

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

Vitamin D und die Prognose sehr kleiner Frühgeborener

Inauguraldissertation

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

vorgelegt von

Clara Mannhardt
aus Henstedt-Ulzburg

Lübeck 2020

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Göpel

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Martin Krapp

Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2020

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 07.12.2020

-

Promotionskommission der Sektion Medizin

-

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Frühgeborene	1
1.2. Vitamin D-Stoffwechsel	3
1.3. Vitamin D-Mangel	7
1.4. Single Nucleotide Polymorphism	10
1.5. Fragestellung	11
2. Material und Methoden	13
2.1. Das „German Neonatal Network“ (GNN)	13
2.1.1. Verwendete Materialien	15
2.1.2. Verwendete Geräte	15
2.1.3. Verwendete Software	16
2.2. Bronchopulmonale Dysplasie und Atemnotsyndrom	16
2.3. Hirnblutung, periventrikuläre Leukomalazie und Cerebralparese	17
2.4. Hüftsonographie	18
2.5. DNS-Isolierung	19
2.6. SNP-Auswahl	20
2.7. SNP-Replikation und TaqMan®-PCR	22
2.8. Datenbanken	24
2.9. Auswertung	25
2.10. Ethikvotum	25
3. Ergebnisse	26
3.1. Studienpopulation	26
3.2. Körpermaße bei Geburt und im Alter von fünf Jahren	29
3.3. Blutdruck am ersten Lebenstag und im Alter von fünf Jahren	30
3.4. Beatmung, Surfactantgabe, bronchopulmonale Dysplasie und Lungenfunktion mit fünf Jahren	31
3.5. Dauer des stationären Aufenthaltes	33
3.6. Stationäre Todesfälle	33
3.7. Hirnblutung, periventrikuläre Leukomalazie, Cerebralparese und Intelligenzquotient mit fünf Jahren	34
3.8. Frakturen und Hüftgelenksdysplasien	35

4. Diskussion	36
4.1. Small for Gestational Age-Neugeborene von Müttern mit Vitamin D-Mangel	37
4.2. Hypertension und kardiovaskuläre Erkrankungen	39
4.3. Verschlechterte Lungenfunktion	40
4.4. Verlängerter Aufenthalt auf der Intensivstation	41
4.5. Erhöhte Mortalität	42
4.6. Zerebrale Pathologien	43
4.7. Mineralisierungsdefekte des Knochens	44
4.8. Schlussfolgerung und Ausblick	45
5. Zusammenfassung	46
6. Literaturverzeichnis	47
7. Anhänge	56
7.1. Anhang 1: Fragebogen zu den klinischen Basisdaten	56
7.2. Anhang 2: Protokoll zur DNS-Isolierung aus Mundschleimhautabstrichen mit dem QIAamp® 96 DNA Kit	59
7.3. Anhang 3: Protokoll zur DNS-Isolierung aus Nabelschnüren mit dem Gentra® Puregene® Tissue Kit	60
7.4. Anhang 4: TaqMan®-PCR	61
7.5. Anhang 5: Allelische Diskrimination mittels Cluster Plot	62
7.6. Anhang 6: Verteilung der Kinder zu dem genetisch errechneten Vitamin D-Spiegel	63
7.7. Anhang 7: Daten zur Geschlechterverteilung und zu Mehrlingsgeburten	64
7.8. Anhang 8: Daten zur Herkunft der Mutter	65
7.9. Anhang 9: Daten zu typischen Komplikationen der Frühgeburt	66
8. Danksagungen	68
9. Lebenslauf	69

Abkürzungsverzeichnis

1,25(OH) ₂ D 25(OH)D	1,25-Dihydroxycholecalciferol, Calcitriol 25-Hydroxycholecalciferol, Calcidiol
A	Adenosin
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
°C	Grad Celsius
C ¹	Cytosin
C ²	Kohlenstoff
cm	Zentimeter
CP	Cerebralparese
CYP	Cytochrom
DGKJ	Deutsche Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin
DHCR7	7-Dehydrocholesterol-Reduktase
DNS	Desoxyribonukleinsäure
FEV ₁	Forced Expiratory Volume in 1 second
FGF23	Fibroblast Growth Factor 23
FIP	Fokale intestinale Perforation
FiO ₂	Fraction of inspired oxygen
g	Gramm
G	Guanin
GMFCS	Gross Motor Function Classification System
GNN	German Neonatal Network
GWAS	Genome-wide Association Study
IQ	Intelligenzquotient
IVH	Intraventrikuläre Hämorrhagie
kg	Kilogramm
KiGGS	Kinder- und Jugendgesundheitssurvey
l	Liter
MAD	Mittlerer arterieller Blutdruck
MAF	Minor Allele Frequency
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule

NEC	Nekrotisierende Enterokolitis
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
OP	Operation
P20	20. Perzentile
P80	80. Perzentile
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Persistierender Ductus arteriosus
PTH	Parathormon
PVL	Periventrikuläre Leukomalazie
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROP	Retinopathy of Prematurity
rpm	revolutions per minute
rs	reference SNP
SGA	Small for Gestational Age
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSW	Schwangerschaftswoche
UVB-Strahlung	Ultraviolette B-Strahlung
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VP-Shunt	Ventrikuloperitonealer Shunt
WHO	World Health Organisation
μl	Mikroliter

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vitamin D-Syntheseweg	6
Abbildung 2: Studienpopulation	27
Abbildung 3: TaqMan®-Verfahren	61
Abbildung 4: Allelische Diskrimination mittels Cluster Plot	62
Abbildung 5: Herkunft der Mutter	65
Abbildung 6: Zuordnung der Vitamin D-Spiegel der Kinder zu den Herkunftsländern der Mütter	65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Hypothesen zur Fragestellung	12
Tabelle 2: Eigenschaften der ausgewählten SNPs	21
Tabelle 3: Reduktion des Vitamin D-Spiegels durch die SNPs	28
Tabelle 4: Ergebnisse der Berechnung der genetisch bedingten Reduktion des Vitamin D-Spiegels: Einteilung in niedrige, mittlere und hohe Vitamin D-Spiegel	28
Tabelle 5: Geburtsgewicht, Gestationsalter und Gewicht, Kopfumfang und Körperlänge mit fünf Jahren in Abhängigkeit von den genetisch errechneten Vitamin D-Spiegeln	30
Tabelle 6: Blutdruck am ersten Lebenstag und bei der 5-Jahresnach- untersuchung in Abhängigkeit von den genetisch errechneten Vitamin D-Spiegeln	31
Tabelle 7: Beatmung und pulmonales Outcome in Abhängigkeit von den genetisch errechneten Vitamin D-Spiegeln	32
Tabelle 8: Anzahl der stationären Tage in Abhängigkeit von den genetisch errechneten Vitamin D-Spiegeln	33
Tabelle 9: Mortalität in Abhängigkeit von den genetisch errechneten Vitamin D-Spiegeln	33
Tabelle 10: Hirnblutungen, PVL, Cerebralparesen und Intelligenzquotient mit fünf Jahren in Abhängigkeit von den genetisch errechneten Vitamin D-Spiegeln	34
Tabelle 11: Frakturen und Hüftgelenksdysplasien in Abhängigkeit von den genetisch errechneten Vitamin D-Spiegeln	35
Tabelle 12: Verteilung der Kinder in den verschiedenen Genotypen	63
Tabelle 13: Geschlechterverteilung und Mehrlingsgeburten	64
Tabelle 14: Daten zu typischen Komplikationen von Frühgeborenen	66

1. Einleitung

1.1. Frühgeborene

Jede Lebendgeburt, die vor der Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche (bis zur 36+6 SSW) oder früher als 259 Tage seit dem ersten Tag der letzten Regelblutung geboren wird, definiert die World Health Organization (WHO) als Frühgeburt.

Anhand der jeweiligen Schwangerschaftswoche teilt die WHO Frühgeburtlichkeit in folgende Untergruppen: „moderate to late preterm infant“ (32. SSW bis zur 37. SSW), „very preterm infant“ (28. SSW bis vor Beendigung der 32. SSW) und „extremely preterm infant“ (vor der Vollendung der 28. SSW) [WHO, 2012]. Als weitere wichtige Unterteilung gilt die gewichtsbezogene Einteilung von Frühgeborenen: low birth weight (unter 2500g), very low birth weight (unter 1500g) und extremely low birth weight (unter 1000g) [United Nations Children`s Fund, 2014].

Weltweit wurden im Jahr 2010 14,9 Millionen Kinder zu früh geboren, entsprechend 11,1% aller Geburten. Im internationalen Vergleich variiert die Häufigkeit zwischen 5% in nördlichen Ländern Europas bis zu 18% in Malawi [Blencowe et al., 2012].

In Deutschland wurden 2017 66.730 Frühgeborene vor der Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche mit einem Anteil von 8,6% an allen geborenen Kindern (776.188) geboren. 11.051 dieser Frühgeborenen sind mit weniger als 1500 Gramm (1,4% aller Neugeborenen) geboren worden. Etwa 0,6% aller Neugeborenen (4.481) kamen mit einem Gestationsalter unter 28 Schwangerschaftswochen zur Welt [IQTIG, 2018].

In drei von 65 von Blencowe et al. untersuchten Ländern ist die Rate an Frühgeborenen in den Jahren 1990 bis 2010 gesunken (Ecuador, Kroatien und Estland), in 14 ist sie stabil geblieben, und in den übrigen Ländern ist die Rate gestiegen. Ein Grund für diese Steigerung liegt möglicherweise an der gestiegenen Fallzahlerhebung von Frühgeburtlichkeit [Blencowe et al., 2012]. Beck et al. führen zusätzlich

das immer höher werdende Alter der Mütter (über 34 Jahre), die häufigeren Mehrlingsschwangerschaften durch zunehmende Inanspruchnahme von Reproduktionsmedizin und den gestiegenen Gebrauch von elektiven Kaiserschnitten als mögliche Gründe für das Steigen der Frühgeborenenraten an [Beck et al., 2010]. Auch führen Fortschritte in der Medizin zu einer erhöhten Überlebensrate der Frühgeborenen [Jacob et al., 2016].

Frühgeborene Kinder haben ein erhöhtes Risiko für kurz- und langfristige Komplikationen. Vor allem respiratorische (Atemnotsyndrom, respiratory distress syndrom (RDS), bronchopulmonale Dysplasie (BPD)), neurologische (intraventrikuläre Hämorrhagie (IVH), periventrikuläre Leukomalazie (PVL)) und abdominelle (nekrotisierende Enterokolitis (NEC), fokal intestinale Perforation (FIP)) Komplikationen sowie die Frühgeborenenretinopathie (retinopathy of prematurity (ROP)) sind bei frühgeborenen Kindern typische Komplikationen, welche zudem maßgeblich die Prognose dieser Kinder mitbestimmen [Bührer, 2016]. Sehschwächen, chronische Infektionen bis in das Erwachsenenalter [Blencowe et al., 2012], kognitive Defizite mit verminderten akademischen und schulischen Leistungen, Verhaltensprobleme [Hutchinson et al., 2013] und ein reduzierter Intelligenzquotient um etwa 12 Punkte im Gegensatz zu Normalgeborenen sind Langzeitkomplikationen des frühgeborenen Kindes [Breeman et al., 2017]. Des Weiteren steigt das Risiko für Konzentrationsprobleme, Sprachentwicklungsverzögerungen [Linsell et al., 2015], Autismus-Spektrum-Störungen, Ängste und Phobien [Wolke und Jaekel, 2016]. Erwachsene, die als Frühgeborene zur Welt gekommen sind, haben zudem ein erhöhtes Risiko für ein reduziertes zerebelläres Volumen, arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus Typ 2 [Raju et al., 2017].

Auch geht eine Frühgeburt durch häufigere und längere Krankenhausaufenthalte und spezielle Fördermaßnahmen mit erheblichen Mehrkosten für das Gesundheitssystem einher [Blencowe et al., 2012]. Durch die längeren Krankenhausaufenthalte sind vor allem die Kosten für Frühgeborenen, die vor der 28. Schwangerschaftswoche oder mit weniger als 1000 Gramm geboren werden, im ersten Jahr nach der Geburt deutlich erhöht [Jacob et al., 2016].

Frühere Erhebungen der GNN-Studie konnten zeigen, dass im Jahre 2010 die Haupttodesursachen der Frühgeborenen Infektionen (Sepsis und nekrotisierende

Enterokolitis; 25,3% der Todesfälle) und respiratorische Ursachen (29,4% der Todesfälle) waren [Stichtenoth et al., 2012]. Auch die Arbeit von Patel et al. liefert als Haupttodesursachen der Frühgeborenen die NEC, die BPD und das Atemnotsyndrom [Patel et al., 2015]. Mortalität und Morbidität sind stark vom Gestationsalter abhängig. Je älter die Frühgeborene bei Geburt sind, desto geringer ist das Risiko an den Folgen der Frühgeburt zu versterben. Die Zahlen zu Mortalität und Morbidität variieren außerdem sehr stark zwischen den Krankenhäusern [Helenius et al., 2017; Horbar et al., 2012].

1.2. Vitamin D-Stoffwechsel

Die Synthese des fettlöslichen Vitamin D beginnt in der Plasmamembran der Haut aus 7-Dehydrocholesterin. 7-Dehydrocholesterin ist die letzte Vorstufe der Cholesterin-Biosynthese und wird durch die 7-Dehydrocholesterin-Reduktase in Cholesterin umgewandelt. Durch ultraviolette B-Strahlung, vor allem aus dem Sonnenlicht (Wellenlänge von 290 bis 315nm), entsteht durch Brüche und Neuordnungen im 7-Dehydrocholesterin das Prävitamin D₃. Aus diesem bildet sich spontan und temperaturabhängig Vitamin D₃, auch Cholecalciferol genannt. Prävitamin D₃ und Cholecalciferol können ultraviolette B-Strahlung absorbieren, zerfallen aber in inaktive Produkte, so dass es nicht zu einer Vitamin D₃-Intoxikation durch längeren Aufenthalt in der Sonne kommt [Tsiaras und Weinstock, 2011]. Cholecalciferol wird entweder mit Hilfe des Vitamin D-Bindeproteins zur Leber transportiert oder in den Adipozyten des Fettgewebes für Zeiten der geringeren Sonnenexposition gespeichert. Vitamin D kann auch durch die Nahrung aufgenommen werden, entweder als Ergocalciferol (Vitamin D₂) oder als Cholecalciferol (Vitamin D₃). Vitamin D₂ kommt in nicht-tierischen Produkten (Pilze) vor, Vitamin D₃ vor allem in Fisch [Holick, 2007]. Die chemische Struktur von Vitamin D₂ und D₃ unterscheidet sich in einer zusätzlichen Kohlenstoff-Doppelbindung zwischen C-22 und C-23, sowie eines Methyl-Restes an C-24 im Vitamin D₂ [Gezmish und Black, 2013]. Da Vitamin D₂ und D₃ ungeladene Moleküle sind, müssen sie, nachdem sie im proximalen Gastrointestinaltrakt absorbiert wurden, an Chylomikronen gebunden ins Lymph-

system transportiert werden. Über das lymphatische System gelangen Vitamin D₂ und D₃ in das Blut und werden zur Leber transportiert, wo die weitere Synthese der des Vitamin D₃ aus dem 7-Dehydrocholesterin entspricht [Tsiaras und Weinstock, 2011]. In der Leber wird Vitamin D durch die Vitamin D-25-Hydroxylase in 25-Hydroxycholecalciferol (25(OH)D), auch Calcidiol genannt, umgewandelt. Durch einen negativen Feedback-Mechanismus hemmt 25(OH)D die Vitamin D-25-Hydroxylase. 25(OH)D ist die zirkulierende Form des Vitamin D. Aufgrund höherer Konzentrationen und einer längeren Halbwertszeit als Calcitriol (das Endprodukt der Vitamin D Synthese) von etwa 15 Tagen im Blut eignet es sich gut für Laborbestimmungen [Cândido und Bressan, 2014]. 25(OH)D wird, gebunden an das Vitamin D-Bindeprotein, zur Niere transportiert. In der Niere hydroxyliert die 1 α -Hydroxylase 25-Hydroxycholecalciferol zu 1,25-Dihydroxycholecalciferol (1,25(OH)₂D), auch Calcitriol genannt. Die 1 α -Hydroxylase wird durch Calcitriol und den Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) gehemmt. Parathormon sowie Calcium- und Phosphat-Mangel steigern die 1 α -Hydroxylase in der Niere [Holick, 2007]. Calcitriol ist die aktive Form des Vitamin D und wirkt vor allem durch Steigerung der Plasmakonzentrationen von Calcium und Phosphat an Niere, Darm und Knochen [Pojednic und Ceglia, 2014].

In der Niere kommt es zu einer tubulären, Parathormon abhängigen Reabsorption von Calcium und Phosphat. Im Darm (vor allem im Duodenum und Jejunum) induziert Calcitriol Calcium-Kanäle und Natrium-Phosphat-Kotransporter und stimuliert so die Absorption von Calcium und Phosphat. In der Dünndarmzelle binden die Calcium-Ionen an Calbindin, ein Vitamin D abhängiges Protein, welches die Calcium-Ionen in das Blut überführt. Durch Calcium- und Phosphatmobilisierung aus dem Knochen fördert Calcitriol die Knochenmineralisation und die Synthese der Knochenmatrix. Auch wird die Differenzierung der Osteoklasten aus Vorläuferzellen gefördert. Dieses geschieht durch Aktivierung von RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) in den Osteoblasten. Das RANKL-Protein bindet an den Transmembranrezeptor RANK (Receptor Activator of NF- κ B) und bewirkt so die Differenzierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen zu adulten Osteoklasten. Diese Effekte von Vitamin D auf den Knochen führen zum Knochenwachstum und zur ausgeglichenen Knochenhomöostase [Cândido und Bressan, 2014; Holick, 2006].

Calcitriol wird durch Endozytose in die Zelle aufgenommen und bindet an den Vitamin D-Rezeptor (VDR) im Zellkern. Der Vitamin D-Rezeptor ist ein Steroidrezeptor, der durch Bindung seines Liganden (Calcitriol) aktiviert wird. Im Nukleus bilden sich Heterodimere aus Vitamin D-Rezeptor und Retinoid X-Rezeptor (Rezeptor für 9-cis-Retinsäure, RXR). Der VDR/RXR-Komplex bindet an das spezifische Vitamin D responsive Element und aktiviert so die Transkription der Vitamin-D-abhängigen Gene [Pojednic und Ceglia, 2014].

Calcitriol und Calcidiol werden durch die 24-Hydroxylase metabolisiert und in der Niere abgebaut. Dieser Abbau geschieht CYP24A1 und CYP3A4 abhängig. Im Gegensatz zur 1α -Hydroxylase wird die Aktivität der 24-Hydroxylase durch Calcitriol und den Fibroblast Growth Factor 23 gefördert. Die Abbauprodukte von $25(\text{OH})\text{D}$ und $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sind wasserlöslich und werden mit der Gallenflüssigkeit ausgeschieden [Holick, 2007].

Der Vitamin D-Syntheseweg wird durch mehrere Gene gesteuert. So liegen auf dem Chromosom 11 die Gene DHCR 7 für die 7-Dehydrocholesterin-Reduktase und CYP2R1 für die Vitamin D-25-Hydroxylase, auf dem Chromosom 4 das GC-Gen (Group-Specific-Component-Gen), welches das Vitamin D-Bindeprotein kodiert. [Zhang et al., 2013].

Die Abbildung 1 dient der besseren Übersicht über den Vitamin D-Syntheseweg.

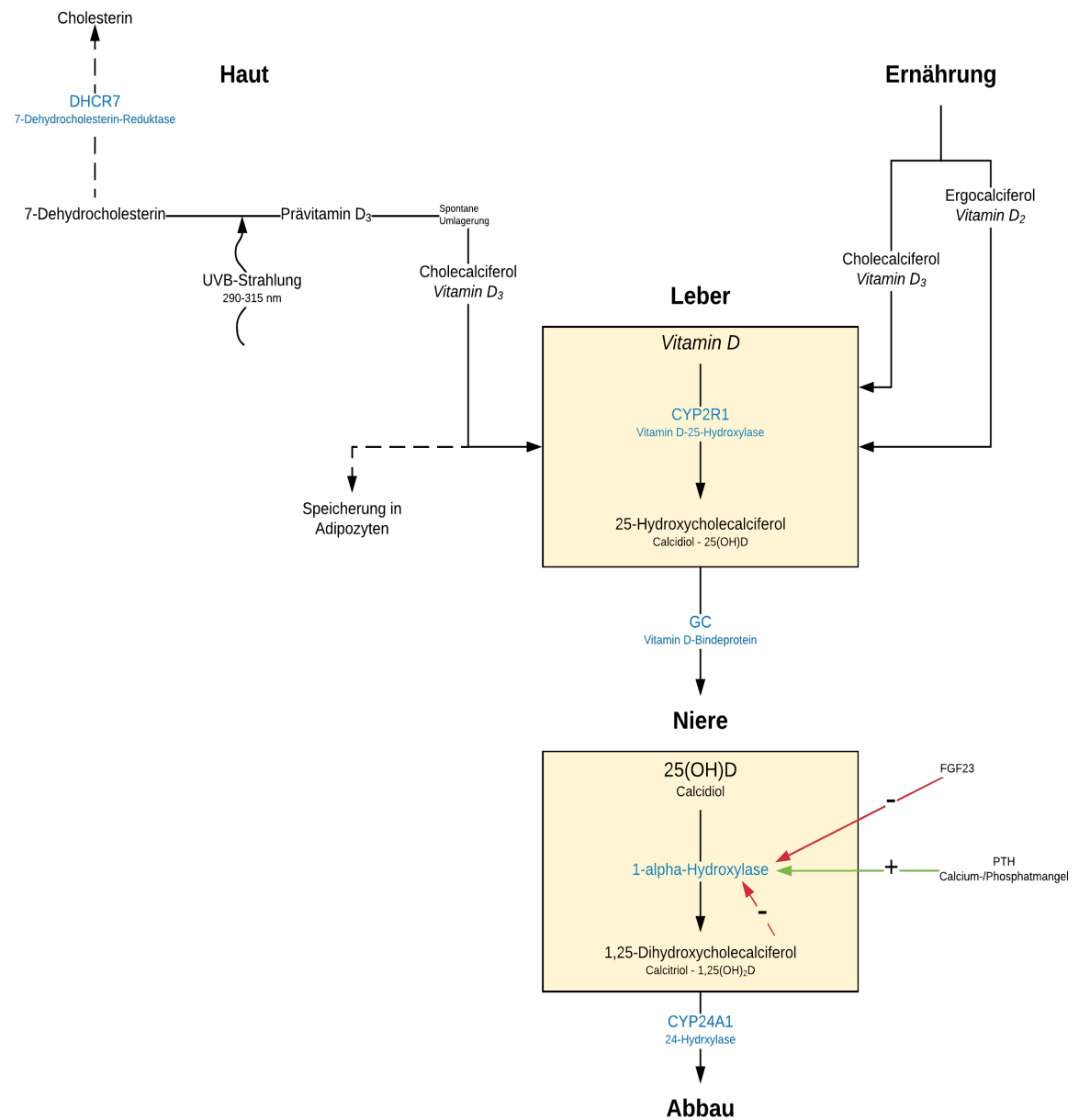


Abbildung 1: Vitamin D-Syntheseweg [nach: Mokry et al., 2015]

1.3. Vitamin D-Mangel

Die Ernährungskommission der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin bezieht sich bei ihrer aktuellen Definition des Vitamin D-Mangels auf die Angaben von Munns et al, welche unterhalb des Referenzwertes für 25(OH)D ($<12\text{ng/ml}$ (entsprechend 30nmol/l)) von einem Vitamin D-Mangel ausgehen. Eine insuffiziente Vitamin D-Versorgung findet sich bei Werten von 12 bis 20ng/ml (30 bis 50nmol/l) und eine optimale Versorgung besteht bei über 20ng/ml (50nmol/l) [Ernährungskommission der DGKJ, 2018; Munns et al., 2016].

