, Sherman MA, Zasadzinski JA, Gordon LM: Hydrophobic surfactant proteins and their analogues. *Neonatology* 91, 303-310 (2007)

Watterberg KL, Demers LM, Scott SM, Murphy S: Chorioamnionitis and early lung inflammation in infants whom bronchopulmonary dysplasia develops. *Pediatrics* 97, 210- 215 (1996)

Whitsett JA: Surfactant proteins in innate host defense of the lung. *Biol Neonate* 88, 175-180, (2005)

Yang MJ, Tzeng CH, Tseng JY, Huang CY: Determination of twin zygosity using a commercially available STR analysis of 15 unlinked loci and the gender-determining marker amelogenin- a preliminary report. *Hum Reprod* 21, 2175-2179 (2006)

Yu VY, Loke HL, Bajuk B, Szymonowicz W, Orgill AA, Astbury J: Prognosis for infants born at 23 to 28 weeks` gestation. *BMJ* 293, 1200-1203 (1986)

7 Anhang

7.1 Anhang 1: Fragebögen

Datenbogen bitte nach Entlassung des Kindes ausfüllen und zusammen mit je zwei Mundschleimhautabstrichen von Mutter und Kind an die Studienzentrale (Klinik für Kinder und Jugendmedizin, Prof. Dr. W. Göpel, 23538 Lübeck) senden.



Version 3: Sept. 2010
Klinik:HL

„Deutsches Frühgeborenen-Netzwerk“

Dokumentationsbogen bei Einschluss in die Studie (1/3)

Name des Kindes
 Geburtstag ____ . ____ . ____
 Nabelschnurrest eingefroren? ja nein

1. Geschlecht

- weiblich
 männlich

2. Mehrling

- nein ja

Mehrling Nr.: ____ von ____

Bei Zwillingen:

- dichorial-diamnial monochorial-diamnial
 monochorial-monoamnial unklar

Fetofetales Transfusionsyndrom?

- nein ja ja + Lasertherapie

3. Geburt

Blasensprung vor Wehen? nein ja

Geburtsmodus: spontan Sectio
 Notsectio

APGAR 5 und 10 Minuten: ____ / ____

Nabelarterien-ph: ____

Nabelarterien BE: ____

4. Geburtsgewicht und Gestationsalter

_____ Gramm | Err. Geburtst.: ____ . ____ . ____

Gestationsalter: ____ Wochen + ____ Tage

5. „Inborn“

Geburt in eigener Klinik?

- ja nein
 ↓
 Aufnahme datum ____ . ____ . ____

Geburt in:

- externer Geburtsklinik
 außerklinischer Geburtseinrichtung
 Zuhause/Transport,
 nicht bekannt

6. Lungenreifebehandlung vor der Geburt

- nein ja
 Betamethason
 Dexamethason

7. Tokolysebehandlung vor der Geburt

- nein ja
 Magnesium intravenös
 Fenoterol (Partusisten®)
 Atosiban (Tractotile®)
 Nifedipin (Adalat®)
 anderes Medik.: _____

8. Antenatale Antibiotische Therapie

- nein ja
 Cephalosporine
 Metronidazol (Clont®)
 Ampicillin und andere Penicilline
 Imipenem/Meropenem
 sonstige _____

9. Ursache der zu frühen Geburt

- unhemmbare Wehen
 V.a. Amnioninfektionssyndrom
 EPH-Gestose
 HELLP
 pathologisches CTG
 Wachstumsretardierung und pathologische Doppler
 Placentalösung
 sonstige _____

10. Herkunftsland der Mutter

- Deutschland
 übriges Europa einschl. Russland
 Naher Osten einschl. Türkei und Nordafrika
 Asien
 Afrika
 sonstige _____

11. Alter der Mutter

_____ Jahre

12. Vorausgegangene Geburten

- nein ja
 wenn ja:
 Frühgeburten (vor der 37+0 SSW)?
 nein ja

Hiermit bestätige ich die Richtigkeit der Angaben:

Name / Unterschrift (dokum. Arzt / Ärztin)

Datenbogen bitte nach Entlassung des Kindes ausfüllen und an die Studienzentrale (Klinik für Kinder und Jugendmedizin, Prof. Dr. W. Göpel, 23538 Lübeck) senden.