Durch die wichtige Rolle von Vitamin D bei der Knochenmineralisierung führt ein Vitamin D-Mangel zu Mineralisierungsdefekten. Bei Kindern und Säuglingen äußert sich dieses in dem Krankheitsbild der Rachitis, bei Erwachsenen in der Osteomalazie. Ein Mangel an Vitamin D, vor allem durch eine zu geringe ultraviolette Strahlung, führt durch eine verminderte intestinale Aufnahme von Calcium zu einem erniedrigten Calciumspiegel im Blut. Reaktiv kommt es zu einer Parathormon-Ausschüttung. Hierauf reagieren die tubulären Nierenzellen mit einer Parathormon-abhängigen Reabsorption von Calcium. Der Calcium-Spiegel im Blut kann somit bei einem Vitamin D-Mangel im Normbereich liegen. Parathormon sowie Calcium- und Phosphatmangel stimulieren die 1α -Hydroxylase im proximalen Tubulus der Niere. Diese Stimulation führt zu einer vermehrten Produktion von $1,25$ -Dihydroxycholecalciferol und somit zu erhöhten Calcitriolspiegeln im Blut (trotz ursächlichem Vitamin D-Mangel), weshalb Calcidiol zur Abschätzung des wahren Vitamin D-Spiegels verwendet wird. Der sekundäre Hyperparathyreodismus (erhöhte Parathormonspiegel im Blut durch länger anhaltenden Calciummangel) führt zu einem renalen Phosphatverlust und damit zu einem erniedrigten Calcium-Phosphat-Produkt, welches die Ursache der Mineralisierungsdefekte ist [Cândido und Bressan, 2014; Holick, 2006].

Die Rachitis betrifft gehäuft schnell wachsende Knochen, vor allem an den Knorpel-Knochen-Grenzen. Dieses erklärt das Auftreten der Symptome im ersten Lebensjahr der Kinder, da hier (und in der Pubertät) das Knochenwachstum am Stärksten ausgeprägt ist. Zu den typischen Symptomen gehören der rachitische Rosenkranz (Aufreibungen der Knorpel-Knochen-Grenzen der Rippen), Beinver-

krümmungen (Genu varum oder Genu valgum durch Muskelzug und Schwerkraft bei bereits stehenden Kindern), Thoraxdeformität durch Muskelzug des Zwerchfells, Kraniotabes (Eindrückbarkeit des Hinterhaupts) und Verzögerung der Zahnentwicklung. Der Calciummangel führt außerdem zu einer erhöhten Krampfbereitschaft und zu Herzrhythmusstörungen.

Da das Vitamin D in der Muttermilch nicht für die adäquate Versorgung des Neugeborenen ausreicht, empfiehlt die Ernährungskommission der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin und die S1-Leitlinie zur Vitamin D-Mangel-Rachitis eine Supplementierung von Neugeborenen mit Vitamin D-Präparaten (400 bis 500 Einheiten pro Tag) für etwa ein bis eineinhalb Jahre (bis zum zweiten erlebten Frühsommer der Kinder). Eine Risikogruppe unter den Neugeborenen bilden die Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1500 Gramm, da diese vermehrt zu Mineralisierungsstörungen neigen. Bei dieser Risikogruppe ist eine höhere Supplementierung mit Vitamin D-Präparaten (800 bis 1000 Einheiten pro Tag) in den ersten Monaten empfohlen. Bei Erwachsenen sind die Epiphysenfugen bereits verschlossen, weshalb das Krankheitsbild der Osteomalazie nicht mit Deformität der Knochen einhergeht, aber mit Knochenschmerzen und einem erhöhten Frakturrisiko [Ernährungskommission der DGKJ, 2018; Holick, 2006; S1-Leitlinie, 2016]. Ein weiteres Kollektiv mit erhöhtem Risiko für einen Vitamin D-Mangel sind dunkelhäutige Menschen, da sich bei ihnen in der Basalschicht der Haut vermehrt Melanin befindet, welches die Penetration der ultravioletten B-Strahlung verringert [Gezmish und Black, 2013].

Des Weiteren kommt es infolge eines Vitamin D-Mangels zu Calcium-unabhängigen Symptomen, die vor allem durch das ubiquitäre Vorkommen des Vitamin D-Rezeptors zu erklären sind. Auch die 1α -Hydroxylase ist in vielen verschiedenen Zelltypen nachgewiesen worden, so dass eine intrazelluläre Aktivierung des Calcidiols in Calcitriol auch außerhalb der Niere erfolgen kann [Tomaschitz et al., 2010], beispielsweise in Adipozyten, β -Zellen des Pankreas und Zellen des Immunsystems (T-, aktivierte B- und dendritische Zellen). In den Adipozyten hemmt Vitamin D die Transkriptionsfaktoren, die die Differenzierung von Präadipozyten in reife, fettspeichernde Adipozyten aktivieren. So kommt es im Falle eines Vitamin D-Mangels zu einer vermehrten Lipogenese und hiermit zu

einer Vergrößerung des Fettspeichers, mit dem erhöhten Risiko für Übergewicht als Folge. Im Pankreas führt ein Vitamin D-Mangel zu einer geringeren Insulinproduktion und –sekretion, da in den Insulin Promotor Genen die DNS-Sequenz für das Vitamin D-responsive Element vorhanden ist und somit das Vorhandensein von Vitamin D für die Produktion von Insulin notwendig ist. Dieser Vorgang erklärt das erhöhte Risiko für Diabetes mellitus bei Vitamin D-Mangel. Außerdem fungiert Vitamin D als Immunmodulator, da es beispielsweise regulatorische T-Zellen (T-Suppressorzellen) induziert. Diese führen zur Unterdrückung und damit zur erhöhten Selbsttoleranz des Immunsystems und schlussendlich zu einem erniedrigten Risiko für die Entstehung von Allergien und Autoimmunkrankheiten. Aly et al. konnten zeigen, dass die regulatorischen T-Zellen bei Frühgeborenen bei einer Supplementierung mit 800 Einheiten Vitamin D signifikant mehr anstiegen, als bei einer Supplementierung mit 400 Einheiten. Darüber hinaus wirkt Vitamin D durch eine Hemmung der Expression von inflammatorischen Zytokinen in Monozyten anti-entzündlich, anti-proliferativ und Organ-protectiv [Aly et al., 2019; Cândido und Bressan, 2014; Griz et al., 2014; Litonjua, 2009; Tomaschitz et al., 2010]. Zusätzlich zu dieser anti-proliferativen Wirkung hemmt Vitamin D die Zellteilung und fördert die Apoptose von Krebszellen, weshalb ein Vitamin D-Mangel mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Krebserkrankung einhergeht [Afzal et al., 2014; Ong et al., 2016]. Des Weiteren zeigen Studien ein gesenktes Hypertensionsrisiko bei suffizienten Vitamin D-Spiegeln durch eine Inhibition der Renin-Synthese durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ im juxtaglomerulären Apparat der Niere [Tomaschitz et al., 2010]. Auch in den Surfactant-bildenden Zellen (Pneumozyten Typ II) wurde der Vitamin D-Rezeptor nachgewiesen. Dieses lässt auf einen fördernden Einfluss von Vitamin D auf die Produktion von Surfactant in der Lunge schließen [Litonjua, 2009].

1.4. Single Nucleotide Polymorphism

Ein SNP (Single Nucleotide Polymorphism, Einzelnukleotid-Polymorphismus) bezeichnet den Austausch einer einzelnen Base in einem Allel des menschlichen Genoms. SNPs sind die häufigsten genetischen Veränderungen des Menschen und können entweder in nicht-kodierenden oder in kodierenden Genabschnitten liegen. Bei den SNPs in kodierenden Genabschnitten werden synonyme (stumme) SNPs von nicht-synonymen SNPs unterschieden. Bei Letzteren resultiert aus dem Polymorphismus eine Veränderung der zugehörigen Aminosäure und damit eine mögliche Veränderung des zu kodierenden Proteins. Da die genetische Information allelisch vorliegt, resultieren drei mögliche Genotypen: Homozygot ohne Änderung der Basenabfolge (normaler Zustand ohne SNP), heterozygot mit nur einem betroffenen Allel und homozygot mit zwei betroffenen Allelen. Das Allel, das seltener in der Population vorkommt wird als „minor“ Allel bezeichnet. So beschreibt die Minor Allele Frequency (MAF) die Frequenz des Auftretens des weniger häufigen Allels in einer Population. Die MAF beträgt zwischen weniger als ein Prozent bis weniger als 50 Prozent [Mokry et al., 2015].

Durch Genomweite Assoziationsstudien (Genome-wide Association Studies, GWAS) werden die genetischen Veränderungen mit Krankheiten oder gesundheitsbezogenen Merkmalen korreliert. Einer GWAS liegt die Hypothese zugrunde, dass häufige Krankheiten auch häufige genetische Veränderungen haben und suggeriert, dass Allel-Veränderungen für eine bestimmte Krankheit in mehr als ein bis fünf Prozent der Bevölkerung vorkommen. Ein SNP gilt dann als genomweit signifikant, wenn sein p-Wert kleiner als $5,0 \times 10^{-8}$ ist. Dieser p-Wert errechnet sich mithilfe der Bonferroni-Korrektur. Da bei einer GWAS viele voneinander unabhängige Hypothesen an einem Datensatz getestet werden, würden sich die alpha-Fehler (5% Irrtumswahrscheinlichkeit) aller Tests kumulieren. Folge hieraus wären viele falsch-positive Testergebnisse. Mithilfe der Bonferroni-Korrektur wird α durch die Anzahl der durchgeführten Tests dividiert ($p < \alpha/n$). Diese Rechnung ergibt für genomweiten Assoziationsstudien einen p-Wert kleiner als $0,05/1.000.000 = 0,00000005 = 5,0 \times 10^{-8}$ [Mokry et al., 2015].

Schon erforschte SNPs erscheinen in einer öffentlichen Datenbank für SNPs (dbSNP) und erhalten eine Nummer mit dem Vorsatz „rs“ (reference SNP). Außerdem sind in der Datenbank die Allel-Frequenzen und weitere Genom-Informationen zu finden [dbSNP; Pearson und Manolio, 2008].

1.5. Fragestellung

Vitamin D-Mangel ist ein aktuelles und weltweites Problem aller Alters- und ethnischen Gruppen. In Norddeutschland haben über 80% der Menschen über das Jahr verteilt eine insuffiziente Versorgung mit Vitamin D [Kramer et al., 2014]. Etwa drei Viertel der Schwankung des Vitamin D-Spiegels sind durch genetische Faktoren und nicht durch den Breitengrad oder die Saison zu erklären [Wang et al., 2010]. Ziel dieser Arbeit war es, das Outcome von Frühgeborenen hinsichtlich der Auswirkungen des genetisch vorbestimmten Vitamin D-Spiegels zu untersuchen.

In der Tabelle 1 sind Krankheiten aufgelistet, die in der Literatur auf einen Vitamin D-Mangel zurückgeführt werden. Diese vorbeschriebenen Effekte stellen die Grundlage für die Hypothesen dieser Arbeit dar.

Die Identifikation von möglichen (reversiblen) Risikofaktoren für die Entwicklung der Frühgeborenen könnte bei der Behandlung dieser Kinder helfen. Vor allem beim Vitamin D-Mangel ist eine Prävention der Folgeerkrankungen gut durchführbar, da eine Supplementierung mit Vitamin D-Präparaten eine einfache und günstige Lösung darstellt. Bei vielen klinischen Studien bleibt fraglich, ob der Vitamin D-Mangel die Krankheiten auslöst oder die Krankheiten den Vitamin D-Mangel. Diese möglichen Störfaktoren umgeht man bei der Untersuchung von genetischen Einflussfaktoren.

Tabelle 1: Hypothesen zur Fragestellung

Auswirkung des Vitamin D-Mangels in der Literatur	Zu erwartende Effekte bei Frühgeborenen mit genetisch vorbestimmtem Vitamin D-Mangel	Beispielhafte Referenz aus der Literatur
SGA* Neugeborene von Müttern mit Vitamin D-Mangel	Erniedrigtes Geburtsgewicht und Gestationsalter, erniedrigtes Gewicht, Kopfumfang und Körperlänge mit fünf Jahren	Bodnar et al., 2010 Leffelaar et al., 2010
Hypertension, kardiovaskuläre Erkrankungen	Erhöhter MAD am ersten Lebenstag und bei der 5-Jahresnachuntersuchung	Tomaschitz et al., 2010 Vaidya et al., 2011 Vimalaswaran et al., 2014
Verschlechterte Lungenfunktion	BPD, Notwendigkeit der Surfactantgabe, tracheale Beatmung, erhöhter Sauerstoffbedarf, schlechtere Ergebnisse der Lungenfunktionstestung mit fünf Jahren	Hart et al., 2015 Litonjua, 2009 Wu et al., 2012
Verlängerter Aufenthalt auf der Intensivstation	Verlängerte Anzahl an Tagen stationär	McNally et al., 2012 Sankar et al., 2016
Erhöhte Mortalität	Stationäre Todesfälle	Afzal et al., 2014
Zerebrale Pathologien	Hirnblutungen, PVL, Cerebralparesen, erniedrigter Intelligenzquotient mit fünf Jahren	Chung et al., 2015
Mineralisierungsdefekte des Knochens	Frakturen, Hüftgelenkdysplasien	Högberg et al., 2018 Ernährungskommission der DGKJ, 2018 S1-Leitlinie, 2016

* Neugeborene unter der zehnten Neugeborenenperzentile nach Voigt

2. Material und Methoden

2.1. Das „German Neonatal Network“ (GNN)

Seit Januar 2009 existiert das Deutsche Frühgeborenen-Netzwerk (German Neonatal Network). Ziel dieser großangelegten Studie ist die Erforschung von genetischen, sozialen und zentrumsspezifischen Einflüssen auf die Entwicklung von Frühgeborenen im Rahmen einer prospektiven Dokumentation der klinischen Daten der Frühgeborenen. Einschlusskriterien waren bis zum 31.12.2016 ein Geburtsgewicht unter 1500 Gramm und eine Geburt vor der 37. Schwangerschaftswoche. Zum 01.01.2017 haben sich die Einschlusskriterien auf ein Geburtsgewicht unter 1000 Gramm und/oder eine Geburt vor der 29. Schwangerschaftswoche geändert. Eine Verlegung von Frühgeborenen aus einer anderen Kinderklinik blieb als Ausschlusskriterium bestehen. Die untersuchten Daten für diese Arbeit basieren auf den Einschlusskriterien bis zum 31.12.2016.

Während des ersten Klinikaufenthaltes der Frühgeborenen werden die Eltern zu der GNN-Studie aufgeklärt. Nach erfolgter Einverständniserklärung der Eltern werden mit sterilen Wattetupfern je zwei Mundschleimhautabstriche der Mutter und des Kindes entnommen. Zusätzlich zu diesen Abstrichen werden ein Stück der Nabelschnur (bei minus 20°C eingefroren), die ausgefüllte Einverständniserklärung und ein ärztlicher Fragebogen zu pränatalen Basisdaten und über den postnatalen Aufenthalt (Anhang 1) an die Studienzentrale (die Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Lübeck) gesendet. Mithilfe des Fragebogens zu den klinischen Basisdaten werden Daten zu den typischen Erkrankungen des Frühgeborenen (ROP, NEC, Hirnblutung, BPD, Hydrozephalus), Wachstumsretardierung, Tod, Sepsis, verabreichte Medikamente, erfolgte Prozeduren und Operationen gesammelt. Die Abstriche und das Nabelschnurstück dienen der Erforschung der Beeinflussung genetischer Risikofaktoren auf die Entwicklung von Frühgeborenen.

Zum Zeitpunkt der Datenerhebung für diese Arbeit nahmen 55 Kinderkliniken deutschlandweit an der GNN-Studie teil. Alle teilnehmenden Kinderkliniken wer-

den jährlich durch einen neonatologisch geschulten Arzt/Ärztin oder Kinderkrankenschwester der GNN-Studie im Rahmen eines Monitorings besucht. Dieses Monitoring dient einerseits der Kontrolle der Datenqualität und andererseits der anonymen Erhebung von Daten (ähnlich denen, die in dem Fragebogen zu den klinischen Basisdaten gesammelt werden) zu Frühgeborenen, die nicht in die Studie aufgenommen wurden, aber die Einschlusskriterien erfüllen. Nach jedem Monitoring erhält die jeweilige Klinik einen umfassenden Bericht.

Die Eltern der in die Studie eingeschlossenen Frühgeborenen erhalten bis zum vollendeten fünften Lebensjahr ihrer Kinder jährlichen einen Fragebogen (angelehnt an den KiGGS-Elternfragebogen) zu der generellen gesundheitlichen Entwicklung ihres Kindes (körperliche, soziale und psychische Gesundheit). Die KiGGS-Elternfragebogen entsprechen denen der KiGGS-Studie (Kinder- und Jugendgesundheitssurvey). In der KiGGS-Studie untersucht und befragt das Robert-Koch-Institut seit 2003 zufällig ausgewählte Kinder und deren Eltern deutschlandweit. Die KiGGS-Studie dient der Datenerhebung zu verschiedenen Gesundheitsthemen von Kindern und Jugendlichen in Deutschland. Durch die publizierten Daten dieser großangelegten KiGGS-Studie konnten wir auf Vergleichswerte und standardisierte Testverfahren zurückgreifen [KiGGS-Studie].

Im Alter von fünf Jahren werden im GNN zufällig ausgewählte Kinder zu einer Nachuntersuchung eingeladen. Die Nachuntersuchungen finden in den jeweiligen Geburtsorten der Kinder statt. Damit die erhobenen Daten vergleichbar sind, reist ein geschultes Team aus der Studienzentrale Lübeck für die 5-Jahresnachuntersuchungen deutschlandweit in die jeweiligen Kinderkliniken. Das Team besteht aus einem Arzt/Ärztin, zwei Studienschwestern und einem Doktoranden/Doktorandin. Alle notwendigen Instrumente werden aus Lübeck mitgebracht. Im Rahmen dieser Nachuntersuchungen werden standardisiert Daten zum Körpermaß, Blutdruck, Puls, Hörvermögen, Intelligenzquotient (WPPSI III-Score, Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence), Visus, zur Fein- und Grobmotorik und Lungenfunktion erhoben. Auch zu diesem Zeitpunkt wird den Eltern ein Elternfragebogen zum Ausfüllen zugesandt.

2.1.1. Verwendete Materialien

- Fein- und Grobmotorik: Movement Assessment Battery For Children-2 (M-ABC-2), Pearson PLC, London, England
- Intelligenzquotient: Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence III (WPPSI III), Version 2.0.3, Pearson PLC, London, England
- Sehtest: LEA SYMBOLS[®] Single Symbol Book, Good Lite[®], QNET B.V., Amsternade, Niederlande
- Tiefensehen: Lang Stereotest I[®], Lang Stereotest AG, Küssnacht, Schweiz

2.1.2. Verwendete Geräte

- Audiogramm: Titan[™], Version 3.1, Interacoustics A/S, Middelfart, Dänemark
- Gewicht: ADE MAK Waage T7336, MeWa GmbH, Schwerin
- Körpergröße: Harpenden Portable Stadiometer 603 VR, Holtain Limited, Crymych, England
- Lungenfunktion:
 - Easy on-PC Spirometrie System, ndd Medizintechnik AG, Zürich, Schweiz
 - TrueFlow Easy on-PC Sensor, ndd Medizintechnik AG, Zürich, Schweiz
- Vitalparameter: Vital Signs Monitor VS-900, Mindray, Shanghai International Holding Corp. GmbH, Hamburg

2.1.3. Verwendete Software

- Audiogramm:
 - OtoAccess™, Version 1.2.1, Interacoustics A/S, Middelfart, Dänemark
 - Titan Suite, Version 3.1.0.24, Interacoustics A/S, Middelfart, Dänemark
- Datenbanken:
 - Excel® Version 14.3.4, Microsoft, Seattle, USA
 - MS-Office Access® 2013, Microsoft, Seattle, USA
 - SPSS® Version 22.0, IBM, München
- Intelligenzquotient: WPSSI I-III Auswertungsprogramm, Version 1.0.2, Pearson Assessment & Information GmbH, Frankfurt/Main
- Lungenfunktion: Easy on PC, Version 2.2.0.14, ndd Medizintechnik AG, Zürich, Schweiz

2.2. Bronchopulmonale Dysplasie und Atemnotsyndrom

Die bronchopulmonale Dysplasie tritt vor allem bei Frühgeborenen unter der 30. SSW auf und ist eine chronisch-inflammatorische Lungenerkrankung. Die erkrankten Frühgeborenen weisen einen erhöhten Sauerstoffbedarf, rezidivierende Infekte, Tachypnoe und Dyspnoe auf. Als Komplikation der BPD kann ein Rechtsherzversagen durch einen stetig erhöhten Widerstand der Lungengefäße auftreten. Häufig sind die Kinder mit BPD in ihrer Entwicklung (körperlich, motorisch und geistig) verzögert, auch besteht eine Veranlagung für Asthma bronchiale im Erwachsenenalter. Die Diagnose und Einteilung in Schweregrade erfolgt anhand des Sauerstoffbedarfs mit 36+0 SSW. Unterschieden wird eine milde (Sauerstoffbedarf für ≥ 28 Tage, aber nicht zum Zeitpunkt der korrigierten 36+0 SSW), eine moderate (Sauerstoffbedarf für ≥ 28 Tage und ein Bedarf an $< 30\%$ Sauerstoff zum Zeitpunkt

der 36. SSW) und eine schwere Verlaufsform (Sauerstoffbedarf für ≥ 28 Tage und ein Bedarf an $\geq 30\%$ Sauerstoff zum Zeitpunkt der 36. SSW) der BPD unterschieden [Jobe und Bancalari, 2001]. Die Anpassung der Definition der BPD ist Gegenstand aktueller Diskussionen. Vorgeschlagen wird eine Unterteilung anhand der Art der Atmungsunterstützung und der Höhe der inspiratorischen Sauerstofffraktion am Zeitpunkt der 36. SSW [Higgins et al., 2018].

Eine weitere Komplikation der Frühgeborenen ist das Atemnotsyndrom. Es entsteht durch die Unreife der Lungen, welche sich in einem Surfactantmangel manifestiert. Surfactant (surface active agent) wird in der Lunge gebildet und senkt die Oberflächenspannung der Alveolen. Noch heute gilt das Atemnotsyndrom als wichtige Todesursache von Frühgeborenen [Maier et al., 2017]. Die kausale Therapie des Atemnotsyndroms ist die Substitution mit Surfactant. [More et al., 2014].

2.3. Hirnblutung, periventrikuläre Leukomalazie und Cerebralparese

Die Unterteilung der intraventrikulären Hämorrhagie (Hirnblutung, IVH) in Grad 1 bis 4 erfolgt durch die sonographische Untersuchung des Gehirns durch die Fontanelle. Grad 0 ist eine fehlende Blutung, Grad 1 eine subependymale Blutung der sogenannten Germinalen Matrix, die eine Ansammlung von kleinen Gefäßen am Boden der Seitenventrikel darstellt. Ab Grad 2 kommt es zu Ventrikeleinbruchsblutungen, bei Grad 2 ohne Ventrikelerweiterung, Grad 3 mit Ventrikelerweiterungen und Grad 4 mit zusätzlichen Blutungen in das Hirnparenchym [Pekcevik et al., 2014]. Neuere Klassifikationen bezeichnen den Grad 4 (Parenchymlutung) als eigene Entität [Tan et al., 2018]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Einteilung in Grad 1 bis 4 verwendet.

Die periventrikuläre Leukomalazie kann beispielsweise durch eine ischämisch-hypoxämische Läsion des Gehirns des Frühgeborenen entstehen. Nach Abräumung der Nekrosen entstehen Zysten, die einige Wochen nach Ereignis im Ultraschall sichtbar werden. Die Läsionen befinden sich oftmals dorsal und lateral der Seitenventrikel (periventrikulär) und bewirken eine Erweichung (Malazie) der weißen Substanz (Leukos) [Choi et al., 2016]. Klinisches Bild der periventrikulären

Leukomalazie ist die Cerebralparese (CP). Da in der weißen Substanz die motorischen Bahnen für die untere Extremität dem Ventrikel am nächsten liegen, resultiert aus einer periventrikulären Leukomalazie meist eine Bein-betonte spastische Lähmung [Maier et al., 2017]. Je stärker die Läsion ausgeprägt ist, desto stärker sind die Extremitäten betroffen. Das Gross Motor Function Classification System (GMFCS) dient der Klassifikation der Cerebralparesen. Diese Einteilung ist altersabhängig und orientiert sich anhand des Mobilitätslevels der Kinder. So sind Kinder mit einem GMFCS von eins nur leicht in ihrer Mobilität eingeschränkt, wohingegen Kinder mit einem GMFCS von fünf über keine selbständige Mobilität verfügen. Die Cerebralparese kann mit Krampfanfällen und Intelligenzminderung einhergehen [Wimalasundera und Stevenson, 2016].

Der Intelligenzquotient (IQ) wurde für die vorliegende Arbeit mithilfe der Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence III (WPPSI III) im Rahmen der 5-Jahresnachuntersuchung ermittelt. Unter Annahme einer Normalverteilung des Intelligenzquotienten in der Gesellschaft beträgt der Durchschnitts-Intelligenzquotient 100. Die WHO definiert in der ICD-10 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems) eine Intelligenzminderung ab einem Intelligenzquotienten von unter 70 [ICD-10-GM F70-F79, 2017]. Der IQ-Bereich von unter 85 bis 70 ist in der ICD-10 nicht genau definiert, wird aber gemeinhin als Lernbehinderung bezeichnet.

2.4. Hüftsonographie

Zur Vorsorgeuntersuchung U3 (in der vierten bis fünften Lebenswoche) wird bei jedem Kind eine Hüftsonografie angefertigt, um mögliche Dysplasien erkennen und behandeln zu können. Die Hüftgelenksdysplasien werden sonografisch nach Graf eingeteilt. Die Einteilung erfolgt anhand der Größe von alpha- und beta-Winkel in vier Typen. Der alpha-Winkel beschreibt den Knochenwinkel, beziehungsweise Pfannendachwinkel, der beta-Winkel den Knorpelwinkel am Hüftgelenk. Typ 1 nach Graf bezeichnet den Normaltyp, Typ 2 nach Graf gilt als Verknöcherungsverzögerung (Dysplasie), Typ 3 nach Graf beschreibt eine Dezentrierung

des Hüftkopfs (Dysplasie mit Fehlstellung) und Typ 4 nach Graf ist die vollständige Hüftkopfluxation [Graf, 1983]. In dem Fragebogen nach dem ersten Lebensjahr wurden die Eltern nach dem Vorhandensein einer Hüftgelenksdysplasie ihrer Kinder befragt.

2.5. DNS-Isolierung

Die Isolierung der Desoxyribonukleinsäure (DNS) erfolgte entweder aus den Nabelschnüren der Kinder oder aus Abstrichen der Mundschleimhaut. Ergiebiger ist die Isolierung der DNS aus der Nabelschnur, da hier die DNS in höheren Konzentrationen gewonnen wird. Nachteil dieses Verfahrens ist der erhöhte Zeitaufwand gegenüber einer Isolierung aus den Abstrichen der Mundschleimhaut. Da ab 2012 deutlich mehr Kinder eingeschlossen wurden als in den Jahren davor, wurde bei allen eingeschlossenen Kindern ab 2012 die DNS für die vorliegende Arbeit ausschließlich aus den Mundschleimhautabstrichen isoliert. Nabelschnur-DNS-Isolierung fand bei einigen Kindern aus den Jahren 2009 bis 2011 statt.

Die DNS-Isolierung aus den Nabelschnüren erfolgte mithilfe des Gentra® Puregene® Tissue Kits (QIAGEN). Für die DNS-Isolierung der Mundschleimhautabstriche wurde das QIAamp® 96 DNA Kit verwendet (QIAGEN). Die DNS-Isolierung aus den Mundschleimhautabstrichen beruht auf einer Membran-Adsorption. Zu Beginn der Isolierung werden die Proteine durch Zugabe einer Protease denaturiert und die DNS mithilfe von Ethanol in Lösung gehalten. Durch mehrere Waschschritte und durch Zentrifugation der Lösung wird die DNS ausgewaschen und der Überstand abgetragen. Die DNS bleibt am Ende der Isolierung am Boden der Deep-Well-Platte.

Die Proteine aus den Nabelschnüren werden durch eine Cell Lysis Solution, die Proteinase K und durch eine Precipitation Solution denaturiert. Die RNase A Solution entfernte die Ribonukleinsäure aus den Proben. Die Proteinfällung ist als Protein-Pellet am Boden des Röhrchens zu erkennen und wird verworfen. Zurück bleibt ein DNS-Überstand, der mit Isopropanol in Lösung gebracht wird. Auch hier folgen mehrere Waschschritte mit Ethanol. Nach der Trocknung der DNS wird die-

se mit einer Hydration Solution in Lösung gehalten. Vorher festgelegte Wells bleiben bei beiden Isolierungen ohne DNS, um bei der späteren Polymerase Chain Reaction (PCR) Verunreinigungen ausschließen zu können (Leerwerte).

Die isolierte DNS aus den Mundschleimhautabstrichen sowie aus den Nabelschnüren wird in 96er-Well-Platten bei -80°C aufbewahrt.

Die Protokolle zu den einzelnen Isolierungsschritten sind den Anhängen 2 und 3 zu entnehmen.

2.6. SNP-Auswahl

Zur Auswahl der SNPs mit Wirkung auf den Vitamin D-Stoffwechsel wurde sich für diese Arbeit an den Veröffentlichungen von Ong et al., Wang et al., Afzal et al. und Mokry et al. orientiert.

Die ausgewählten (synonymen) SNPs kodieren Enzyme des Vitamin D-Synthesewegs und haben einen nachgewiesenen Effekt auf den 25(OH)D-Spiegel, da die p-Werte kleiner als 5.0×10^{-8} sind.

rs2282679 liegt auf Chromosom 4 in dem Group-Specific-Component (GC)-Gen, dieses kodiert das Vitamin D-Bindeprotein. rs2282679 hat eine reduzierende Wirkung um 2,5nmol/l auf den 25(OH)D-Spiegel, wenn in der DNS Cytosin (C) statt Adenosin (A) eingebaut ist.

rs12794714 liegt auf Chromosom 11 im CYP2R1-Gen (Cytochrom P450, Familie 2, Subfamilie R, Polypeptid 1). Dieses Gen kodiert die Vitamin D-25-Hydroxylase, die Vitamin D in Calcidiol umwandelt. rs12794714 reduziert den Calcidiol-Spiegel um 3,0nmol/l, wenn in der DNS Adenosin statt Guanin (G) eingebaut ist.

Außerdem liegt auf Chromosom 11 der SNP rs7944926. Dieser ist nahe dem DHCR7-Gen für die 7-Dehydrocholesterol-Reduktase. rs7944926 wirkt bei einem Austausch von Adenosin statt Guanin um 2,0nmol/l reduzierend auf den Vitamin D-Spiegel. [Ong et al., 2016; Wang et al., 2010; Afzal et al., 2014; Mokry et al., 2015].

In der Tabelle 2 sind die Zugehörigkeiten und der reduzierende Einfluss der SNPs auf den 25(OH)D-Spiegel nach Ong et al., die MAF und die p-Werte der ausge-

wählten SNPs nach Wang et al. und die Basenpaarposition aus der dbSNP-Datenbank aufgelistet.

Tabelle 2: Eigenschaften der ausgewählten SNPs

SNP	rs2282679	rs12794714	rs7944926
<i>Chromosom</i>	4	11	11
<i>Lokus</i>	GC	CYP2R1	DHCR7
<i>Vollständiger Name</i>	Vitamin D-Bindeprotein	Vitamin D-25-Hydroxylase	7-Dehydrocholesterol-Reduktase
<i>Reduzierendes Allel</i>	C	A	A
<i>MAF</i>	0,29	0,43	0,23
<i>Einfluss auf 25(OH)D [nmol/l]</i>	-2,5	-3,0	-2,0
<i>Assoziation mit 25(OH)D</i>	$p=1,9 \times 10^{-109}$	$p=1,84 \times 10^{-9}$	$p=8,96 \times 10^{-16}$
<i>Basenpaarposition</i>	71742666	14892029	71454579

Zusätzlich zu den abgebildeten SNPs wurde noch den SNP rs6013897 untersucht, der ebenfalls eine nachgewiesene reduzierende Wirkung auf den Vitamin D-Spiegel hat. rs6013897 liegt im CYP24A1-Gen, welches die Vitamin D-24-Hydroxylase kodiert. Ähnlich wie bei Ong et al., zeigten die Auswertung von rs6013897 eine sehr hohe Anzahl an unbestimmten Werten, weshalb die Entscheidung fiel, diesen SNP nicht mit in die Endauswertung einzubeziehen [Ong et al., 2016].

Der Vitamin D-Spiegel der untersuchten Frühgeborenen wurde für diese Arbeit nicht im Blut bestimmt, sondern errechnet. Zur Berechnung des reduzierenden Einflusses der SNPs diente maßgeblich die Veröffentlichung von Ong et al. rs7944926 reduziert die 25(OH)D-Konzentration um 2,0nmol/l, wenn das reduzierende Allel vorhanden ist. rs12794714 reduziert die Vitamin D-Konzentration um 3,0nmol/l und rs2282679 um 2,5nmol/l [Ong et al., 2016]. Um die Werte einheitlicher und übersichtlicher zu gestalten, wurden die berechneten drei SNPs im Anschluss summiert. Das Ergebnis ist ein genetisch errechneter Vitamin D-Spiegel.

2.7. SNP-Replikation und TaqMan®-PCR

Zur SNP-Replikation wurden in einem ersten Schritt vier von den bereits isolierten 96er-Well-DNS-Platten (Sarstedt, Nürnberg) mit Hilfe einer Achtkanalpipette (Eppendorf® Xplorer) in eine 384er-Well-Platte (Sarstedt) pipettiert. In jedem Well befanden sich 5ng DNS von lediglich einem Frühgeborenen. Da die isolierte DNS aus den Nabelschnüren konzentrierter vorliegt, wurde aus dieser DNS 1µl vorgelegt und aus der DNS der Mundschleimhautabstriche 2µl. Für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction) wurde die DNS aller Kinder von 2009 bis 2016 verwendet, dieses entspricht einer Anzahl von 13.096 Kindern. Zu dieser vorgelegten DNS wurde im Folgenden jeweils 5µl des SNP-Ansatzes mit der Eppendorf® Multipette Stream mit Combitips advanced pipettiert. Der SNP-Ansatz bestand aus Ampuwa® (Fresenius Cabi, Bad Homburg), dem TaqMan® Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien) und dem farblich markierte SNP (Applied Biosystems, Life Technologies). Pro Probe wurden 2,425µl Ampuwa®, 2,525µl TaqMan® Genotyping Master Mix und 0,05µl des SNPs pipettiert. Zusammen mit der DNS ergibt dies ein Probenvolumen von 6µl der Nabelschnur-DNS und 7µl der Mundschleimhautabstrich-DNS. Im Anschluss wurde die 384er-Well-Platte mit Sealing Tape (Sarstedt) luftdicht verschlossen, zentrifugiert (Rotanta 46 RSC, Hettich Zentrifugen) und in einem der drei Cycler (Veriti 384 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems; Peltier Thermal Cycler-200, MJ Research; TaqMan® 7900HT, Applied Biosystems) die PCR gestartet. Die PCR erfolgt in drei Schritten: Im ersten Schritt wird der Cycler für zehn Minuten auf 95°C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Bei 92°C findet für 15 Minuten im zweiten Schritt das sogenannte Annealing der Primer statt, also das Anlagern der SNPs an die passende Proben-DNS-Sequenz. Im dritten Schritt folgt die Elongation, die Synthese des komplementären DNS-Strangs, bei 60°C für eine Minute. Der zweite und dritte Schritt wurden entweder 39 Mal (bei der Nabelschnur-DNS) oder 44 Mal (bei der Mundschleimhautabstrich-DNS) wiederholt. Nach Erreichen der 40, beziehungsweise 45 Zyklen, kühlte der Cycler auf 4°C ab.

Im Anschluss erfolgte die allelische Diskriminierung mittels Cluster Plots im TaqMan® 7900HT.

Die PCR erfolgte fluoreszenzbasiert, um zwischen möglicher Homozygotie oder Heterozygotie unterscheiden zu können. Grundlegend für die Quantifizierung der DNS dient die Bindung eines fluoreszierenden Reporter-Farbstoffes an das 5'-Ende des SNPs und eines nicht fluoreszierenden Quencher an das 3'-Ende des SNPs. Als Farbstoffe für den Reporter dienen FAM™ (6-Carboxyfluorescein) und VIC™ (Patent von Applied Biosystems). Bei intaktem SNP führt die räumliche Nähe von Reporter und Quencher zu einer Unterdrückung der Fluoreszenz des Reporters durch den Quencher. Diese Unterdrückung basiert auf dem sogenannten Fluoreszenzresonanzenergietransfers (FRET, Förster-Resonanzenergietransfer), wobei der Reporter den Fluoreszenz-Doner darstellt und der Quencher den Fluoreszenz-Akzeptor. Bindet der SNP während des Annealings der PCR an die zugehörige DNS-Sequenz, so spaltet die 5'-Nukleaseaktivität der Taq-DNS-Polymerase den SNP während der Elongation. Dieses führt zu einer Abspaltung des Reporters und damit zu einer Entfernung von Reporter und Quencher voneinander (Abbildung 3, Anhang 4). Durch diese Trennung hemmt der Quencher nicht mehr das Fluoreszenzsignal des Reporters und die Fluoreszenzintensivität kann in der anschließenden allelischen Diskrimination nachgewiesen werden [Applied Biosystems].

Durch Verwendung von zwei Farbstoffen (FAM™ und VIC™), die spezifisch den zwei möglichen Allelen der Probanden zugeordnet waren, können die homozygoten Probanden mit zwei Allelen ohne Polymorphismus, die Heterozygoten mit einem Allel mit Polymorphismus und die homozygoten Kinder mit dem Polymorphismus auf beiden Allelen eindeutig voneinander unterschieden werden. Die Farbstoffe fluoreszieren bei unterschiedlichen Wellenlängen, so dass heterozygote Merkmalsträger bei zwei Wellenlängenbereichen Ausschläge aufweisen.

Diese allelische Diskrimination erfolgte mit Hilfe der Sequence Detecting System-Software (Applied Biosystems) im TaqMan® nach der PCR. Die Daten werden automatisch graphisch angezeigt. Das entstandene Koordinatensystem zeigt die Allelzugehörigkeit und die quantitative Allelhäufigkeit. Im besten Falle entstehen drei voneinander abgrenzbare Gruppen. Positionen, die die Software nicht sicher zuordnen kann, bleiben mit einem „X“ markiert und konnten manuell zugeordnet

werden (Abbildung 4, Anhang 5). Als Kontrolle der Qualität der vorausgegangenen Arbeit dienten vorher festgelegte Leerwerte ohne kindliche DNS. Diese Leerwerte mussten ohne Ausschläge bleiben. Ab zwei oder mehr Verunreinigungen wurde die Platte verworfen und die SNP-Replikation, sowie die TaqMan®-PCR, wiederholt.

2.8. Datenbanken

Die Speicherung der Daten erfolgt in zwei Datenbanken. In der ersten Datenbank befinden sich alle Informationen über den ersten Krankenhausaufenthalt und die persönlichen Daten der Frühgeborenen. Zu diesen Daten gehören zum Beispiel der Name des Kindes, die betreuende Klinik, das Geburtsdatum, der Tod eines Kindes, die Anzahl der Dokumentationsbögen und die Anschrift der Eltern für die nachfolgenden Elternfragebögen. Die klinischen Daten der Kinder sind in der zweiten Datenbank gespeichert. Hierzu gehören die Informationen der Elternfragebögen (die Follow-Up-Daten) und die Daten der 5-Jahres Untersuchungen. In der zweiten Datenbank sind keine Namen der Kinder gespeichert, damit der Datenschutz gewährleistet wird. Die Verknüpfung der beiden Datenbanken erfolgt durch Kopfdaten, die unabhängig von der Datenbank immer benötigt werden. Diese Kopfdaten entsprechen den pseudonymisierten Kennnummern der teilnehmenden Kinder. Die Daten der Untersuchungsfragbögen zur 5-Jahres-Nachuntersuchung sind in einer SPSS®-Datei gespeichert. Mithilfe der SPSS®-Datei kann wiederum auf alle Datenbanken zugegriffen werden und Korrelationen erstellt werden.

2.9. Auswertung

Die statistische Auswertung aller erhobenen Daten erfolgte mit SPSS[®], Version 22.0. Zur Testung der Zusammenhänge zwischen den unverbundenen nominal- und ordinalskalierten Daten wurde der T-Test angewendet. Bei bivariaten Daten wurde der Fisher's exact test zur genaueren Bestimmung des p-Wertes verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt, dieses entspricht einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 5\%$, also einer Wahrscheinlichkeit von 5%, dass die Nullhypothese (der genetisch errechnete Vitamin D-Mangel durch die untersuchten SNPs hat keinen Einfluss auf die Entwicklung der Frühgeborenen) fälschlicherweise verworfen wurde.

2.10. Ethikvotum

Der Ethikantrag für die GNN-Studie wurde von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck am 27.06.2008 genehmigt. Dieser liegt unter dem Aktenzeichen 08-022 vor, wie auch die Ethikvoten der teilnehmenden Kliniken und die Einverständniserklärungen der Erziehungsberechtigten.

3. Ergebnisse

3.1. Studienpopulation

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die isolierte DNS von 13.096 Kindern aus den Jahren 2009 bis einschließlich 2015 untersucht. Die Abbildung 2 zeigt die Anzahl der eingeschlossenen Kinder in die GNN-Studie, die absoluten Häufigkeiten der untersuchten SNPs und die im Alter von fünf Jahren nachuntersuchten Kinder. Die genaue Zuteilung zu dem jeweiligen Genotyp erfolgte, wie oben beschrieben, mit Hilfe der fluoreszenzbasierten PCR und der allelischen Diskrimination. Im Rahmen der allelischen Diskrimination wurden Allelpositionen, die von dem Computer nicht automatisch zugeordnet werden konnten, manuell zugeordnet. Es entstanden drei Allelwolken, eine für jeden möglichen Genotyp. Allelpositionen, die auch manuell nicht eindeutig zuzuordnen waren, wurden in der Auswertung nicht mit berücksichtigt (Abbildung 4, Anhang 5). Bei dem SNP rs7944926 blieben 1.000 (7,64%) der untersuchten Proben ungültig, bei rs12794714 waren es 883 Proben (6,74%) und bei rs2282679 konnten bei 1.032 Kindern (7,88%) die Allelpositionen nicht eindeutig zugeordnet werden. Da bei dem SNP rs6013897 bei 2.329 (17,78%) der Proben keine eindeutige Zuordnung möglich war, wurde rs6013897 nicht in die Auswertung mit einbezogen.

Bei 11.568 Kindern konnten alle drei SNPs bestimmt werden. Weitere 38 Kinder wurden von der Analyse ausgeschlossen, weil keine Daten zur Sonografie des Gehirns vorlagen. Bis zur Datenauswertung für diese Arbeit wurden insgesamt 2.085 Kindern nachuntersucht. Auch dieser Wert wurde nicht in allen Datensätzen erreicht. Dieses erklärt sich durch Nichtdurchführbarkeit einiger Messungen bei der 5-Jahresnachuntersuchung, zum Beispiel auf Grund von Verweigerung der Kinder.