Version 3: Sept. 2010
Klinik:HL

„Deutsches Frühgeborenen-Netzwerk“

Dokumentationsbogen Behandlung (2/3)

Name des Kindes
Geburtstag
Name der Mutter
Straße
PLZ Wohnort

1. Prophylaktische Medikamente:

- Vitamin K: nein ja → oral i.m. i.v. s.c.
 Teicoplanin/Vanco zur Sepsis-Prophylaxe
 Fluconazol zur Pilzsepsis-Prophylaxe
 Indomethacin zur Prophylaxe der IVH
 Erythropoetin zur Anämie-Prophylaxe
 _____ zur Prophylaxe von _____

2. Antibiotische Therapie nein ja

- Ampii/Amoxicillin Erythromycin
 Gentamicin Mezlocillin
 Tobramycin Meropenem
 Cefotaxim Imipenem (Zienam®)
 Vancomycin Metronidazol (Clont®)

3. Niedrigster MAD innerhalb der ersten 24h

_____ mm Hg (Manschette Arterie)

4. Katecholamintherapie nein ja

- Dopamin Dobutamin
 Noradrenalin Adrenalin
innerhalb der ersten 24h? nein ja

5. Analgetika und Sedativa nein ja

- Paracetamol Midazolam Piritramid
 Morphin Fentanyl Sulfentanil
 Thiopental Phenobarbital Propofol
 Pentobarbital Chloralhydrat

6. Surfactant nein ja

falls ja, wie oft: 1 x 2 x 3 x _____ (n x)

Surfactantgabe ohne Intubation? ja nein

7. Diuretika nein ja

- Furosemid (Lasix®) Hydrochlorothiazid
 Spironolacton (Aldactone®)

8. Inhalative Medikamente nein ja

- Salbutamol Budesonid Atrovent Pulmicort
 Furosemid Sultanol Flutide Antra
 NO andere: _____

9. Transfusionen

- Blut: keine 1 2 3 ____ (n)
 FFP: keine 1 2 3 ____ (n)
 TK: keine 1 2 3 ____ (n)

10. Atemanalept. Medikamente nein ja

- Coffein Theophyllin Doxapram

11. Sonstige Medikamente nein ja

- Insulin Vitamine (außer Vit. D)
 Eisen Zink (z.B. Unizink®)
 Indomethacin Ibuprofen
 Dexamethason Prednisolon
 Hydrocortison Acetylcystein (ACC)
 Ursodesoxycholsäure (Ursofalk®)
 Natriumbicarbonat

12. Probiotika nein ja

- Lactobacillus + Bifidobacterium (z.B. Infloran®)
 Lactobacillus GG (z.B. Infectopharm LGG®)
 E-coli (z.B. Mutaflor®)
 andere: _____

13. Impfungen (stationär) nein ja

- 6-fach-Impfstoff (TDP; HiB, IPV, HB)
 Pneumokokken-Konjugat
 RSV passiv (Palivizumab)
 andere Impfungen oder Immunglobuline:

14. Medikamente wg. NW abgesetzt? nein ja

wenn ja: _____ wg. _____

15. Zentral venöse Katheter nein ja

- falls ja, Art Katheter: ZVK NVK
 Komplikationen: _____

16. Arterielle Katheter: nein ja

- Nabel periphere Arterienkatheter
Extremitätennekrosen? nein ja

17. Nahrungsaufbau

Beginn am: _____, Lebenstag
 Vollständig oral (150 ml/kg) am: _____, Lebenstag

Anzahl der Tage mit iv-Zugang: Tage

Hiermit bestätige ich die Richtigkeit der Angaben:

Name / Unterschrift (dokum. Arzt / Ärztin)

Datenbogen bitte nach Entlassung des Kindes ausfüllen und an die Studienzentrale (Klinik für Kinder und Jugendmedizin, Prof. Dr. W. Göpel, 23538 Lübeck) senden.



Version 3: Sept. 2010
Klinik:HL

„Deutsches Frühgeborenen-Netzwerk“

Dokumentationsbogen Verlauf (3/3)

Name des Kindes
Geburtsdag

1. Gestationsalter:

errechneter Geburtstermin:
Gestationsalter: Wochen + Tage

2. Aufnahme

Körpertemperatur bei Aufnahme: °C
Gewicht bei Aufnahme: Gramm
Länge: cm
Kopfumfang: cm

3. CRIB-Score (erste 12h)

Max. Basendefizit: - Min. O₂: Max. O₂:
angeborene Fehlbildungen:
 keine nicht lebensbedrohlich
 akut lebensbedrohlich letal

4. Sauerstoffzufuhr

nein ja, wenn ja:
Beginn:
endgültige Beendigung:

Sauerstoffbedarf bei Entlassung? ja nein

5. Beatmung und CPAP

nein
 CPAP
 CPAP mit Beatmungshüben (nasal/pharyngeal)
 tracheale Beatmung

Falls tracheale Beatmung:

1. Beatmung vom bis
2. Beatmung vom bis
3. Beatmung vom bis

Weitere Beatmungen am Rand notieren.

endg. Beendigung jegl. Atemhilfe
(CPAP od. Beatmg.):
Beatmung bei Entlassung?: ja nein

6. Pneumothorax mit Thoraxdrainage:

nein ja: am Lebenstag
- unter trachealer Beatmung nein ja
- unter CPAP nein ja
- unter Spontanatmung nein ja

7. Sepsis/SIRS (Kriterien nach NEO-KISS)

nein ja,
Beginn innerhalb 72h?: nein ja
Erreger in Blutkultur: nein ja

	Erreger lt. Katalog	kein Erreg.-nachw.	Datum Nachweis
1. Sepsis		<input type="checkbox"/>	
2. Sepsis		<input type="checkbox"/>	
3. Sepsis		<input type="checkbox"/>	

Erregerkatalog:

kein Keimnachweis.....	00	
Enterokokken.....	ENT	Serratia.....
Enterobacter.....	ENB	Listeria mon.....
Pseudomonas aeruginosa.....	PAE	Candida.....
Staphyl. epidermidis.....	KNS	Strep. Gruppe B.....
Staphyl. aureus.....	SAU	
Staphyl. aureus Oxacillin resistant.....	MRSA	
E. coli ESBL bildend.....	ESBL_ECO	E. coli.....
Klebsiella ESBL bildend.....	ESBL_KLE	Klebsiella.....
E. faecium/E. faecalis Vancomycin resistant.....	VRE	

Andere Sepsiserreger:

8. Pneumonie/NEC (Kriterien nach NEO-KISS)

Pneumonie: nein vor 72h nach 72h
NEC II/III (auch ohne OP): nein ja

9. Schädelsonogramm

Sono/MRT durchgeführt? nein ja
IVH: nein ja:
 Grad I Grad II Grad III Grad IV
Zystische perivent. Leukomalazie (PVL) nein ja

10. Ophthalmologische Untersuchung

nein ja:
max. ROP - Stadium:

11. apparatives Hörscreening

nein ja:
 unauffällig auffällig

12. Operationen

	nein	ja	Ort der Operation				
			Tag der OP		eigene Klinik		in and. Klinik
			Datum	im OP	auf Station		
PDA-OP	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
NEC-OP	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
FIP-OP	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
ROP-OP	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
VP-Shunt	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Herniotomie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sonst. OPs?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

(wenn ja) OP-Art:

13. Untersuchung 35+0 - 36+6 Wochen p.m.:

nein ja:
Gewicht bei Untersuchg.: Gramm
Länge: cm
Kopfumfang: cm
Datum der Untersuchung:
BPD: nein
 moderat (O₂ < 30%)
 schwer (O₂ > 30%, CPAP, Beatmung)

14. Entlassung:

Gewicht bei Entlassung: Gramm
Länge: cm
Kopfumfang: cm

Aufenthalt beendet am:

Nach Hause entlassen
 Endgültige Verlegung in andere Klinik, falls ja
Grund: (z.B. OP wg.)
 Tod, wenn ja: Ursache:

Hiermit bestätige ich die Richtigkeit der Angaben:

Name / Unterschrift (dokum. Arzt / Ärztin)

7.2 Anhang 2: Einverständniserklärung

Studie „*Deutsches Frühgeborenen-Netzwerk (German Neonatal Network, GNN)*“

Einverständniserklärung

Hiermit erkläre/n ich/wir mein/unser Einverständnis zur Teilnahme meines(r)/unseres(r) Kindes(r)

_____ geb. am _____

an der Studie „*Deutsches Frühgeborenen-Netzwerk (German Neonatal Network)*“

Ich habe die schriftliche Patienteninformation zur oben genannten Studie erhalten, gelesen und verstanden. Ich wurde ausführlich – mündlich und schriftlich – über das Ziel und den Verlauf der Studie aufgeklärt.