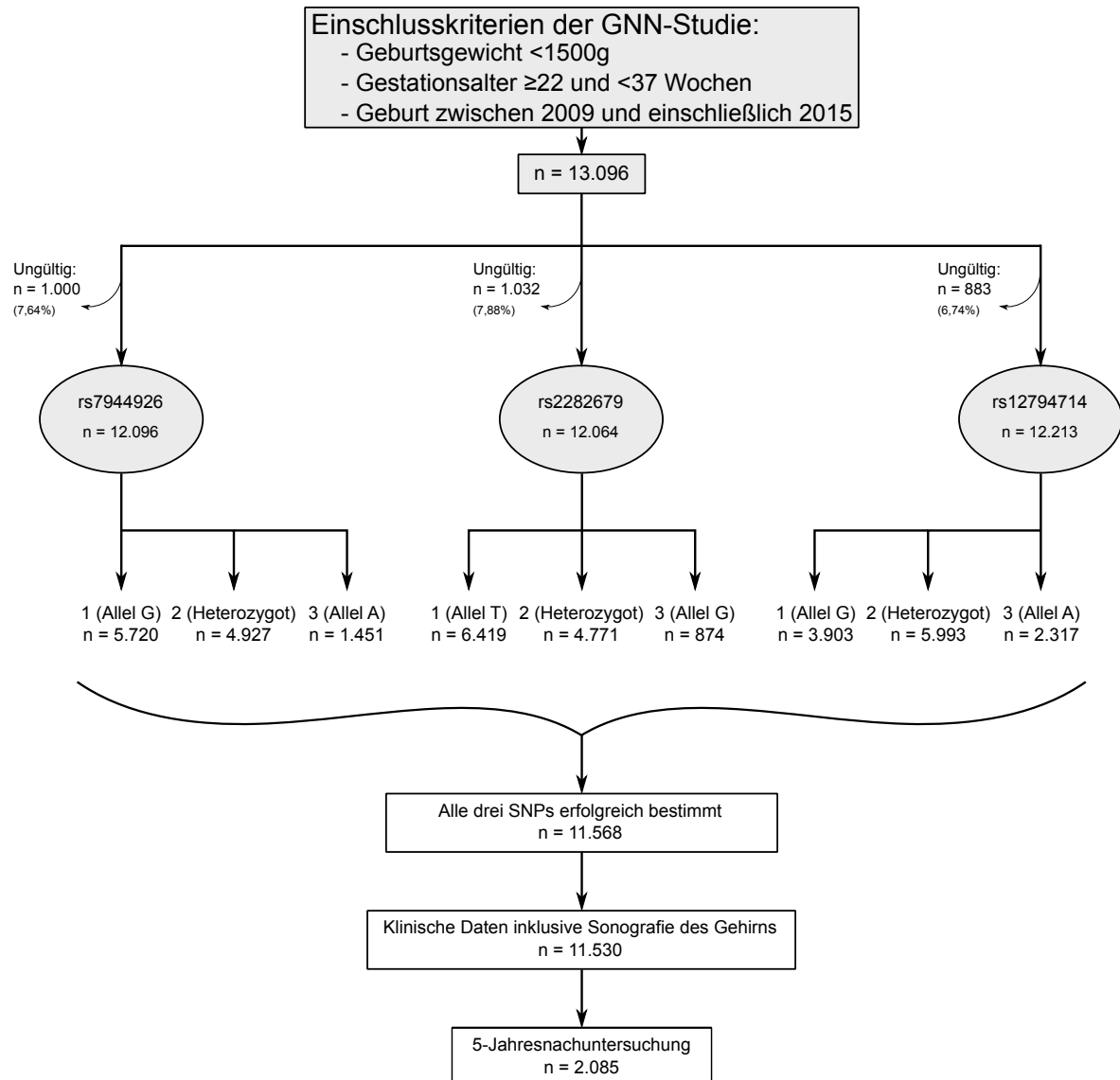


Abbildung 2: Studienpopulation

Die Berechnung des Vitamin D-Spiegels erzielte ein n von 11.568 Kindern. Der Tabelle 3 ist die Auswirkung der addierten drei SNPs auf den Vitamin D Spiegel zu entnehmen.

Tabelle 3: Reduktion des Vitamin D-Spiegels durch die SNPs

Das Minimum von -15,0nmol/l Reduktion des Vitamin D-Spiegels ergibt sich bei Kindern mit Homozygotie für das reduzierende Allel in allen drei SNPs. Tritt dieser Fall ein, ergibt sich folgende Rechnung: $2*(-2,0\text{nmol/l})+2*(-3,0\text{nmol/l})+2*(-2,5\text{nmol/l})=-15,0\text{nmol/l}$

Genetisch errechneter	Mittelwert	-5,26
Vitamin D-Spiegel	Maximum	0,00
[nmol/l]	Median	-5,00
	Minimum	-15,00
	Perzentile 25	-7,50
	Perzentile 75	-3,00
	Standardabweichung	2,94
	Gültige Anzahl	11.568

Die Frühgeborenen wurden, basierend auf dem genetisch errechneten Vitamin D-Spiegel, in drei Gruppen unterteilt: Niedriger (< 20. Perzentile), Mittlerer (20. bis 80. Perzentile) und Hoher (> 80. Perzentile) Vitamin D-Spiegel. Die Tabelle 4 zeigt diese Einteilung.

Tabelle 4: Ergebnisse der Berechnung der genetisch bedingten Reduktion des Vitamin D-Spiegels: Einteilung in niedrige, mittlere und hohe Vitamin D-Spiegel

Einteilung (Perzentilen)	n [%]
Niedriger Spiegel (< P20) (-15,0nmol/l bis -7,6nmol/l)	2.342 [20,3]
Mittlerer Spiegel (P20-P80) (-7,5nmol/l bis -3,0nmol/l)	6.873 [59,4]
Hoher Spiegel (> P80) (-2,9nmol/l bis 0,0nmol/l)	2.353 [20,3]
Gesamt	11.568

Im Folgenden wurde ein Filter für alle Daten angewendet, so dass nur noch Kinder berücksichtigt wurden, bei denen alle drei SNPs bestimmt werden konnten, deren Gestationsalter ≥ 22 und < 37 Wochen lag und bei denen eine Sonografie des Ge-

hirns durchgeführt worden war. Übrig blieb eine Gesamtanzahl von 11.530 Kindern.

Der Tabelle 12 im Anhang 6 lässt sich die Verteilung der Kinder zu der Einteilung des Vitamin D-Spiegels, sortiert nach SNP, entnehmen. Die Tabelle zeigt, dass sich kein Kind in der Gruppe mit dem hohen Vitamin D-Spiegel befindet, das beide reduzierende Allele besitzt.

In der Tabelle 13 (Anhang 7), in den Abbildungen 5 und 6 (Anhang 8) und in der Tabelle 14 (Anhang 9) sind Daten dargestellt, die nicht durch die Prüfung der Hypothesen abgedeckt werden. Die Tabelle 13 beinhaltet die Geschlechterverteilung und die prozentuale Häufigkeit von Mehrlingsgeburten im untersuchten Kollektiv. Der Vergleich von niedrigen und hohen Vitamin D-Spiegeln ergibt keine Signifikanz. Die Herkunft der Mutter der untersuchten Kinder ist in der Abbildung 5 gezeigt, die Zuordnung der Vitamin D-Spiegel der Kinder zu den jeweiligen Herkunftsländern der Mütter in Abbildung 6. Typische Komplikationen von Frühgeborenen oder deren Behandlung sind als prozentuale Häufigkeiten in der Tabelle 14 dargestellt.

3.2. Körpermaße bei Geburt und im Alter von fünf Jahren

In der Tabelle 5 sind das Geburtsgewicht, das Gestationsalter und die prozentuale Anzahl von Kindern, bei denen die Körperlänge oder das Geburtsgewicht unter der zehnten Perzentile der statistischen Normalverteilung liegt (small for gestational age, SGA), aufgezeigt [Voigt et al., 2012]. Außerdem zeigt die Tabelle 5 die Daten zu dem Gewicht, dem Kopfumfang und der Körperlänge der Kinder bei der 5-Jahresnachuntersuchung. Die Verteilung der Daten folgt der vorherigen Einteilung nach dem genetisch errechneten Vitamin D-Spiegel.

Wie der Tabelle 5 zu entnehmen ist, finden sich bezüglich der verschiedenen Vitamin D-Spiegel keine signifikanten Unterschiede. Die Kinder mit Vitamin D-Mangel kommen weder früher noch leichter zur Welt. Alleine bei der 5-Jahresnachuntersuchung fällt eine Signifikanz der Körpergröße der Kinder auf.

Kinder mit einem niedrigen Vitamin D-Spiegel waren 1cm länger als die Kinder mit einem hohen Spiegel.

Tabelle 5: Geburtsgewicht, Gestationsalter und Gewicht, Kopfumfang und Körperlänge mit fünf Jahren in Abhängigkeit von den genetisch errechneten Vitamin D-Spiegeln

Genetisch errechneter Vitamin D-Spiegel	Niedrig (< P20) (n)	Mittel (P20-P80) (n)	Hoch (> P80) (n)	p*
Geburtsgewicht [g]	1.053 ± 302 (2336)	1.061 ± 307 (6849)	1.053 ± 304 (2345)	0,96
Gestationsalter [Wochen]	28,7 ± 2,7 (2336)	28,7 ± 2,7 (6849)	28,6 ± 2,7 (2345)	0,45
SGA** [%]	19,2 (2336)	17,6 (6849)	18,8 (2345)	0,74
Gewicht mit 5 Jahren [kg]	18,7 ± 3,4 (421)	18,6 ± 3,5 (1240)	18,4 ± 3,1 (424)	0,14
Kopfumfang mit 5 Jahren [cm]	50,3 ± 1,7 (421)	50,3 ± 1,9 (1240)	50,3 ± 1,9 (424)	0,61
Körperlänge mit 5 Jahren [cm]	112,8 ± 6,3 (421)	112,4 ± 6,2 (1240)	111,8 ± 6,0 (424)	0,02

* p-Werte sind für niedrige (< P20) vs. hohe (> P80) Vitamin D-Spiegel angegeben.

Fisher's exact test für SGA; T-Test für alle anderen Werte.

Außer bei SGA, sind alle Werte als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

** Neugeborene unter der zehnten Neugeborenenperzentile nach Voigt

3.3. Blutdruck am ersten Lebenstag und im Alter von fünf Jahren

Die kardiovaskulären Parameter werden in Tabelle 6 dargestellt, unterteilt in den niedrigsten mittleren arteriellen Druck am ersten Lebenstag und die Blutdruckwerte der 5-Jahresnachuntersuchung. Die Blutdruckperzentilen für Frühgeborene werden in Abhängigkeit des Gestationsalters angegeben. Je früher ein Kind zur Welt kommt, desto geringer ist der Blutdruck. Auch liegen die Normwerte für den Blutdruck am ersten Tag unter denen der Folgetage [Maier et al., 2017]. Die S2-Leitlinie zur arteriellen Hypertonie im Kindes- und Jugendalter definiert einen nor-

malen Blutdruck des Fünfjährigen als einen Druck unter der 90. Perzentile. Dieses entspricht bei Jungen einem Druck von $<113/72\text{mmHg}$ mit einem mittleren arteriellen Druck von $<86\text{mmHg}$ und bei Mädchen von $<112/72\text{mmHg}$ mit einem MAD von $<85\text{mmHg}$ [S2-Leitlinie, 2013].

In der Tabelle 6 zeigen sich keine signifikanten Unterschiede des Blutdrucks zwischen den Kindern der verschiedenen Vitamin D-Spiegel beim ersten Krankenhausaufenthalt, wie auch bei der Nachuntersuchung mit fünf Jahren.

Tabelle 6: Blutdruck am ersten Lebenstag und bei der 5-Jahres Nachuntersuchung in Abhängigkeit von den genetisch errechneten Vitamin D-Spiegeln

Genetisch errechneter Vitamin D-Spiegel	Niedrig ($< P20$) (n)	Mittel ($P20$-$P80$) (n)	Hoch ($> P80$) (n)	p*
MAD minimal am ersten Lebenstag	$28,3 \pm 6,8$ (2229)	$28,1 \pm 6,7$ (6489)	$28,0 \pm 6,6$ (2220)	0,15
Systolischer Wert mit 5 Jahren	$99,0 \pm 9,0$ (404)	$98,7 \pm 9,4$ (1181)	$98,7 \pm 9,8$ (409)	0,67
Diastolischer Wert mit 5 Jahren	$56,9 \pm 9,3$ (404)	$57,1 \pm 9,6$ (1181)	$57,1 \pm 8,6$ (409)	0,73
MAD mit 5 Jahren	$70,8 \pm 8,1$ (404)	$70,9 \pm 8,4$ (1181)	$71,2 \pm 8,3$ (409)	0,48

* p-Werte (T-Test) sind für niedrige ($< P20$) vs. hohe ($> P80$) Vitamin D-Spiegel angegeben. Alle Werte sind in mmHg als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben.

3.4. Beatmung, Surfactantgabe, bronchopulmonale Dysplasie und Lungenfunktion mit fünf Jahren

Die Tabelle 7 zeigt die pulmonologischen Messwerte der untersuchten Kinder, in Abhängigkeit vom genetisch errechneten Vitamin D-Spiegel.

Die hohe Anzahl an Kindern mit Surfactantsubstitution in dieser Arbeit erklärt sich durch die häufig auch prophylaktische Gabe von Surfactant bei kleinen Frühgeborenen [Maier et al., 2017].

Eine FEV₁ gilt dann als normal, wenn sie mindestens 80% vom Soll beträgt [S2k-Leitlinie, 2015].

Für keinen der untersuchten Endpunkte konnten statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gezeigt werden.

Tabelle 7: Beatmung und pulmonales Outcome in Abhängigkeit von den genetisch errechneten Vitamin D-Spiegeln

Genetisch errechneter Vitamin D-Spiegel	Niedrig ($< P20$) (n)	Mittel ($P20-P80$) (n)	Hoch ($> P80$) (n)	p*
Maximaler FiO ₂ *** in den ersten 12 Stunden [%]	39 ± 22 (2287)	39 ± 22 (6688)	40 ± 22 (2297)	0,75
Sauerstoffbedarf [Tage]	32 ± 41 (1820)	32 ± 43 (5315)	31 ± 39 (1822)	0,52
Surfactant [%]	59,0 (2331)	59,5 (6844)	61,3 (2343)	0,11
Tracheale Beatmung [%]	48,8 (2331)	48,2 (6835)	50,1 (2336)	0,38
Beatmungstage total [Tage]	7,0 ± 17,1 (2323)	6,7 ± 14,7 (6805)	6,7 ± 14,9 (2323)	0,41
BPD** [%]	16,7 (2336)	16,6 (6844)	16,9 (2344)	0,88
FEV ₁ **** mit 5 Jahren [%]	88,4 ± 16,0 (373)	87,6 ± 16,6 (1066)	89,3 ± 17,1 (372)	0,49
FEV ₁ < 80% mit 5 Jahren [%]	26,8 (373)	31,1 (1066)	28,0 (372)	0,74

* p-Werte sind für niedrige ($< P20$) vs. hohe ($> P80$) Vitamin D-Spiegel angegeben.

Die Werte maximaler O₂-Bedarf in den ersten 12h, Sauerstoffbedarf, Beatmungstage total und FEV₁ sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

Fisher's exact test für Surfactant, tracheale Beatmung und BPD; T-Test für alle anderen Werte.

** Sauerstoff mit 36±0 SSW; *** Inspiratorische Sauerstofffraktion (Anteil von Sauerstoff im Inspirationsgas); **** Expiratorische Einsekundenkapazität/forciertes expiratorisches Volumen

3.5. Dauer des stationären Aufenthaltes

In der Tabelle 8 sind die Ergebnisse der Hypothese, dass ein Vitamin D-Mangel zu einem verlängerten Krankenhausaufenthalt führt, dargestellt. Im Mittel verbrachten die Kinder dieser Arbeit 68 Tage nach ihrer Geburt stationär. Nach den Erhebungen dieser Arbeit erreichte die Hypothese des verlängerten Aufenthalts keine Signifikanz.

Tabelle 8: Anzahl der stationären Tage in Abhängigkeit von den genetisch errechneten Vitamin D-Spiegeln

Genetisch errechneter Vitamin D-Spiegel	Niedrig ($< P20$) (n)	Mittel ($P20-P80$) (n)	Hoch ($> P80$) (n)	p*
<i>Tage stationär</i> [Tage]	68 ± 36 (2336)	68 ± 38 (6849)	69 ± 37 (2345)	0,73

* p-Werte (T-Test) sind für niedrige ($< P20$) vs. hohe ($> P80$) Vitamin D-Spiegel angegeben.

Die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

3.6. Stationäre Todesfälle

Tabelle 9 beleuchtet die Hypothese der erhöhten Mortalität durch einen Vitamin D-Mangel. Diese Hypothese ist hier als Vergleich der prozentualen Häufigkeit der stationären Todesfälle in den Gruppen der errechneten Vitamin D-Spiegel dargestellt. Die Hypothese konnte mit diesen Daten nicht bestätigt werden.

Tabelle 9: Mortalität in Abhängigkeit von den genetisch errechneten Vitamin D-Spiegeln

Genetisch errechneter Vitamin D-Spiegel	Niedrig ($< P20$) (n)	Mittel ($P20-P80$) (n)	Hoch ($> P80$) (n)	p*
Tod (stationär) [%]	2,7 (2336)	3,3 (6849)	2,9 (2345)	0,72

* p-Werte (Fisher's exact test) sind für niedrige ($< P20$) vs. hohe ($> P80$) Vitamin D-Spiegel angegeben

3.7. Hirnblutung, periventrikuläre Leukomalazie, Cerebralparese und Intelligenzquotient mit fünf Jahren

In Tabelle 10 sind die zerebralen Pathologien dargestellt, die noch heute ein spezifisches Problem von sehr unreifen Frühgeborenen darstellen. Eines der häufigsten Probleme ist die Hirnblutung, die durch die Unreife des Gehirns von Frühgeborenen in ihrer Entstehung begünstigt ist.

Weder die zerebralen Pathologien, noch ein unterdurchschnittliches Abschneiden im Intelligenztest bei der 5-Jahresnachuntersuchung erlangten in dieser Arbeit beim Vergleich von niedrigen mit hohen Vitamin D-Spiegeln Signifikanz.

Tabelle 10: Hirnblutungen, PVL, Cerebralparesen und Intelligenzquotient mit fünf Jahren in Abhängigkeit von den genetisch errechneten Vitamin D-Spiegeln

Genetisch errechneter Vitamin D-Spiegel	Niedrig ($< P20$) (n)	Mittel ($P20$-$P80$) (n)	Hoch ($> P80$) (n)	p*
Hirnblutung [%]	16,5 (2336)	16,6 (6849)	16,8 (2345)	0,81
IVH-Grad 1 [%]	6,9	6,6	6,8	0,33
IVH-Grad 2 [%]	3,4	4,4	4,4	
IVH-Grad 3 [%]	3,2	2,6	2,6	
IVH-Grad 4 [%]	2,7 (2331)	2,8 (6844)	2,9 (2343)	
PVL [%]	2,6 (2333)	3,0 (6840)	2,7 (2341)	0,93
CP (GMFCS >1) mit 5 Jahren [%]	4,7 (408)	5,1 (1194)	3,4 (410)	0,38
Gesamt-IQ mit 5 Jahren	99,0 $\pm$ 12,9 (372)	96,7 $\pm$ 15,0 (1114)	97,6 $\pm$ 14,2 (386)	0,18
IQ < 85 mit 5 Jahren [%]	9,9 (372)	17,5 (1114)	13,5 (386)	0,14
IQ < 70 mit 5 Jahren [%]	2,2 (372)	4,8 (1114)	3,4 (386)	0,38

* p-Werte sind für niedrige ($< P20$) vs. hohe ($> P80$) Vitamin D-Spiegel angegeben.

Gesamt-IQ ist als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben.

Chi-Quadrat Test für Blutungsgrad, T-Test für Gesamt-IQ mit 5 Jahren, Fisher's exact test für alle anderen Variablen

3.8. Frakturen und Hüftgelenksdysplasien

Die bekannteste Wirkung eines Vitamin D-Mangels ist die Mineralisierungsstörung des Knochens, mit klinischen Zeichen der Rachitis im Kindesalter und Osteomalazie und Osteoporose im Erwachsenenalter. Die Tabelle 11 stellt die Hypothese dar, dass ein genetisch errechneter Vitamin D-Mangel bei den Kindern zu vermehrten Frakturen und Hüftgelenksdysplasien führt.

Die p-Werte für den Vergleich von niedrigen und hohen Vitamin D-Spiegeln zeigen keine Signifikanz der Hypothese zu vermehrten Frakturen und Hüftgelenksdysplasien.

Tabelle 11: Frakturen und Hüftgelenksdysplasien in Abhängigkeit von den genetisch errechneten Vitamin D-Spiegeln

Genetisch errechneter Vitamin D-Spiegel	Niedrig ($< P20$)	Mittel ($P20-P80$)	Hoch ($> P80$)	p*
	(n)	(n)	(n)	
<i>Verletzung (Behandlung durch Arzt) [%]</i>	16,0 (388)	14,3 (1130)	13,8 (391)	0,42
<i>Fraktur (jemals) [%]</i>	2,3 (391)	1,6 (1155)	1,3 (396)	0,30
<i>Hüftgelenksdysplasie $\geq$ 2 nach Graf [%]</i>	4,0 (1359)	4,6 (3789)	4,1 (1369)	0,92

* p-Werte (Fisher's exact test) sind für niedrige ($< P20$) vs. hohe ($> P80$) Vitamin D-Spiegel angegeben.

4. Diskussion

Eine Vielzahl von wissenschaftlichen Arbeiten beschreiben Assoziationen eines erniedrigten maternalen oder kindlichen Vitamin D-Spiegels mit relevanten kurzfristigen und langfristigen Endpunkten. In den meisten Arbeiten wurde der Vitamin D-Spiegel direkt im Blut gemessen, viele neuere Arbeiten verwendeten aber bereits die Berechnung des Vitamin D-Spiegels auf der Basis von genetischen Variationen [Afzal et al., 2014; Vimalaswaran et al., 2014]. Diese Methode wurde auch in der vorliegenden Arbeit angewandt, um die Vielzahl von vorbeschriebenen Assoziationen an einer großen Kohorte mit standardisierter Datenerhebung zu testen. Wir konnten keine der vorbeschriebenen Assoziationen bestätigen. In der folgenden Diskussion sollen mögliche Ursachen für diese fehlende Übereinstimmung erörtert werden.

Eine große Stärke dieser Studie ist die große Studienpopulation. Es wurden die neonatalen Daten von 11.530 Frühgeborenen untersucht und 2.085 Kinder im Alter von fünf Jahren nachuntersucht.

Es könnte bei der Erhebung der Daten zum ersten Krankenhausaufenthalt der Kinder zu Unterschieden gekommen sein, da mehrere Kinderkliniken und Personen an der Datengewinnung beteiligt waren. Das jährliche Monitoring der teilnehmenden Kliniken durch das geschulte Team aus der Studienzentrale diente dem Zweck der Minimierung dieser Art von Fehler. Die Elternfragebögen waren an denen der KiGGS-Studie vom Robert-Koch-Institut angelehnt, da so eine Vergleichbarkeit mit anderen Studien und eine hohe Reproduzierbarkeit gewährleistet wird. Trotzdem könnten diese Fragebögen eine Fehlerquelle darstellen, da sich eventuell nicht alle Eltern an die abgefragten Gegebenheiten erinnern konnten. Die Untersuchungen folgten klaren Standards und Bewertungsmaßstäben, so dass es auch hier kaum zu Unterschieden in der Durchführung innerhalb des Teams kommen konnte, wobei kleine Differenzen in der Bewertung der Kinder nicht auszuschließen sind.

Eine mögliche Fehlerquelle besteht auch bei der Durchführung der PCR, da es hier zu Verunreinigungen, Pipettierfehlern und Übertragungsfehlern kommen kann.

Durch die Überprüfung der Leerwerte wurde versucht diese Fehler zu vermeiden, doch sie sind nicht ausgeschlossen.

Sehr hilfreich für diese Arbeit war, dass der reduzierende Einfluss einzelner SNPs auf den Vitamin D-Status bekannt und erforscht ist, so dass es sich auf einen nachgewiesenen Einfluss der untersuchten SNPs verlassen werden konnte. Dieses Wissen ermöglichte außerdem die statistische Errechnung des Vitamin D-Spiegels der Kinder. Ein genaues Messen des Vitamin D-Spiegels hätte eine Blutentnahme erfordert. Dieses hätte möglicherweise zu genaueren Vitamin D-Werten geführt, allerdings wäre die Fallzahl, die in dieser Arbeit erreicht wurde, in einem dann prospektiven Studiendesign kaum realisierbar gewesen.

Des Weiteren beeinflusst die Auswahl der SNPs die Ergebnisse der Daten. Jiang et al. konnten in genomweiten Assoziationsstudien vier bereits bekannte und zwei neue Genloci mit Einfluss auf den Vitamin D-Spiegel replizieren. Drei dieser Genloci sind kongruent mit denen aus dieser Arbeit [Jiang et al., 2018].

Auffällig ist, dass die Kinder von Müttern aus südlicheren Ländern als Deutschland (vor allem aus Asien und dem Nahen Osten) signifikant häufiger in der Gruppe mit den niedrigen Vitamin D-Spiegeln sind. Diese Auffälligkeit deckt sich mit den Erhebungen anderer Publikationen, beispielsweise bei Leffelaar et al., 2010.

4.1. Small for Gestational Age-Neugeborene von Müttern mit Vitamin D-Mangel

Einige Studien zeigen einen Zusammenhang eines Vitamin D-Mangels bei der Mutter mit einem erhöhten Risiko für SGA-Neugeborene (Small for Gestational Age). Bodnar et al. und Leffelaar et al. untersuchten jeweils die Auswirkungen eines Vitamin D-Mangels (Vitamin D-Spiegel von $<37,5\text{nmol/l}$ bei Bodnar et al. und $<29,9\text{nmol/l}$ bei Leffelaar et al.) anhand von $25(\text{OH})\text{D}$ -Bestimmungen in der frühen Schwangerschaft. Dieses unterscheidet sie von anderen Studien, welche häufig erst zu späteren Zeitpunkten der Schwangerschaft den Vitamin D-Status gemessen haben. Im dritten Trimester findet das stärkste Wachstum der Feten statt, wohingegen der Wachstumspfad der Knochen schon ab der frühen Schwangerschaft

besteht und somit die Knochenentwicklung schon im ersten Trimester beginnt. Leffelaar et al. bezogen nur reifgeborene Neugeborene (≥ 37 . SSW) in ihre Studie mit ein, führten aber mit 1, 3, 6, 9 und 12 Monaten erneute Nachuntersuchungen der Größe und des Gewichts durch. Diese Nachuntersuchungen zeigten, dass Kinder von Müttern mit einem Vitamin D-Mangel mit einem signifikant reduzierten Geburtsgewicht ($-114,4\text{g}$, $p < 0,001$) als Kinder von Müttern mit einer suffizienten Vitamin D-Versorgung geboren wurden. Des Weiteren zeigten die Neonaten von mangelversorgten Müttern ein gesteigertes Wachstum im ersten Lebensjahr; sie waren im ersten Monat kleiner als die Kontrollgruppe, aber größer im zwölften Monat ($p < 0,01$) [Bodnar et al., 2010; Leffelaar et al., 2010]. Auch konnten Yadama et al. eine Korrelation zwischen einem Vitamin D-Mangel in der frühen Schwangerschaft und dem vermehrten Auftreten von Frühgeburten zeigen. Die Studiengröße war aber sehr gering ($n = 24$) [Yadama et al., 2020].

Aufgrund dieser Studien, die die Auswirkungen eines maternalen Vitamin D-Mangels auf die Neugeborenen untersuchten, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass Frühgeborene mit einer genetischen Prädisposition für niedrige Vitamin D-Spiegel häufiger als SGA-Frühgeborene zur Welt kommen müssten. An der Studienpopulation der vorliegenden Arbeit wurde die Assoziation eines genetisch vorbestimmten Vitamin D-Mangels mit einem erniedrigten Geburtsgewicht, Gestationsalter und Gewicht, Kopfumfang und Körperlänge mit fünf Jahren untersucht. Alle erhobenen Daten sind erstaunlich ähnlich im Vergleich von niedrigen, mittleren und hohen Vitamin D-Spiegeln. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Gale et al., die die Vitamin D-Spiegel der Mütter im dritten Trimenon maßen und die Neugeborenen nach der Geburt, mit neun Monaten und mit neun Jahren nachuntersuchten. Auch hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in Gewicht und Größe der Kinder im Vergleich zu der $25(\text{OH})\text{D}$ -Konzentration der Mutter [Gale et al., 2008]. In unserer Studie zeigte sich eine inverse Relation der Körpergröße mit fünf Jahren mit den genetisch geschätzten Vitamin D-Spiegeln. Frühgeborene mit Vitamin D-Spiegeln unter der 20. Perzentile waren um etwa 1cm länger als Frühgeborene mit einem Vitamin D-Spiegel über der 80. Perzentile. Aufgrund der Vielzahl der in dieser Arbeit getesteten Hypothesen kann es sich hierbei auch um eine zufällige Assoziation handeln, zumal eine kürzlich publizierte

randomisierte Studie keinen Effekt einer Vitamin D-Supplementierung auf das Längenwachstum im Alter von einem Jahr zeigen konnte [Roth et al., 2018].

4.2. Hypertension und kardiovaskuläre Erkrankungen

Die Wirkung des Vitamin D auf den Blutdruck basiert auf einer Hemmung der Renin-Synthese in den Zellen des juxtaglomerulären Apparates in der Niere durch Calcitriol. Renin stimuliert das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) durch eine proteolytische Spaltung des Angiotensinogens in Angiotensin I. Die Aktivierung des RAAS bewirkt eine Blutdrucksteigerung. Die Daten von Vaidya et al. zeigten an 223 an Hypertonie erkrankten Personen eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) inverse Beziehung zwischen 25(OH)D und dem RAAS und der Plasma-Renin-Aktivität im Blut. Sie bezeichnen Vitamin D als Antagonisten zu Renin, also mit einer blutdrucksenkenden Funktion [Vaidya et al., 2011]. Tomaschitz et al. konnten zusätzlich zeigen, dass zudem 1,25(OH)₂D die Renin-Synthese in der Niere inhibiert [Tomaschitz et al., 2010]. Vimalaswaran et al. untersuchten anhand von Allel-Scores den Einfluss eines genetisch bedingten Vitamin D-Mangels auf den Blutdruck. Drei von den vier untersuchten SNPs entsprachen denen dieser Arbeit: rs12794714 (CYP2R1), rs2282679 (GC) und rs6013897 (CYP24A1). Der vierte SNP lag auf dem DHCR7-Gen. Der für diese Arbeit untersuchte SNP lag ebenfalls auf dem DHCR7-Gen, unterschied sich aber in der Basenpaarlokalisierung, so dass ein SNP verwendet wurde, der den Polymorphismus an gleicher Stelle im Vitamin-Syntheseweg aufweist, wie der bei Vimalaswaran et al. Ihre Untersuchungen an mehr als 100.000 Erwachsenen zeigten eine Assoziation von genetisch erhöhten Vitamin D-Spiegeln mit einem erniedrigten systolischen Blutdruck und einem gesenkten Hypertonierisiko [Vimalaswaran et al., 2014].

Aus diesen Untersuchungen bei Erwachsenen, die einen signifikanten positiven Einfluss von hohem Vitamin D auf den Blutdruck zeigten, wurde die Hypothese gebildet, dass sich ein Vitamin D-Mangel bei Neugeborenen negativ auf den mittleren arteriellen Blutdruck am ersten Lebenstag auswirken müsste. Des Weiteren wurde diese Hypothese bei den 5-Jahresnachuntersungen anhand des systoli-

schen, des diastolischen und des mittleren arteriellen Blutdrucks getestet. Die Daten dieser Arbeit konnten keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen zeigen, was einen signifikanten Einfluss eines Vitamin D-Mangels auf den Blutdruck bei Neugeborenen und Kindern fraglich macht. Eine Erklärung für die signifikanten Ergebnisse bei Erwachsenen in den dargestellten Studien, aber nicht bei Kindern in dieser Arbeit könnte sein, dass die erhöhte Plasma-Renin-Konzentration über längere Zeit eine Prädisposition für arterielle Hypertonie, sinkende glomeruläre Filtrationsrate und einem hieraus folgenden chronischen kardiovaskulären Schaden darstellt [Tomaschitz et al., 2010].

4.3. Verschlechterte Lungenfunktion

Eine mögliche Erklärung für die Wirkung von Vitamin D auf die Lungenfunktion gibt der Nachweis des Vitamin D-Rezeptors in beispielsweise den glatten Muskelzellen der Atemwege, in den Surfactant-bildenden Zellen (Pneumozyten Typ II) und in fetalen Fibroblasten. Hier wirkt Vitamin D unter anderem durch die vermehrte Sekretion von proinflammatorischen Chemokinen und einer somit verbesserten Immunantwort [Litonjua, 2009]. In Tiermodellen konnten Lungenfunktionsstörungen und veränderte Lungenstrukturen bei neugeborenen Mäusen von Vitamin D unterversorgten Muttertieren nachgewiesen werden. Auch zeigten Hart et al. einen signifikanten Zusammenhang von einer beeinträchtigten Lungenentwicklung bei Sechsjährigen von Müttern mit einem Vitamin D-Mangel (der Z-Score (Standardabweichung der FEV₁, pathologisch ab $\leq -1,645$) betrug 0,33 weniger, als bei Kindern von Müttern mit suffizienten Vitamin D-Spiegeln). Dieses äußerte sich in einer verringerten forcierten Vitalkapazität und in vermehrtem Giemen bei den Kindern [Hart et al., 2015]. „The Childhood Asthma Management Program“ berichtete, dass Kinder mit Asthma, die inhalative Glukokortikoide zur Asthmakontrolle verwendeten, eine signifikante Verbesserung ihrer expiratorischen Einsekundenkapazität über ein Jahr hatten, wenn ihr Vitamin D-Spiegel ausreichend war. Dieses unterstützt die Hypothese, die auch Litonjua aufstellte, dass sich eine ausreichende Versorgung mit Vitamin D positiv auf die Glukokortikoidsensibilität aus-

wirkt. Auch zeigten Wu et al., dass Kinder mit Asthma mit suffizienter Vitamin D-Versorgung eine verbesserte Lungenfunktion haben. Eine neuere Studie von Litonjua weist ebenfalls darauf hin, dass eine ausreichende Vitamin D-Supplementierung zur Vorbeugung von kindlichem Asthma dienen könnte [Litonjua, 2009; Litonjua, 2019; Wu et al., 2012]. Ungeklärt bleibt, ob dieser Einfluss nur dem Vitamin D ursächlich zuzuschreiben ist, oder ob gesündere Kinder generell mehr draußen sind und somit einen besseren Vitamin D-Spiegel aufweisen.

Auch diese Untersuchungen decken sich nicht mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Viele weitere Studien lassen einen positiven Einfluss von Vitamin D auf die Lungenentwicklung vermuten. Flexeder et al. konnten beispielsweise eine signifikante Assoziation von höheren Vitamin D-Spiegeln und besseren FEV₁-Werten in der Spirometrie bei 15-Jährigen zeigen ($p=0,01$) [Flexeder et al., 2017]. Çetinkaya et al. zeigten einen signifikanten Zusammenhang von niedrigen Vitamin D-Spiegeln und einem vermehrten Auftreten von BPD bei Frühgeborenen ($p=0,0001$) [Çetinkaya et al., 2015]. Allerdings muss zur Arbeit von Cetinkaya kritisch angemerkt werden, dass die untersuchte Kohorte sehr klein war. Berichtet wurde über insgesamt nur 100 Frühgeborene, von denen 31 eine BPD entwickelten.

4.4. Verlängerter Aufenthalt auf der Intensivstation

Aufgrund der mannigfaltigen Wirkungen von Vitamin D auf verschiedene Organsysteme erklärt sich die Hypothese des verlängerten Aufenthaltes der Kinder mit Vitamin D-Mangel auf der Intensivstation. Hierbei sind vor allem die zuvor beschriebenen Auswirkungen von Vitamin D auf kardiovaskuläre Erkrankungen, schwere Hypocalcämien, schwere Infekte und schwere Verläufe von Septitiden, beispielsweise durch die Wirkung auf den Calciumhaushalt und den Einfluss auf das Immunsystem, zu nennen [McNally et al., 2012]. Die Publikationen von McNally et al. und Sanker et al. beleuchten beide die Aufenthaltslänge von schwerkranken Kindern (bis 17 Jahre) auf Intensivstationen, bei McNally et al. hauptsächlich mit chirurgischen Diagnosen und bei Sanker et al. vorrangig mit internistischen Krankheitsbildern. Beide zeigten eine signifikante Verlängerung der

Zeit auf der Intensivstation bei einem Vitamin D-Mangel der Kinder bei Aufnahme. Bei McNally et al. betrug die Verlängerung 1,92 Tage und bei Sankar et al. 3,5 Tage bei Vitamin D-Spiegeln von unter 20ng/ml. Auch zeigten beide, dass die Mehrheit der kritisch kranken Kinder einen Vitamin D-Mangel bei Aufnahme hatte [McNally et al., 2012; Sankar et al., 2016].

Für diese Arbeit wurde die Anzahl der Tage des ersten Krankenhausaufenthaltes nach Geburt verglichen. Die Frühgeborenen verbrachten im Durchschnitt 68 Tage im Krankenhaus. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen feststellen. Dieses könnte an der Tatsache liegen, dass in dieser Arbeit nur der erste Krankenhausaufenthalt der Neugeborenen betrachtet wurde und keine weiteren Krankenhausaufenthalte. Des Weiteren bezieht sich die retrospektive Betrachtung der Kinder der vorliegenden Arbeit nur auf die ersten fünf Lebensjahre und nicht wie in den dargestellten Publikationen auf Kinder bis zur Volljährigkeit.

Passend zu diesen Ergebnissen sind die Daten von Amrein et al., die keinen signifikanten Unterschied in der Länge des Krankenhausaufenthaltes bei kritisch kranken Erwachsenen in einer randomisierten, placebokontrollierten Doppelblindstudie zeigen konnten. Die Patienten erhielten entweder Vitamin D₃ oder ein Placebopräparat. Auch die Krankenhausmortalität blieb in dieser Studie unbeeinflusst [Amrein et al., 2014].

4.5. Erhöhte Mortalität

Als Grundlage der Hypothese der vermehrten stationären Todesfälle bei Vitamin D-Mangel diente die Veröffentlichung von Afzal et al. Afzal et al. untersuchten den Einfluss von SNPs in den Genen von DHCR7 und CYP2R1 auf eine erhöhte Mortalität. Zwei dieser SNPs (rs7944926 und rs12794717) wurden auch in dieser Arbeit untersucht. In der besagten Publikation konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer genetisch niedrigen Vitamin D-Konzentration bei Erwachsenen und einer erhöhten Mortalität aller Ursachen, aber nicht der kardiovaskulären Mortalität, gezeigt werden [Afzal et al., 2014]. In der Studienpopulation der vorlie-

genden Arbeit starben 353 von 11.530 Frühgeborenen während ihres ersten stationären Krankenhausaufenthaltes. Aufgeteilt in die Gruppen mit hohen, mittleren und niedrigen Vitamin D-Werten ergab sich keine Signifikanz für eine erhöhte Mortalität bei Kindern mit niedrigeren Vitamin D-Spiegeln. Afzal et al. wiesen vor allem auch ein erhöhtes Risiko für Todesfälle durch Krebserkrankungen bei Vitamin D-Mangel nach [Afzal et al., 2014]. Da Krebserkrankungen nicht zu den typischen Todesursachen von Neugeborenen gehören, könnte dieses erklären, wieso die vorliegende Arbeit keine signifikant erhöhte Mortalität von Frühgeborenen mit Vitamin D-Mangel zeigt.

Die Daten dieser Arbeit bestätigen die Ergebnisse der kürzlich publizierten randomisierten placebokontrollierten Doppelblindstudien von Roth et al. und Manson et al., die beide keinen Effekt einer Vitamin D-Supplementierung auf die Mortalität der Untersuchten zeigte. Roth et al. untersuchten Kinder im Alter von einem Jahr ($n = 1.164$), nachdem die Mütter in der Schwangerschaft eine Vitamin D-Supplementierung erhalten hatten. Manson et al. führten ihre Studie an Erwachsenen durch ($n = 25.871$), die über mehr als fünf Jahre eine Supplementierung mit Vitamin D erhielten [Manson et al., 2019; Roth et al., 2018].

4.6. Zerebrale Pathologien

Hart et al. beschreiben, dass Kinder von Vitamin D mangelversorgten Müttern eine reduzierte neurokognitive Entwicklung zeigten. Dieses äußerte sich in einer sprachlichen Entwicklungsverzögerung mit fünf und mit zehn Jahren, einem erhöhten Risiko für Essstörung bei jungen Frauen und in einem Verhalten, ähnlich dem der Autismusspektrumsstörung, in frühen Erwachsenenjahren. Außerdem konnten Hart et al. veränderte Gehirnstrukturen bei Kindern von Vitamin D mangelversorgten Rattenmüttern im Tiermodell nachweisen, verbunden mit einem erhöhten Risiko für Schizophrenie der Kinder [Hart et al., 2015].

Eine mögliche Erklärung für die zerebralen Pathologien durch einen Vitamin D-Mangel liefern Chung et al. Chung et al. konnten zeigen, dass ein Vitamin D-Mangel unter 25nmol/l und ein Abfall des $25(\text{OH})\text{D}$ um 25nmol/l signifikant mit

dem Auftreten von Lakunen, gravierenden Hyperintensitäten der weißen Substanz und tiefen zerebralen Mikroblutungen in der Magnetresonanztomographie bei Erwachsenen einhergeht. Diese Bildmorphologien entsprechen dem neurologischen Bild der Mikroangiopathie und könnten auf einen möglichen Zusammenhang eines Vitamin D-Mangels mit einer Schädigung der kleinen Arterien im Gehirn hindeuten [Chung et al., 2015].

Mit dem Wissen um eine mögliche Mikroangiopathie durch einen Vitamin D-Mangel wurde in dieser Arbeit, im Hinblick auf die zerebralen Pathologien, vor allem das Auftreten von Hirnblutungen und der periventrikulären Leukomalazie im ersten Krankenhausaufenthalt der Frühgeborenen untersucht und die hieraus resultierenden Langzeitfolgen, wie einem möglicherweise reduzierten Intelligenzquotient. Die untersuchte Studienpopulation zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit den verschiedenen Vitamin D-Spiegeln. Vor allem lässt sich kein Anhalt für ein vermehrtes Auftreten von Hirnblutungen bei Frühgeborenen mit niedrigen Vitamin D-Spiegeln nachweisen.

4.7. Mineralisierungsdefekte des Knochens

Die bekannteste Wirkung des Vitamin D-Mangels, eine Mineralisierungsstörung des Skeletts, diente als Grundlage für die Hypothese, dass Kinder mit einem Vitamin D-Mangel mehr Frakturen im Alter von fünf Jahren gehabt haben müssten, als Kinder ohne einen Vitamin D-Mangel. Auch zeigten die Daten von Högberg et al. ein vermehrtes Frakturrisiko bei Säuglingen mit einem Vitamin D-Mangel [Högberg et al., 2018]. Außerdem wurde die Hypothese aufgestellt, dass die weiter oben ausführlich beschriebenen Mineralisierungsdefekte der Knochen schon im Neugeborenenalter durch Hüftgelenksdysplasien nach Graf auffallen könnten.

Diese Hypothesen konnten anhand der Daten dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Auffallend ist ein nicht signifikanter Trend bei den Frakturen in Richtung der Kinder mit niedrigen Vitamin D-Spiegeln. Es hatten aber insgesamt nur wenige Kinder (33 von 1.942) überhaupt eine Fraktur bis zum Alter von fünf Jahren. Auch ist in Deutschland laut der S1-Leitlinie zur Prophylaxe der Rachitis eine Supplementie-

rung mit Vitamin D₃-Präparaten (400 bis 500 Einheiten täglich, über ein bis eineinhalb Jahre) empfohlen, so dass das Bild eines fulminanten Vitamin D-Mangels in Deutschland sehr selten ist [Ernährungskommission der DGKJ, 2018; S1-Leitlinie, 2016]. Hierzu passend sind die Daten von Anderson et al., die zeigen, dass eine Vitamin D-Supplementierung von Kindern mit einer Reduktion der Auftretenswahrscheinlichkeit von Frakturen einhergeht [Anderson et al., 2017].

Aus den Daten dieser Arbeit lässt sich außerdem entnehmen, dass Neugeborene mit einem Vitamin D-Mangel nicht häufiger eine Hüftdysplasie ($\geq$ Grad 2 nach Graf) haben. Dieses könnte darin begründet sein, dass das Skelett zwar im Säuglingsalter sehr stark wächst, aber die Unterschiede zwischen mangelversorgten und suffizient versorgten Säuglingen noch nicht in den ersten Wochen (zum Zeitpunkt der Hüftsonografie mit vier bis fünf Wochen) sichtbar sind.

Passend zu diesen Daten sind auch die Erhebungen von Munns et al., die internationale Empfehlungen zur Prävention der Rachitis bieten. Sie konnten zeigen, dass nur Kinder mit einer radiologisch gesicherten Rachitis ein erhöhtes Frakturrisiko haben, aber nicht die Kinder, die einen symptomlosen Vitamin D-Mangel aufweisen [Munns et al., 2016].