Ich wurde darauf hingewiesen, dass die Teilnahme meines Kindes freiwillig ist und dass ich das Recht habe, diese jederzeit ohne Angabe von Gründen zu beenden, ohne das mir oder meinem Kind dadurch Nachteile entstehen.

Ich bin darüber aufgeklärt und einverstanden, dass die klinischen Verlaufsdaten meines Kindes und meine Anschrift an die Studienzentrale (Kinderklinik der Universität Lübeck) weitergeleitet werden und dass meine Anschriftendaten (z.B. im Fall eines Wohnortwechsels) mit der mein Kind behandelnden Klinik oder dem Einwohnermelderegister abgeglichen werden.

Ich bin darüber informiert, dass die entnommenen Proben ausschließlich in pseudonymisierter bzw. anonymisierter Form zur Erforschung von Einflussfaktoren für Erkrankungen des Frühgeborenen und Frühgeburtlichkeit genutzt werden und dass eine Befundmitteilung der genetischen Daten weder an mich noch an die mein Kind behandelnden Ärzte erfolgen kann.

Ich/wir hatte/n Gelegenheit, alle meine/unsere Fragen zu stellen, diese wurden zufriedenstellend und vollständig beantwortet.

Ort, Datum

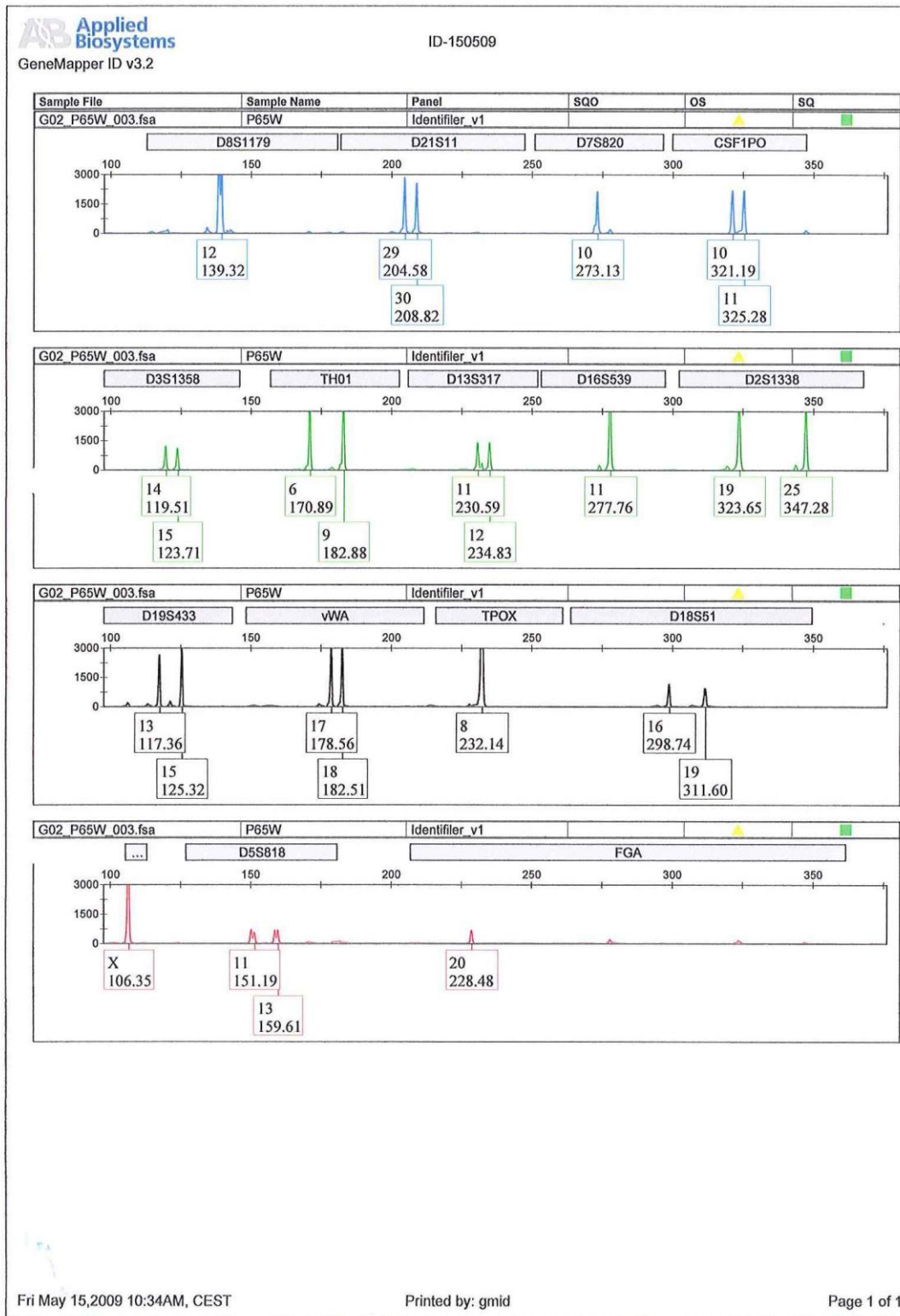
Unterschrift des/der Erziehungsberechtigten