4.8. Schlussfolgerung und Ausblick

Diese Arbeit zeigt trotz der großen Studienpopulation keinen Zusammenhang zwischen einer genetischen Veranlagung zu niedrigen Vitamin D-Spiegeln und einem schlechteren Outcome von Frühgeborenen. Wenn man die p-Werte der von uns getesteten Endpunkte für die Zahl der Tests korrigiert, erreicht keiner der getesteten Endpunkte statistische Signifikanz. Unsere Daten bestätigen damit zwei kürzlich publizierte große randomisierte Studien, die keine positiven Effekte einer Vitamin D-Supplementierung nachweisen konnten [Manson et al., 2019; Roth et al., 2018]. Hieraus lässt sich die Erkenntnis ziehen, dass es möglicherweise in Zukunft sinnvoller wäre, umfangreichere genetische Analysen vor kostspieligen randomisierten Studien durchzuführen.

5. Zusammenfassung

Vitamin D-Mangel und die damit einhergehende Empfehlungen zur Supplementierung von Vitamin D ist ein aktuell sehr diskutiertes Thema. Es existieren viele Studien zu den Wirkungen von Vitamin D und zu möglichen Komplikationen eines Mangels.

Ziel dieser Arbeit war es, zu prüfen, wie sich ein genetisch bedingter niedriger Vitamin D-Spiegel auf das Überleben, die Komplikationen nach der Geburt und auf das Langzeit-Outcome der Frühgeborenen auswirkt. Vitamin D-Supplementierung stellt eine einfache und kostengünstige Methode in der Behandlung eines Vitamin D-Mangels dar. Sie kommt außerdem in der medikamentösen Behandlung von Kindern bereits zur Anwendung.

In dieser Arbeit wurde die DNS von 13.096 Frühgeborene unter der 37. Schwangerschaftswoche mit einem Geburtsgewicht unter 1500g, die in den Jahren 2009 bis 2015 geboren und in die GNN-Studie eingeschlossen wurden, untersucht. Von allen eingeschlossenen Kindern lag entweder ein Teil der Nabelschnur oder ein Wangenabstrich zur DNS-Isolation vor. 2.085 Kinder dieser Kohorte wurden bislang im Alter von fünf Jahren nachuntersucht. Die DNS der Kinder wurde isoliert und mittels fluoreszenzbasierter PCR auf das Vorkommen der SNPs rs2282679, rs12794714 und rs7944926 untersucht. Aus diesen Daten wurden relative Vitamin D-Spiegel errechnet und mit dem Outcome der Kinder korreliert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen keine Assoziationen zwischen niedrigen Vitamin D-Spiegeln und einem schlechteren Outcome der Kinder und bestätigen damit die Ergebnisse kürzlich publizierter randomisierter Studien zur Supplementierung von Vitamin D.

6. Literaturverzeichnis

- Afzal**, S., Brøndum-Jacobsen, P., Bojesen, S.E., Nordestgaard, B.G., 2014. Genetically low vitamin D concentrations and increased mortality: mendelian randomisation analysis in three large cohorts. *The BMJ* 349, 6330-6341.
- Aly**, H., Mohsen, L., Bhattacharjee, I., Malash, A., Atyia, A., Elanwary, S., Hawary, R.E., 2019. Vitamin D Supplementation and T Cell Regulation in Preterm Infants: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 69, 607–610.
- Amrein**, K., Schnedl, C., Holl, A., Riedl, R., Christopher, K.B., Pachler, C., Urbanic Purkart, T., Waltensdorfer, A., Münch, A., Warnkross, H., Stojakovic, T., Bisping, E., Toller, W., Smolle, K.-H., Berghold, A., Pieber, T.R., Dobnig, H., 2014. Effect of high-dose vitamin D3 on hospital length of stay in critically ill patients with vitamin D deficiency: the VITdAL-ICU randomized clinical trial. *JAMA* 312, 1520–1530.
- Anderson**, L.N., Heong, S.W., Chen, Y., Thorpe, K.E., Adeli, K., Howard, A., Sochett, E., Birken, C.S., Parkin, P.C., Maguire, J.L., TARGet Kids Collaboration, 2017. Vitamin D and Fracture Risk in Early Childhood: A Case-Control Study. *American Journal of Epidemiology* 185, 1255–1262.
- Applied Biosystems**: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_048139.pdf (Tag des letzten Zugriffs: 19.05.2017)
- Beck**, S., Wojdyla, D., Say, L., Betran, A.P., Merialdi, M., Requejo, J.H., Rubens, C., Menon, R., Van Look, P.F., 2010. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bulletin of the World Health Organization* 88, 31–38.
- Blencowe**, H., Cousens, S., Oestergaard, M.Z., Chou, D., Moller, A.-B., Narwal, R., Adler, A., Garcia, C.V., Rohde, S., Say, L., Lawn, J.E., 2012. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *The Lancet* 379, 2162–2172.
- Bodnar**, L.M., Catov, J.M., Zmuda, J.M., Cooper, M.E., Parrott, M.S., Roberts, J.M., Marazita, M.L., Simhan, H.N., 2010. Maternal Serum 25-Hydroxyvitamin D Concentrations Are Associated with Small-for-Gestational Age Births in White Women. *Journal of Nutrition* 140, 999–1006.

- Breeman, L.D., Jaekel, J., Baumann, N., Bartmann, P., Wolke, D., 2017.** Neonatal predictors of cognitive ability in adults born very preterm: a prospective cohort study. *Developmental Medicine & Child Neurology* 59, 477–483.
- Bührer, C., 2016.** Sehr kleine Frühgeborene an der Grenze der Lebensfähigkeit. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 164, 660–667.
- Cândido, F.G., Bressan, J., 2014.** Vitamin D: Link between Osteoporosis, Obesity, and Diabetes? *International Journal of Molecular Sciences* 15, 6569–6591.
- Çetinkaya, M., Çekmez, F., Erener-Ercan, T., Buyukkale, G., Demirhan, A., Aydemir, G., Aydin, F.N., 2015.** Maternal/neonatal vitamin D deficiency: a risk factor for bronchopulmonary dysplasia in preterms? *Journal of Perinatology* 35, 813–817.
- Choi, J.Y., Rha, D., Park, E.S., 2016.** The Effects of the Severity of Periventricular Leukomalacia on the Neuropsychological Outcomes of Preterm Children. *Journal of Child Neurology* 31, 603–612.
- Chung, P.-W., Park, K.-Y., Kim, J.-M., Shin, D.-W., Park, M.-S., Chung, Y.J., Ha, S.-Y., Ahn, S.-W., Shin, H.-W., Kim, Y.B., Moon, H.-S., 2015.** 25-Hydroxyvitamin D Status Is Associated With Chronic Cerebral Small Vessel Disease. *Stroke* 46, 248–251.
- dbSNP:** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi? (Tag des letzten Zugriffs: 15.05.2018)
- Ernährungskommission der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin, Reinehr, T., Schnabel, D., Wabitsch, M., Bechtold-Dalla Pozzalla, S., Bührer, C., Heidtmann, B., Jochum, F., Kauth, T., Körner, A., Mihatsch, W., Prell, C., Rudloff, S., Tittel, B., Wölfl, J., Zimmer, K.-P., Koletzko, B., 2018.** Vitamin-D-Supplementierung jenseits des zweiten Lebensjahres: Gemeinsame Stellungnahme der Ernährungskommission der Deutschen Gesellschaft für Kinder und Jugendmedizin (DGKJ e. V.) und der Deutschen Gesellschaft für Kinderendokrinologie und Diabetologie (DGKED e. V.). *Monatsschrift Kinderheilkunde* 166, 631–637.
- Flexeder, C., Thiering, E., Koletzko, S., Berdel, D., Lehmann, I., von Berg, A., Hoffmann, B., Bauer, C.-P., Heinrich, J., Schulz, H., 2017.** Higher serum 25(OH)D concentrations are associated with improved FEV1 and FVC in adolescence. *European Respiratory Journal* 49, 804–815.

- Gale**, C.R., Robinson, S.M., Harvey, N.C., Javaid, M.K., Jiang, B., Martyn, C.N., Godfrey, K.M., Cooper, C., 2008. Maternal vitamin D status during pregnancy and child outcomes. *European Journal of Clinical Nutrition* 62, 68–77.
- Gezmish**, O., Black, M.J., 2013. Vitamin D deficiency in early life and the potential programming of cardiovascular disease in adulthood. *Journal of Cardiovascular Translational Research* 6, 588–603.
- Graf**, R., 1983. Die sonographische Beurteilung der Hüftdysplasie mit Hilfe der „Erkerdiagnostik“. *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete* 121, 693–702.
- Griz**, L.H.M., Bandeira, F., Gabbay, M.A.L., Dib, S.A., Carvalho, E.F. de, 2014. Vitamin D and diabetes mellitus: an update 2013. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 58, 1–8.
- Hart**, P.H., Lucas, R.M., Walsh, J.P., Zosky, G.R., Whitehouse, A.J.O., Zhu, K., Allen, K.L., Kusel, M.M., Anderson, D., Mountain, J.A., 2015. Vitamin D in Fetal Development: Findings From a Birth Cohort Study. *Pediatrics* 135, e167–e173.
- Helenius**, K., Sjörs, G., Shah, P.S., Modi, N., Reichman, B., Morisaki, N., Kusuda, S., Lui, K., Darlow, B.A., Bassler, D., Håkansson, S., Adams, M., Vento, M., Rusconi, F., Isayama, T., Lee, S.K., Lehtonen, L., International Network for Evaluating Outcomes (iNeo) of Neonates, 2017. Survival in Very Preterm Infants: An International Comparison of 10 National Neonatal Networks. *Pediatrics* 140, 1264–1282.
- Higgins**, R.D., Jobe, A.H., Koso-Thomas, M., Bancalari, E., Viscardi, R.M., Hartert, T.V., Ryan, R.M., Kallapur, S.G., Steinhorn, R.H., Konduri, G.G., Davis, S.D., Thebaud, B., Clyman, R.I., Collaco, J.M., Martin, C.R., Woods, J.C., Finer, N.N., Raju, T.N.K., 2018. Bronchopulmonary Dysplasia: Executive Summary of a Workshop. *The Journal of Pediatrics* 197, 300–308.
- Högberg**, U., Andersson, J., Högberg, G., Thiblin, I., 2018. Metabolic bone disease risk factors strongly contributing to long bone and rib fractures during early infancy: A population register study. *PLoS ONE* 13 (12), e0208033.
- Holick**, M.F., 2006. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *Journal of Clinical Investigation* 116, 2062–2072.
- Holick**, M.F., 2007. Vitamin D Deficiency. *New England Journal of Medicine* 357, 266–281.

Horbar, J.D., Carpenter, J.H., Badger, G.J., Kenny, M.J., Soll, R.F., Morrow, K.A., Buzas, J.S., 2012. Mortality and neonatal morbidity among infants 501 to 1500 grams from 2000 to 2009. *Pediatrics* 129, 1019–1026.

Hutchinson, E.A., Luca, C.R.D., Doyle, L.W., Roberts, G., Anderson, P.J., for the V.I.C.S. Group, 2013. School-age Outcomes of Extremely Preterm or Extremely Low Birth Weight Children. *Pediatrics* 131, e1053–e1061.

ICD-10-GM Intelligenzminderung: <http://www.icd-code.de/icd/code/F70-F79.html>
(Tag des letzten Zugriffs: 03.12.2017)

Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen (IQTIG):
Bundesauswertung 2017: Geburtshilfe: https://iqtig.org/downloads/auswertung/2017/16n1gebh/QSKH_16n1-GEBH_2017_BUAW_V02_2018-08-01.pdf, S. 46, S. 84. (Tag des letzten Zugriffs: 21.08.2019)

Jacob, J., Lehne, M., Mischker, A., Klinger, N., Zickermann, C., Walker, J., 2016. Cost effects of preterm birth: a comparison of health care costs associated with early preterm, late preterm, and full-term birth in the first 3 years after birth. *The European Journal of Health Economics* 18, 1041-1046.

Jiang, X., O'Reilly, P.F., Aschard, H., Hsu, Y.-H., Richards, J.B., Dupuis, J., Ingelsson, E., Karasik, D., Pilz, S., Berry, D., Kestenbaum, B., Zheng, J., Luan, J., Sofianopoulou, E., Streeten, E.A., Albanes, D., Lutsey, P.L., Yao, L., Tang, W., Econs, M.J., Wallaschofski, H., Völzke, H., Zhou, A., Power, C., McCarthy, M.I., Michos, E.D., Boerwinkle, E., Weinstein, S.J., Freedman, N.D., Huang, W.-Y., Van Schoor, N.M., van der Velde, N., Groot, L.C.P.G.M. de, Enneman, A., Cupples, L.A., Booth, S.L., Vasan, R.S., Liu, C.-T., Zhou, Y., Ripatti, S., Ohlsson, C., Vandenput, L., Lorentzon, M., Eriksson, J.G., Shea, M.K., Houston, D.K., Kritchevsky, S.B., Liu, Y., Lohman, K.K., Ferrucci, L., Peacock, M., Gieger, C., Beekman, M., Slagboom, E., Deelen, J., Heemst, D. van, Kleber, M.E., März, W., de Boer, I.H., Wood, A.C., Rotter, J.I., Rich, S.S., Robinson-Cohen, C., den Heijer, M., Jarvelin, M.-R., Cavadino, A., Joshi, P.K., Wilson, J.F., Hayward, C., Lind, L., Michaëlsson, K., Trompet, S., Zillikens, M.C., Uitterlinden, A.G., Rivadeneira, F., Broer, L., Zgaga, L., Campbell, H., Theodoratou, E., Farrington, S.M., Timofeeva, M., Dunlop, M.G., Valdes, A.M., Tikkanen, E., Lehtimäki, T., Lyytikäinen, L.-P., Kähönen, M., Raitakari, O.T., Mikkilä, V., Ikram, M.A., Sattar, N., Jukema, J.W., Wareham, N.J., Langenberg, C., Forouhi, N.G., Gundersen, T.E., Khaw, K.-T., Butterworth, A.S., Danesh, J., Spector, T., Wang, T.J., Hyppönen, E., Kraft, P., Kiel, D.P., 2018. Genome-wide association study in 79,366 European-ancestry individuals informs the genetic architecture of 25-hydroxyvitamin D levels. *Nature Communications* 9, 260-271.

- Jobe**, A.H., Bancalari, E., 2001. Bronchopulmonary Dysplasia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 163, 1723–1729.
- KiGGS-Studie**: <https://www.kiggs-studie.de/deutsch/studie.html> (Tag des letzten Zugriffs: 29.06.2017)
- Kramer**, J., Diehl, A., Lehnert, H., 2014. Epidemiologische Untersuchung zur Häufigkeit eines Vitamin-D-Mangels in Norddeutschland. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 139, 470–475.
- Leffelaar**, E.R., Vrijkotte, T.G.M., Eijdsen, M. van, 2010. Maternal early pregnancy vitamin D status in relation to fetal and neonatal growth: results of the multi-ethnic Amsterdam Born Children and their Development cohort. *British Journal of Nutrition* 104, 108–117.
- Linsell**, L., Malouf, R., Morris, J., Kurinczuk, J.J., Marlow, N., 2015. Prognostic Factors for Poor Cognitive Development in Children Born Very Preterm or With Very Low Birth Weight: A Systematic Review. *JAMA Pediatrics* 169, 1162–1172.
- Litonjua**, A.A., 2009. Childhood asthma may be a consequence of vitamin D deficiency. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 9, 202–207.
- Litonjua**, A.A., 2019. Vitamin D and childhood asthma: causation and contribution to disease activity. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 19, 126–131.
- Maier**, R.F. (Hrsg.), Obladen, M. (Hrsg.), Stiller, B., 2017: Neugeborenenintensivmedizin. 9. Aufl., 70-74, 116-135, 172-185, 218-225, 309-315, Springer, Heidelberg.
- Manson**, J.E., Cook, N.R., Lee, I.-M., Christen, W., Bassuk, S.S., Mora, S., Gibson, H., Gordon, D., Copeland, T., D'Agostino, D., Friedenberg, G., Ridge, C., Bubes, V., Giovannucci, E.L., Willett, W.C., Buring, J.E., VITAL Research Group, 2019. Vitamin D Supplements and Prevention of Cancer and Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine* 380, 33–44.
- McNally**, J.D., Menon, K., Chakraborty, P., Fisher, L., Williams, K.A., Al-Dirbashi, O.Y., Doherty, D.R., 2012. The Association of Vitamin D Status With Pediatric Critical Illness. *Pediatrics* 130, 429–436.
- Mokry**, L.E., Ross, S., Ahmad, O.S., Forgetta, V., Smith, G.D., Leong, A., Greenwood, C.M.T., Thanassoulis, G., Richards, J.B., 2015. Vitamin D and Risk of Multiple Sclerosis: A Mendelian Randomization Study. *PLoS Medicine* 12 (8), 1866-1885.

- More**, K., Sakhuja, P., Shah, P.S., 2014. Minimally invasive surfactant administration in preterm infants: a meta-narrative review. *JAMA Pediatrics* 168, 901–908.
- Munns**, C.F., Shaw, N., Kiely, M., Specker, B.L., Thacher, T.D., Ozono, K., Michigami, T., Tiosano, D., Mughal, M.Z., Mäkitie, O., Ramos-Abad, L., Ward, L., DiMeglio, L.A., Atapattu, N., Cassinelli, H., Braegger, C., Pettifor, J.M., Seth, A., Idris, H.W., Bhatia, V., Fu, J., Goldberg, G., Säwendahl, L., Khadgawat, R., Pludowski, P., Maddock, J., Hyppönen, E., Oduwole, A., Frew, E., Aguiar, M., Tulchinsky, T., Butler, G., Högl, W., 2016. Global Consensus Recommendations on Prevention and Management of Nutritional Rickets. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 101, 394–415.
- Ong**, J.-S., Cuellar-Partida, G., Lu, Y., Australian Ovarian Cancer Study, Fasching, P.A., Hein, A., Burghaus, S., Beckmann, M.W., Lambrechts, D., Van Nieuwenhuysen, E., Vergote, I., Vanderstichele, A., Anne Doherty, J., Anne Rossing, M., Chang-Claude, J., Eilber, U., Rudolph, A., Wang-Gohrke, S., Goodman, M.T., Bogdanova, N., Dörk, T., Dürst, M., Hillemanns, P., Runnebaum, I.B., Antonenkova, N., Butzow, R., Leminen, A., Nevanlinna, H., Peltari, L.M., Edwards, R.P., Kelley, J.L., Modugno, F., Moysich, K.B., Ness, R.B., Cannioto, R., Høgdall, E., Høgdall, C.K., Jensen, A., Giles, G.G., Bruinsma, F., Kjaer, S.K., Hildebrandt, M.A., Liang, D., Lu, K.H., Wu, X., Bisogna, M., Dao, F., Levine, D.A., Cramer, D.W., Terry, K.L., Tworoger, S.S., Stampfer, M., Missmer, S., Bjorge, L., Salvesen, H.B., Kopperud, R.K., Bischof, K., Aben, K.K., Kiemeny, L.A., Massuger, L.F., Brooks-Wilson, A., Olson, S.H., McGuire, V., Rothstein, J.H., Sieh, W., Whittemore, A.S., Cook, L.S., Le, N.D., Gilks, C.B., Gronwald, J., Jakubowska, A., Lubiński, J., Kluz, T., Song, H., Tyrer, J.P., Wentzensen, N., Brinton, L., Trabert, B., Lissowska, J., McLaughlin, J.R., Narod, S.A., Phelan, C., Anton-Culver, H., Ziogas, A., Eccles, D., Campbell, I., Gayther, S.A., Gentry-Maharaj, A., Menon, U., Ramus, S.J., Wu, A.H., Dansonka-Mieszkowska, A., Kupryjanczyk, J., Timorek, A., Szafron, L., Cunningham, J.M., Fridley, B.L., Winham, S.J., Bandera, E.V., Poole, E.M., Morgan, T.K., Risch, H.A., Goode, E.L., Schildkraut, J.M., Pearce, C.L., Berchuck, A., Pharoah, P.D., Chenevix-Trench, G., Gharahkhani, P., Neale, R.E., Webb, P.M., MacGregor, S., 2016. Association of vitamin D levels and risk of ovarian cancer: a Mendelian randomization study. *International Journal of Epidemiology* 45, 1619–1630.
- Patel**, R.M., Kandefer, S., Walsh, M.C., Bell, E.F., Carlo, W.A., Laptook, A.R., Sánchez, P.J., Shankaran, S., Van Meurs, K.P., Ball, M.B., Hale, E.C., Newman, N.S., Das, A., Higgins, R.D., Stoll, B.J., 2015. Causes and Timing of Death in Extremely Premature Infants from 2000 through 2011. *New England Journal of Medicine* 372, 331–340.

Pearson, T.A., Manolio, T.A., 2008. How to Interpret a Genome-wide Association Study. *JAMA* 299, 1335–1344.

Pekcevik, Y., Pasinli, A., Ozer, E.A., Erdogan, N., 2014. Risk Factors of Germinal Matrix Intraventricular Hemorrhage in Premature Infants. *Iranian Journal of Pediatrics* 24, 191–197.

Pojednic, R.M., Ceglia, L., 2014. The Emerging Biomolecular Role of Vitamin D in Skeletal Muscle. *Exercise and Sport Sciences Reviews* 42, 76–81.

Raju, T.N.K., Buist, A.S., Blaisdell, C.J., Moxey-Mims, M., Saigal, S., 2017. Adults born preterm: a review of general health and system-specific outcomes. *Acta Paediatrica*. 106, 1409–1437.

Roth, D.E., Morris, S.K., Zlotkin, S., Gernand, A.D., Ahmed, T., Shanta, S.S., Papp, E., Korsiak, J., Shi, J., Islam, M.M., Jahan, I., Keya, F.K., Willan, A.R., Weksberg, R., Mohsin, M., Rahman, Q.S., Shah, P.S., Murphy, K.E., Stimec, J., Pell, L.G., Qamar, H., Al Mahmud, A., 2018. Vitamin D supplementation in pregnancy and lactation to promote infant growth. *New England Journal of Medicine* 379, 535–546.

S1-Leitlinie 174-007: Vitamin-D-Mangel-Rachitis:

http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/174-007l_S1_Vitamin-D-Mangel_Rachitis_2016-04.pdf (Tag des letzten Zugriffs: 23.08.2019)

S2-Leitlinie 023-040: Arterielle Hypertonie im Kindes- und Jugendalter:

http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/023-040l_S2k_Arterielle_Hypertonie_Kinder_Jugendliche_2014-06.pdf (Tag des letzten Zugriffs: 23.05.2018)

S2k-Leitlinie 020-017: Spirometrie: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/020-017l_S2k_Spirometrie-2015-05.pdf (Tag des letzten Zugriffs: 08.08.2018)

Sankar, J., Lotha, W., Ismail, J., Anubhuti, C., Meena, R.S., Sankar, M.J., 2016. Vitamin D deficiency and length of pediatric intensive care unit stay: a prospective observational study. *Annals of Intensive Care* 6, 3–11.

Stichtenoth, G., Demmert, M., Bohnhorst, B., Stein, A., Ehlers, S., Heitmann, F., Rieger-Fackeldey, E., Olbertz, D., Roll, C., Emeis, M., Mögel, M., Schiffmann, H., Wieg, C., Wintgens, J., Herting, E., Göpel, W., Härtel, C., 2012. Major contributors to hospital mortality in very-low-birth-weight infants: data of the birth year 2010 cohort of the German Neonatal Network. *Klinische Pädiatrie* 224, 276–281.

- Tan, A.P., Svrckova, P., Cowan, F., Chong, W.K., Mankad, K., 2018.** Intracranial hemorrhage in neonates: A review of etiologies, patterns and predicted clinical outcomes. *European Journal of Paediatric Neurology* 22, 690–717.
- Tomaschitz, A., Pilz, S., Ritz, E., Grammer, T., Drechsler, C., Boehm, B.O., März, W., 2010.** Independent association between 1,25-dihydroxyvitamin D, 25-hydroxyvitamin D and the renin-angiotensin system: The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study. *Clinica Chimica Acta* 411, 1354–1360.
- Tsiaras, W.G., Weinstock, M.A., 2011.** Factors influencing vitamin D status. *Acta Dermato-Venereologica* 91, 115–124.
- United Nations Children`s Fund and World Health Organization, 2014.** Low Birth-weight: Country, regional and global estimates. New York: UNICEF.
- Vaidya, A., Forman, J.P., Hopkins, P.N., Seely, E.W., Williams, J.S., 2011.** 25-Hydroxyvitamin D is associated with plasma renin activity and the pressor response to dietary sodium intake in Caucasians. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone-System* 12, 311–319.
- Vimaleswaran, K.S., Cavadino, A., Berry, D.J., Jorde, R., Dieffenbach, A.K., Lu, C., Alves, A.C., Heerspink, H.J.L., Tikkanen, E., Eriksson, J., Wong, A., Mangino, M., Jablonski, K.A., Nolte, I.M., Houston, D.K., Ahluwalia, T.S., van der Most, P.J., Pasko, D., Zgaga, L., Thiering, E., Vitart, V., Fraser, R.M., Huffman, J.E., de Boer, R.A., Schöttker, B., Saum, K.-U., McCarthy, M.I., Dupuis, J., Herzig, K.-H., Sebert, S., Pouta, A., Laitinen, J., Kleber, M.E., Navis, G., Lorentzon, M., Jameson, K., Arden, N., Cooper, J.A., Acharya, J., Hardy, R., Raitakari, O., Ripatti, S., Billings, L.K., Lahti, J., Osmond, C., Penninx, B.W., Rejnmark, L., Lohman, K.K., Paternoster, L., Stolk, R.P., Hernandez, D.G., Byberg, L., Hagström, E., Melhus, H., Ingelsson, E., Mellström, D., Ljunggren, Ö., Tzoulaki, I., McLachlan, S., Theodoratou, E., Tiesler, C.M.T., Jula, A., Navarro, P., Wright, A.F., Polasek, O., Hayward, C., Wilson, J.F., Rudan, I., Salomaa, V., Heinrich, J., Campbell, H., Price, J.F., Karlsson, M., Lind, L., Michaëlsson, K., Bandinelli, S., Frayling, T.M., Hartman, C.A., Sørensen, T.I.A., Kritchevsky, S.B., Langdahl, B.L., Eriksson, J.G., Florez, J.C., Spector, T.D., Lehtimäki, T., Kuh, D., Humphries, S.E., Cooper, C., Ohlsson, C., März, W., de Borst, M.H., Kumari, M., Kivimäki, M., Wang, T.J., Power, C., Brenner, H., Grimnes, G., van der Harst, P., Snieder, H., Hingorani, A.D., Pilz, S., Whittaker, J.C., Järvelin, M.-R., Hyppönen, E., 2014.** Association of vitamin D status with arterial blood pressure and hypertension risk: a mendelian randomisation study. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 2, 719–729.

- Voigt**, M., Rochow, N., Guthmann, F., Hesse, V., Schneider, K.T.M., Schnabel, D., 2012. Geburtsgewichtspersentilwerte für Mädchen und Knaben unter Berücksichtigung der Körperhöhe der Mutter. *Zeitschrift für Geburtshilfe und Neonatologie* 216, 212–219.
- Wang**, T.J., Zhang, F., Richards, J.B., Kestenbaum, B., van Meurs, J.B., Berry, D., Kiel, D., Streeten, E.A., Ohlsson, C., Koller, D.L., Palotie, L., Cooper, J.D., O'Reilly, P.F., Houston, D.K., Glazer, N.L., Vandenput, L., Peacock, M., Shi, J., Rivadeneira, F., McCarthy, M.I., Anneli, P., de Boer, I.H., Mangino, M., Kato, B., Smyth, D.J., Booth, S.L., Jacques, P.F., Burke, G.L., Goodarzi, M., Cheung, C.-L., Wolf, M., Rice, K., Goltzman, D., Hidirolou, N., Ladouceur, M., Hui, S.L., Wareham, N.J., Hocking, L.J., Hart, D., Arden, N.K., Cooper, C., Malik, S., Fraser, W.D., Hartikainen, A.-L., Zhai, G., Macdonald, H., Forouhi, N.G., Loos, R.J.F., Reid, D.M., Hakim, A., Dennison, E., Liu, Y., Power, C., Stevens, H.E., Jaana, L., Vasan, R.S., Soranzo, N., Bojunga, J., Psaty, B.M., Lorentzon, M., Foroud, T., Harris, T.B., Hofman, A., Jansson, J.-O., Cauley, J.A., Uitterlinden, A.G., Gibson, Q., Järvelin, M.-R., Karasik, D., Siscovick, D.S., Econs, M.J., Kritchevsky, S.B., Florez, J.C., Todd, J.A., Dupuis, J., Hypponen, E., Spector, T.D., 2010. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet* 376, 180–188.
- WHO**, 2012. Born too soon: the global action report on preterm birth. Geneva: World Health Organization.
- Wimalasundera**, N., Stevenson, V.L., 2016. Cerebral palsy. *Practical Neurology* 16, 184–194.
- Wolke**, D., Jaekel, J., 2016. Long-term survival quality of former very low birth weight infants. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 164, 673–684.
- Wu**, A.C., Tantisira, K., Li, L., Fuhlbrigge, A.L., Weiss, S.T., Litonjua, A., 2012. Effect of Vitamin D and Inhaled Corticosteroid Treatment on Lung Function in Children. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 186, 508–513.
- Yadama**, A.P., Mirzakhani, H., McElrath, T.F., Litonjua, A.A., Weiss, S.T., 2020. Transcriptome analysis of early pregnancy vitamin D status and spontaneous preterm birth. *PLoS ONE* 15 (1), e0227193.
- Zhang**, Z., He, J.-W., Fu, W.-Z., Zhang, C.-Q., Zhang, Z.-L., 2013. An analysis of the association between the vitamin D pathway and serum 25-hydroxyvitamin D levels in a healthy Chinese population. *Journal of Bone and Mineral Research* 28, 1784–1792.

7. Anhänge

7.1. Anhang 1: Fragebogen zu den klinischen Basisdaten

Stand: Version 6 21.10.2015									
		Name Kind: _____							
		Name Mutter: _____							
Straße; Nr.: _____									
PLZ; Wohnort: _____									
Einschluss 1 / 3		Geb. Kind:		PE Labor:		EV ?:		Klinik:	
						☐		HL	1
1. Einschluss		ja ☐ nein ☐							
Nabelschnurrest eingefroren?		☐		Einschluss nur bei Übernahme am 1. LT!					
Outborn?		☐		→					
2. Geschlecht:		weiblich ☐		männlich ☐					
3. Mehrling		nein ☐		ja ☐					
Nr. des Mehrlings:				von				Mehrlingen	
Fetofetales Transfusions-syn.?		nein ☐		ja ☐		ja, mit Laser		☐	
4. Informationen zur Geburt		nein ☐		ja ☐					
Blasensprung vor Wehen?		☐							
falls "ja": Datum:				Uhrzeit:					
Geburtsmodus:		Spontangeburt ☐		Sectio ☐		Notsectio ☐			
APGAR 5 Minuten									
APGAR 10 Minuten									
Nabelarterien-ph:									
Nabelarterien BE (+/-):									
5. Geburtsdaten / Gestationsalter (GA)		GG:				g		Körpertemp.: °C	
KL:						cm		GA: +	
KU:						cm			
6. Erstversorgung - Uhrz. Geb.:									
Versorgung in den ersten 60 Minuten:		Sustained Inflation ☐		Puffung ☐		LISA ☐		Volumensubstitut. (10 ml/kg KG) ☐	
Surfactant über Tubus ☐		Adrenalin ☐		Herzdruckmassage ☐		Keine d. Maßnahmen ☐			
7. CRIB-Score (erste 12h)		Niedrigster BE (+/-)		min. O2:		max. O2:			
Wenn "N.-BE" > 0, dann eine "98" dokumentieren.									
8. Schwere Fehlbildungen oder Chromosomopathien		nein ☐		ja ☐					
9. Niedrigster MAD (innerhalb der ersten 24 h)		Manschette ☐		Arterie ☐				mmHg	
10. Katecholamine in d. ersten 24h?		nein ☐		ja ☐					
11. Lungenreifebeh. v. Geburt		nein ☐		ja ☐					
Betamethason									
Dexamethason									
Vollständiger Zyklus (2 Dosen + 12h nach 2. Dosis)		nein ☐		ja ☐					
12. Tokolysebehandlung v. Geburt		nein ☐		ja ☐					
Magnesium intravenös		☐		Nifedipin (Adalat®)					
Fenoterol (Partusisten®)		☐		Sonstiges:					
Atosiban (Tractocile®)		☐							
Tokolyse seit (Datum):									
13. Weitere Maßnahmen?		nein ☐		ja ☐					
Cerclage		☐		in SSW:					
Pessar		☐		in SSW:					
Progesteron		☐		seit SSW:					
stationärer Aufenthalt der Mutter > 1 Woche		☐		SSW:					
14. Antenat. Antibiotische Therapie		nein ☐		ja ☐					
Cephalosporine									
Metronidazol (Clont®)									
Ampicillin und andere Penicilline									
Imipenem/Meropenem									
15. Ursache der zu frühen Geburt		unhemmbare Wehen ☐		patholog. CTG ☐		V.a. Amnioninfektion ☐		Wachstumsretard./patholog. Doppler ☐	
EPH-Gestose ☐		HELLP ☐		Anhydramnie / BS > 5 Tage ☐		Fruchtblasenprolaps ☐			
16. Alter und Herkunft der Mutter		Alter:				Jahre			
Deutschland ☐		Asien ☐		übriges Europa ☐		Afrika ☐		einschl. Russland ☐	
		Naher Osten, einschl. Türkei u. Nordafrika ☐							
17. Schulabschluss der Mutter		Hochschulreife ☐		Realschule ☐		Sonstiges/ Kein Abschluss ☐			
18. Vorausgegangene Geburten?		nein ☐		ja ☐					
Wenn ja:		keine römischen Zahlen		Gravida: (ohne diese Geburt)		Para: (ohne diese Geburt)			
Frühgeburten vor 37 + 0									

Stand: Version 6 08.12.2015

Behandlung 2 / 3		Name Kind: _____	
Geburtsdatum: _____		Klinik: HL Nr.: 1	

1. Prophylaktische Medikamente nein ☐ ja ☐

Vitamin K: nein ☐ ja ☐ oral ☐ i.m. ☐ i.v. ☐ s.c. ☐

Teicoplanin/Vanco zur Sepsis-Prophylaxe ☐ Vorgegebene Auswahl nicht streichen! -> Textfeld verwenden

Fluconazol zur Pilzsepsis-Prophylaxe ☐

Indomethacin zur Prophylaxe der IVH ☐

Erythropoetin zur Anämie-Prophylaxe ☐

10. Sonstige Medikamente nein ☐ ja ☐

Acetylcystein ☐	Hydrocortison ☐	Omeprazol ☐
Ambroxol (Mucosulvan) ☐	Ibuprofen ☐	Phosphat ☐
Ca-Gluconat ☐	Indomethacin ☐	Prednisolon ☐
Ca-Glycerolph. ☐	Insulin ☐	Ranitidin ☐
Calcium ☐	L_Thyroxin ☐	Sildenafil ☐
Ca-Phosph. ☐	Na-Gluconat ☐	Ursodesoxych.-Säure (Ursafalk®) ☐
Dexamethason ☐	Na-Glyceroph. ☐	Vitamine-nicht D ☐
Eisen ☐	Na-bicarbonat ☐	Zink ☐
Glucose ☐	NaCl ☐	Kalium/KCl ☐

2. Antibiotische Therapie nein ☐ ja ☐

Amikacin ☐	Clarithromycin ☐	Meropenem ☐
AmphotericinB ☐	Erythromycin ☐	Metronidazol (Clontel®) ☐
Ampil/Amoxicillin ☐	Floxacillin ☐	Mezlocillin ☐
Ampil/Sulbactam ☐	Fluconazol ☐	Piperacillin ☐
Cefazolin ☐	Fosfomycin ☐	Tazobactam ☐
Cefotaxim ☐	Gentamicin ☐	Teicoplanin ☐
Ceftazidim ☐	Imipenem (Zenocard®) ☐	Tobramycin ☐
Cefuroxim ☐	Linezolid ☐	Vancomycin ☐

11. Probiotika nein ☐ ja ☐

Lactobacillus + Bifidobacterium (z.B. Inflanor®) ☐

Lactobacillus GG (z.B. Infectopharm LGG®) ☐

E-coli (z.B. Mutaflor®) ☐

3. Katecholamin-Therapie nein ☐ ja ☐

Dopamin ☐ Dobutamin ☐

Noradrenalin ☐ Adrenalin ☐

4. Analgetika u. Sedativa nein ☐ ja ☐

Paracetamol ☐ Midazolam ☐ Pirritamid ☐

Morphin ☐ Fentanyl ☐ Sulfentanil ☐

Thiopental ☐ Phenobarbital ☐ Propofol ☐

Pentobarbital ☐ Chloralhydrat ☐ Diazepam ☐

Andere ☐

12. Impfungen (stationär) nein ☐ ja ☐

6-fach-Impfstoff (TDP; HiB, IPV, HB) ☐

Pneumokokken-Konjugat ☐

RSV passiv (Palivizumab) ☐

Rotaviren: → Rotarix ☐

→ RotaTeq ☐

5. Surfactantgabe nein ☐ ja ☐

Wenn ja, bitte Anzahl und Darreichungsform angeben: _____ X

mit Sonde / Spontanatmung ☐

mit Tubus ☐

6. Diuretika nein ☐ ja ☐

Furosemid (Lasix) ☐

Hydrochlorothiazid ☐

Spiroonolacton (Aldactone) ☐

7. Inhalative Medikamente nein ☐ ja ☐

Salbutamol ☐ Budesonid ☐ Atrovent ☐

Furosemid ☐ Sultanol ☐ Flutide ☐

NO ☐ Pulmicort ☐

13. Medik. Wg. NW abgesetzt? nein ☐ ja ☐

_____ wg. _____

14. Zentr.-venöse Katheter nein ☐ ja ☐

Katheterart: ZVK ☐ NVK ☐ Silastik ☐

Komplikationen?: _____

15. Arterielle Katheter nein ☐ ja ☐

Nabel-Arterienkatheter ☐

periphere Arterienkatheter ☐

⇒ Extremitätennekrosen? nein ☐ ja ☐

16. Nahrungsaufbau

Beginn Nahrungsaufbau am _____ . Lebenstag

Erstmals vollständig oral (150 ml/kg) _____ . Lebenstag

Anzahl der Tage mit iv-Zugang _____ Tage

8. Transfusionen "bitte komplett ausfüllen" nein ☐ ja ☐

	Keine	1x	2x	3x	Anzahl bei > 3 x:
Blut (EK):	☐	☐	☐	☐	☐
FFP:	☐	☐	☐	☐	☐
TK:	☐	☐	☐	☐	☐

Wenn "ja", dann auch "Keine" angeb., da freie Felder als "keine Angabe" geführt werden.

9. Atemanalept. Medikamente nein ☐ ja ☐

Coffein ☐ Theophyllin ☐ Doxapram ☐

17. Nahrungszusätze

Muttersmilch ☐ Spenderinnenmilch ☐ FG-Nahrung (z.B. HuO) ☐ Pre-Nahrung ☐

Zusätze auf Station: _____

Zusätze bei Entlassung: _____

andere Nahrung (Entl. | St.) _____

bei Entlassung während des Aufenth.

Muttersmilch ☐ Spenderinnenmilch ☐ FG-Nahrung (z.B. HuO) ☐ Pre-Nahrung ☐

Zusätze auf Station: _____

Zusätze bei Entlassung: _____

andere Nahrung (Entl. | St.) _____

Von Lübeck auszufüllen: **FB2V7** Eingabe Monitor korr. Eingabe

Bitte nicht über die Bezeichnung FB2V6 stampeln!

Hiermit bestätige ich die Richtigkeit der Angaben:

Name / Unterschrift (dokum. Arzt / Ärztin) _____

→ Felder frei lassen, wenn keine Zusätze!

Datenbogen des Kindes bitte ausfüllen und zusammen mit dem Bogen 3 (grün) nach Entlassung/Verlegung ohne wieder Aufnahme des Kindes an die Studienzentrale senden.: Klinik für Kinder und Jugendmedizin, Prof. Dr. W. Göpel, 23538 Lübeck

Stand: Version 6 08.12.2015

	Verlauf 3 / 3	Name Kind:
	Geburtstag: 	Klinik: Nr.:

1. Sauerstoffzufuhr nein ☐ ja ☐

Beginn :

Endg. Beendigung:

Wenn das Kind mit O2-Bedarf entlassen wurde, dann entspricht "Endg. Beendigung" dem Entlassungsdatum.

Sauerstoffbedarf bei Entlassung? nein ☐ ja ☐

2. Atemhilfe nein ☐ ja ☐

CPAP ☐

CPAP mit Beatmungshüben (nasal/pharyngeal) ☐

HFO - CPAP ☐

Highflow ☐

3. Beatmungsmodus nein ☐ ja ☐

Konventionelle Beatmung (IMV; SIMV; etc.) ☐

Hochfrequenzoszillation (HFO) ☐

4. Tracheale Beatmungszeiten (+ Beatmung bei OP) nein ☐ ja ☐

1. Beatmg. vom bis

2. Beatmg. vom bis

3. Beatmg. vom bis

4. Beatmg. vom bis

5. Beatmg. vom bis

6. Beatmg. vom bis

7. Beatmg. vom bis

Endg. Beendigung jegl. Langzeit-Atemhilfe (CPAP / tr. Beatmung / u. a.)

Beatmung bei Entlassung? nein ☐ ja ☐

5. Pneumothorax / PIE nein ☐ ja ☐

PIE ☐

Pneumothorax mit Drainage ☐

- unter trachealer Beatmung ☐

- unter CPAP ☐

- Spontanatmung ☐

6. Sepsis/SIRS (Kriterien NEO-KISS) nein ☐ ja ☐

Beginn innerhalb 72h ? ☐

!!! Erreger in Blutkultur? ☐

Erreger-Nr.: Datum Erregernachweis:

1. Sepsis: →

2. Sepsis: →

3. Sepsis: →

Andere Sepsiserreger:

Erregerkatalog:

kein Keimnachweis	00	00
Enterokokken	ENT	34
Enterobacter	ENB	39
Pseudomonas aeruginosa	PAE	42
Staphyl. epidermidis	KNS	32
Staphyl. aureus	SAU	31
Staphyl. Aureus Oxacillin resist.	MRSA	51
E. coli ESBL bildend	ESBL_ECO	50
Klebsiella ESBL bildend	ESBL_KLE	53
E. faecium/ E. faecalis Vancomycin resist.	VRE	52
Serratia	SER	40
Listeria monocytogenese	LMO	43
Candida	CAN	46
Strepokokko Gruppe B	BST	33

Datenbogen des Kindes bitte ausfüllen und zusammen mit dem Bogen 2 (gelb) nach Entlassung/Verlegung ohne wieder Aufnahme des Kindes an die Studienzentrale senden:
Klinik für Kinder und Jugendmedizin, Prof. Dr. W. Göpel, 23538 Lübeck

7. Pneumonie / NEC (Kriterien NEO-KISS) nein ☐ ja ☐

Pneumonie: ☐

NEC II / III (auch ohne OP): ☐

8. Schädelsonogramm nein ☐ ja ☐

Grad: I ☐ II ☐ III ☐ IV ☐

IVH ☐

PVL ☐

9. Hüftsono nein ☐ ja ☐

Hüftgelenkdspl. >= 2 nach Graf nein ☐ ja ☐

10. Ophthalmol. Untersuchung nein ☐ ja ☐

max. ROP-Stadium: → Ziffern 0 bis 5 ; 0 entspricht 0

Bevacizumab (Bsp. Avastin) ☐

Laser ☐

Kryo ☐

11. Apparatives Hörscreening nein ☐ ja ☐

unauffällig → ☐ auffällig → ☐

12. Operationen nein ☐ ja ☐

nein	ja	Datum
PDA-OP	☐	
NEC-OP	☐	
FIP-OP	☐	
VP-Shunt	☐	
Herniotomie	☐	
Sonst. OPs?	☐	

Art der OP (Freitext in Druckbuchstaben):

13. BPD (nach Walsh, 35+0 bis 36+6 SSW) nein ☐ ja ☐

O2-Bedarf < 30% (moderat) ☐

O2-Bedarf > 30%, CPAP od. Beatmung (schwer) ☐

14. Entlassung/Verlegung (ohne Wiederaufnahme!)

!!! Datum Entlassung:

Gewicht: Gramm

KU: cm KL: cm

nach Hause ☐

Verlegt ☐ → Grund:

Tod in Klinik ☐ → Grund:

Von Lübeck auszufüllen:	FB3V7	Eingabe	Monitor	korr. Eingabe
-------------------------	--------------	---------	---------	---------------

Hermit bestätige ich die Richtigkeit der Angaben:

Name / Unterschrift (dokum. Arzt / Ärztin)