Ort, Datum

Aufklärender Arzt/Ärztin (Name)

Aufklärender Arzt/Ärztin (Unterschrift)

7.3 Anhang 3: Ausdruck der DNA- Typisierung anhand von STR-Loci



8 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Professor Herting bedanken in seinem Institut für Kinder- und Jugendmedizin promovieren zu dürfen. Damit ist für mich ein großer Wunsch in Erfüllung gegangen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Professor Göpel für die Bereitstellung des Themas, seine Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten, seine Ratschläge und Hilfestellungen sowie für seine großartige Begeisterungsfähigkeit, die mich immer wieder motiviert und angesteckt hat. Die Zeit als wissenschaftliche Hilfskraft in seinem GNN Projekt habe ich als sehr schön in Erinnerung, was nicht zuletzt an dem durch ihn geschaffenen tollen Arbeitsklima lag.

Mein weiterer Dank gilt den Mitarbeiterinnen des GNN Projektes, ihrer Herzlichkeit und Unterstützung. Ich danke Sabine Ziesenitz und Anja Sewe für ihre Arbeit im Labor und die Kooperation mit dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Kiel, Sabine Brehm und Anja Kaufmann für die Dokumentation der Daten und ihre Hilfe und Geduld bei statistischen Fragen, Andrea Schaper für die Ratschläge und Erfahrung, die sie mit mir geteilt hat, sowie ganz besonders Sabine Lorenz, die immer ein offenes Ohr für mich hatte und mir in orthographischen Fragen mit Rat und Tat zur Seite stand.

Des Weiteren danke ich Frau Professor von Wurmb-Schwark aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Kiel für ihre freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Zygotiebestimmung unserer Zwillinge.

Diese Stelle möchte ich nutzen um mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern für ihre allgegenwärtige Unterstützung zu bedanken. Was für sie als selbstverständlich gilt, erscheint mir als großes Geschenk: Weder das Studium noch die Erstellung dieser Doktorarbeit wäre ohne ihren uneingeschränkten Beistand, ihr Interesse und ihr Verständnis möglich gewesen. Danke für alles!

Ein besonderer Dank geht an meine Schwester Anja, die mich mit ihrer Erfahrung und Geduld immer wieder bei sich aufgenommen hat, mich mit ihrer Bescheidenheit beeindruckt hat und mir eine unverzichtbare, wundervolle Hilfe war.

Schließlich danke ich meinem Jona für seine wunderbare Freundschaft, sein unerschütterliches Verständnis und seine bedingungslose Unterstützung in allen Lebenslagen. Ohne ihn hätte ich schon oft den Boden unter den Füßen verloren.

9 Lebenslauf

Name: Schulz
Vorname: Lena
Geburtsdatum: 05.08.1986
Geburtsort: Wedel/Holstein

Universitäre Ausbildung

Seit 2006: Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
2008: 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Gesamtnote: sehr gut 1,5)
2009-2013: Dissertation in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Lübeck
2009-2012: Wissenschaftliche Hilfskraft in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Lübeck, GNN- Studienzentrale
Okt.-Jan. 2012/13: PJ Pädiatrietertial, Kinderkrankenhaus Wilhelmstift, Hamburg
April 2013: 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Gesamtnote: sehr gut 1,5)

Publikation

Spiegler J, Härtel C, Schulz L, von Wurmb-Schwark N, Hoehn T, Kribs A, Küster H, Siegel J, Wieg C, Weichert J, Herting E, Göpel W: Causes of delivery and outcome of very preterm twins stratified to zygosity. Twin Res Hum Genet 15, 532-536 (2012).