7.2. Anhang 2: Protokoll zur DNS-Isolierung aus Mundschleimhaut-abstrichen mit dem QIAamp® 96 DNA Kit

1. Tupfer in Eppendorf-Reaktionsgefäße (Eppis) brechen
2. + 400µl PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung) in alle Eppis
3. + 400µl AL-Puffer in alle Eppis
4. + 20µl Protease → sofort 15 Sekunden vortexen
5. 1 Stunde bei 56°C im Thermoschüttler inkubieren, Speed 500
6. + 400µl Ethanol in alle Eppis → vortexen
7. 96er-Säulen auf den S-Block setzen → vortexen
8. 2x600µl Probe in die 96 Wells geben (Tupfer ausdrücken) → mit Folie verschließen
9. Austarieren der Zentrifuge: 1050µl Wasser auf 96er-Säulen mit S-Block geben und mit der Folie verschließen, 4 Minuten bei 6000rpm zentrifugieren
10. Flüssigkeit aus den S-Blöcken ausschütten, Block auf Papier ausklopfen und unter die Säulen stellen
11. + 500µl Waschpuffer 1 → mit Folie verschließen
12. Austarieren der Zentrifuge: + 500µl Wasser → mit Folie verschließen
13. 2 Minuten bei 6000rpm zentrifugieren
14. Blöcke nicht leeren
15. + 500µl Waschpuffer 2 → mit Folie verschließen
16. Austarieren der Zentrifuge: + 500µl Wasser → mit Folie verschließen
17. 15 Minuten bei 6000rpm zentrifugieren
18. 96er-Säulen auf die blaue 96er-Platte setzen (Elution Microtubes CL)
19. + 200µl AE-Puffer → mit Folie verschließen
20. Austarieren der Zentrifuge: + 200µl Wasser → mit Folie verschließen
21. 4 Minuten bei 6000rpm zentrifugieren
22. + 200µl AE-Puffer → mit Folie verschließen
23. Austarieren der Zentrifuge: + 200µl Wasser → mit Folie verschließen
24. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
25. 4 Minuten bei 6000rpm zentrifugieren
26. Säulen verwerfen, AE-Puffer aus der Negativ-Kontrolle pipettieren
27. Proben aus der blauen 96er-Platte in eine Deep-Well-Platte pipettieren (450µl)
28. Deep-Well-Platte mit Folie verschließen, beschriften und bei -20°C lagern

Zentrifuge: Sigma 4-16

7.3. Anhang 3: Protokoll zur DNS-Isolierung aus Nabelschnüren mit dem Gentra® Puregene® Tissue Kit

1. Nabelschnur etwa 100mg klein schneiden
+ 3ml Cell Lysis Solution
+ 30µl Puregene Proteinase K → vortexen
über Nacht bei 55°C im Thermoschüttler inkubieren, Speed 600
2. + 15µl RNase A Solution → vortexen
für 1 Stunde bei 37°C im Thermoschüttler inkubieren, Speed 600
3. Für 3 Minuten im Eis runterkühlen
4. + 1ml Protein Precipitation Solution → sofort 20 Sekunden hochtourig vortexen
5. 10 Minuten bei 5000rpm zentrifugieren → Proteine befinden sich jetzt in Form eines festen Pellets am Boden des Röhrchens
6. DNS-Überstand in ein neues Röhrchen mit 1ml Protein Precipitation Solution überführen und die Proteinfällung wiederholen → auf Eis pipettieren
7. 3ml Isopropanol 100% in ein neues Röhrchen pipettieren
8. Den DNS-Überstand dazugeben und das Röhrchen vorsichtig über Kopf schwenken
9. 5 Minuten bei 5000rpm zentrifugieren → DNS befindet sich jetzt als Pellet am Boden des Röhrchens
10. Überstand vorsichtig abgießen und das Röhrchen kopfüber auf sauberes Papier abtropfen lassen → auf Pellet achten
11. + 3ml Ethanol 70% → Probe vorsichtig durchspülen, um das DNS-Pellet zu waschen
12. 5 Minuten bei 5000rpm zentrifugieren
13. Alkohol vorsichtig abgießen, Röhrchen über Kopf auf Papier abtropfen lassen
14. Ethanolwaschschritt wiederholen
15. Röhrchen über Kopf auf sauberem Papier für etwa 2 Stunden lufttrocknen lassen
16. + 150µl DNS Hydration Solution → vorsichtig mit Pipette durchspülen
17. Über Nacht bei 25°C im Thermoschüttler inkubieren, Speed 300
Oder bei Raumtemperatur länger stehen lassen, hin und wieder bewegen, da die langen DNS-Stränge sonst zerbrechen
18. DNS-Konzentrationsmessung: Einstellung auf 50-70ng/µl

Zentrifuge: Heraeus Megafuge 2.0

7.4. Anhang 4: TaqMan®-PCR

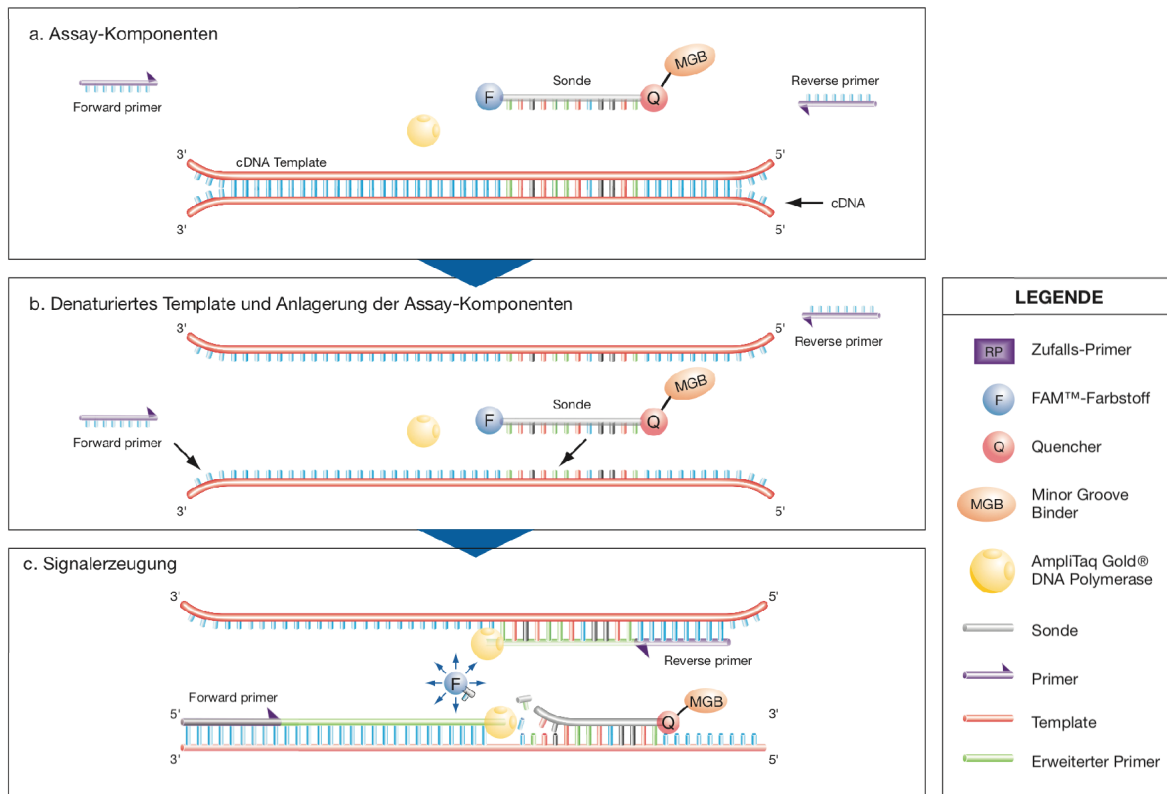
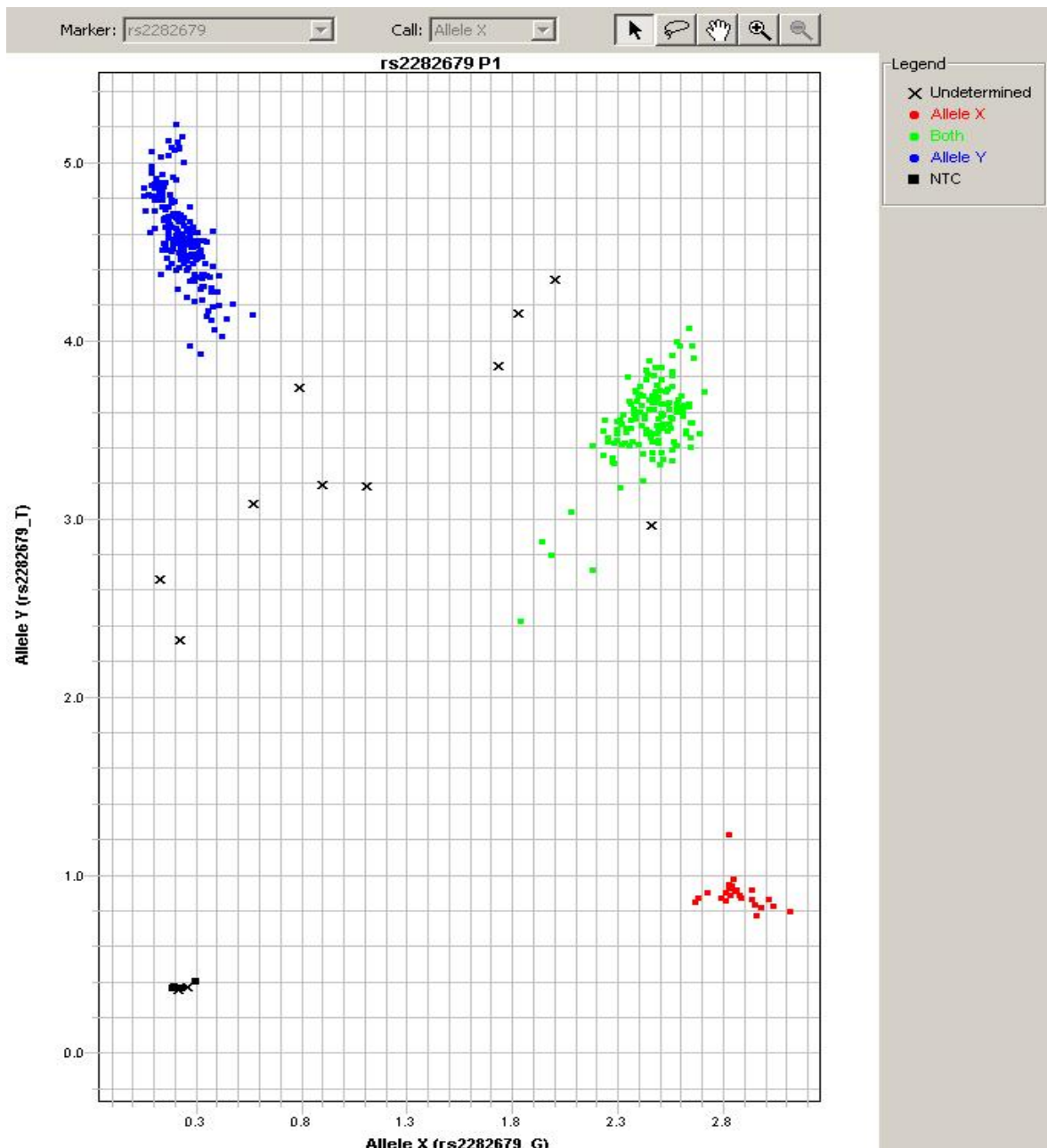


Abbildung 3: TaqMan®-Verfahren

[http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_048139.pdf]

Band der SNP während des Annealings der PCR an die zugehörige DNS-Sequenz, so spaltete die DNS-Polymerase den SNP während der Elongation. Diese Spaltung führte zu einer Abspaltung des Reporters und damit zu einer Entfernung von Reporter und Quencher voneinander. Der Reporter war mit einem der Farbstoffe FAM™ oder VIC™ markiert. Durch die Trennung hemmte der Quencher nicht mehr das Fluoreszenzsignal des Reporters und die Fluoreszenzintensivität konnte in der anschließenden allelischen Diskrimination nachgewiesen werden.

7.5. Anhang 5: Allelische Diskrimination mittels Cluster Plot

**Abbildung 4:** Allelische Diskrimination mittels Cluster Plot

Die allelische Diskrimination ist am Beispiel des SNPs rs2282679 dargestellt. Die blaue Wolke stellt den homozygoten Genotyp dar, der kein reduzierendes Allel aufweist. Die grüne Wolke beinhaltet die Kinder, die beide Allele tragen und die rote Wolke stellt den Genotyp mit der zweifachen Ausprägung des reduzierenden Allels dar. Die Genotypen, die vom Computer nicht eindeutig zugeordnet werden konnten blieben schwarz und wurden manuell bearbeitet oder nicht mit in die Ergebnisse mit einbezogen.

7.6. Anhang 6: Verteilung der Kinder zu dem genetisch errechneten Vitamin D-Spiegel

Tabelle 12: Verteilung der Kinder in den verschiedenen Genotypen

Genetisch errechneter Vitamin D-Spiegel		Niedrig ($< P20$) (n=2336)	Mittel ($P20-P80$) (n=6849)	Hoch ($> P80$) (n=2345)
rs7944926	GG [%]	30,4	45,8	67,2
	AG [%]	47,0	41,6	32,8
	AA [%]	22,7	12,6	0,0
rs12794714	GG [%]	1,2	19,0	100,0
	AG [%]	28,3	73,3	0,0
	AA [%]	70,5	7,7	0,0
rs2282679	AA [%]	25,7	56,7	71,2
	CA [%]	47,2	40,3	28,8
	CC [%]	27,1	3,0	0,0

Die Tabelle 12 zeigt die Einteilung der Kinder in die Gruppen: Niedriger (< 20 . Perzentile), Mittlerer (20. bis 80. Perzentile) und Hoher genetisch errechneter Vitamin D-Spiegel (> 80 . Perzentile).

Zu erkennen ist, dass sich, unabhängig vom SNP, in der Gruppe mit dem hohen Vitamin D-Spiegel keine Kinder mit Homozygotie für das reduzierende Allel befinden.

7.7. Anhang 7: Daten zur Geschlechterverteilung und zu Mehrlingsgeburten

Tabelle 13: Geschlechterverteilung und Mehrlingsgeburten

Genetisch errechneter Vitamin D-Spiegel	Niedrig ($< P20$) (n=2336)	Mittel ($P20-P80$) (n=6849)	Hoch ($> P80$) (n=2345)	p*
Geschlecht				
Mädchen [%]	48,2	48,8	48,2	0,98
Mehrling [%]	34,2	35,3	34,5	0,85

* p-Werte (Fisher's exact Test) sind für niedrige ($< P20$) vs. hohe ($> P80$) Vitamin D-Spiegel angegeben.

Die Tabelle 13 zeigt die prozentuale Verteilung von Mädchen und Jungen und die Häufigkeit von Mehrlingsgeburten aller untersuchten Kinder im Kontext des genetisch errechneten Vitamin D-Spiegels. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede in den untersuchten Gruppen.

7.8. Anhang 8: Daten zur Herkunft der Mutter

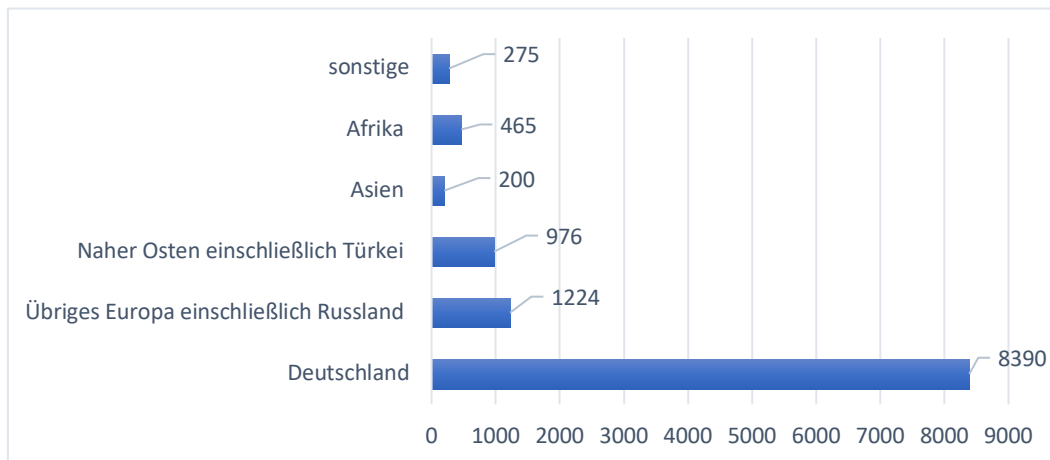


Abbildung 5: Herkunft der Mutter

In der Abbildung 5 ist die prozentuale Verteilung der Mütter zu ihren jeweiligen Herkunftsländern aufgezeigt. Erwartungsgemäß ist das häufigste Herkunftsland der Mütter dieser Studienpopulation Deutschland.

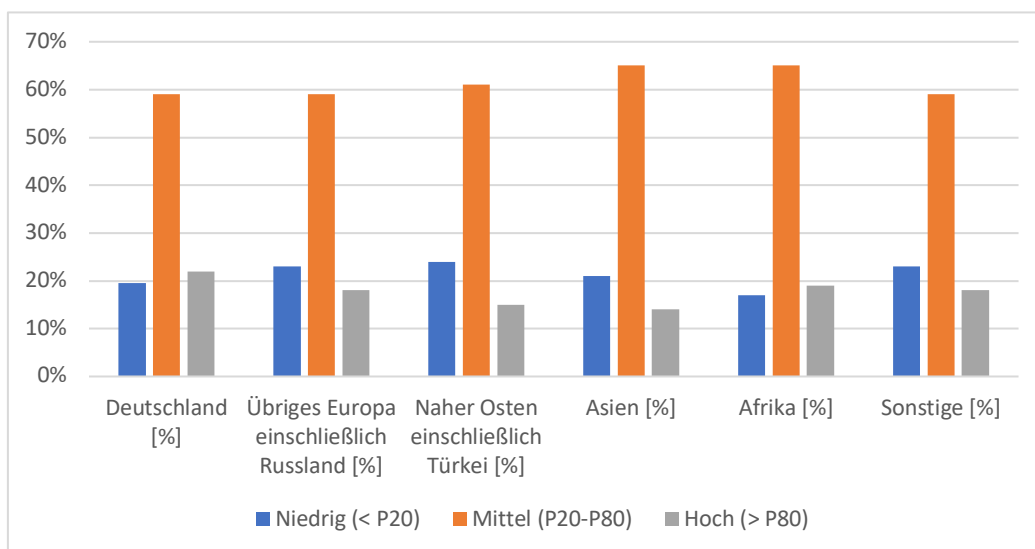


Abbildung 6: Zuordnung der Vitamin D-Spiegel der Kinder zu den Herkunftsländern der Mütter

Die Abbildung 6 zeigt die prozentuale Verteilung der Vitamin D-Spiegel der Kinder im Hinblick auf die Herkunft ihrer Mütter. Auffällig ist, dass vor allem in Asien, im Nahen Osten und im übrigen Europa (ohne Deutschland) prozentual mehr Kinder niedrige Vitamin D-Spiegel aufweisen.

7.9. Anhang 9: Daten zu typischen Komplikationen der Frühgeburt

Tabelle 14: Daten zu typischen Komplikationen von Frühgeborenen

Genetisch errechneter Vitamin D-Spiegel	Niedrig ($< P20$) (n)	Mittel ($P20-P80$) (n)	Hoch ($> P80$) (n)	p*
<i>Pneumothorax [%]</i>	5,0 (2330)	4,7 (6833)	5,0 (2334)	0,95
<i>OP PDA [%]</i>	3,9 (2333)	4,1 (6838)	3,8 (2341)	0,94
<i>OP NEC [%]</i>	2,3 (2334)	2,3 (6837)	2,3 (2341)	0,92
<i>OP FIP [%]</i>	2,0 (2333)	2,0 (6832)	2,1 (2341)	0,92
<i>ROP Behandlung [%]</i>	3,2 (2331)	3,4 (6835)	3,2 (2338)	1,0
<i>OP VP-Shunt [%]</i>	1,8 (2334)	1,9 (6836)	2,0 (2341)	0,83
<i>Herniotomie [%]</i>	11,1 (2332)	10,0 (6840)	10,6 (2341)	0,57

* p-Werte (Fisher's exact Test) sind für niedrige ($< P20$) vs. hohe ($> P80$) Vitamin D-Spiegel angegeben.

Die typischen Komplikationen von Frühgeborenen oder ihre Behandlung sind in der Tabelle 14 aufgezeigt. Die Daten sind nach ihrem genetisch errechneten Vitamin D-Spiegel sortiert und in niedrige, mittlere und hohe Vitamin D-Spiegel unterteilt. Es zeigt sich keine Signifikanz innerhalb dieser Werte.

Durch die Beatmung oder Atemunterstützung von Frühgeborenen sind diese anfällig für die Entwicklung eines Pneumothorax`.

Je unreifer die Frühgeborenen sind, desto häufiger ist der Ductus arteriosus (PDA) bei Geburt noch nicht verschlossen. Als Therapieoptionen kommen medikamentös Indometacin und Ibuprofen (unselektive Hemmung der Cyclooxygenase-1 und -2) infrage und chirurgisch eine Ductusligatur mit einem Clip.

Die nekrotisierende Enterokolitis (NEC) betrifft fast ausschließlich Frühgeborene und kann eine Darmperforation und Sepsis als Komplikation mit sich führen. Die chirurgische Intervention besteht in der Entfernung von avitalen Darmanteilen mit Ileostomaanlage.

Die fokale intestinale Perforation (FIP) ähnelt klinisch der NEC, nur dass bei der FIP nur die Perforationsstelle entzündlich verändert ist, im Gegensatz zu ganzen Darmanteilen bei der NEC. Die Therapie ist ein operatives Übernähen der Perforation.

Normalerweise ist die Blutgefäßentwicklung in der Retina bis zur Geburt abgeschlossen. Bei Frühgeborenen kommt es vor allem bei Beatmung zu deutlich höheren Sauerstoffpartialdrücken als intrauterin, die die Netzhautvaskularisation stören (ROP). Zu Beginn zeigt sich dieses in einer Hemmung der Vaskularisation, die im Verlauf durch Einfluss des sauerstoffabhängigen Wachstumsfaktor VEGF (Vascular Endothelia Growth Factor) in eine Hypervaskularisierung übergeht. Therapieoptionen sind die Laser- und Kryokoagulation oder die medikamentöse VEGF-Inhibition.

Der ventrikuloperitoneale Shunt (VP-Shunt) ist eine Therapieoption beim posthämorrhagischen Hydrozephalus. Der Liquor wird hierbei aus dem Seitenventrikel in die Bauchhöhle abgeleitet [Maier et al., 2017].

Die Informationen zu diesen Komplikationen wurden dem Fragebogen zu den klinischen Basisdaten der Neugeborenen entnommen.

8. Danksagungen

Ich möchte mich an erster Stelle bei Prof. Dr. Egbert Herting bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat im Institut für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Lübeck zu promovieren.

Ein ganz besonderer Dank für die hervorragende Betreuung gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang Göpel, der mir ein unglaublich interessantes und vielschichtiges Thema an die Hand gegeben hat, es mir ermöglicht hat im GNN-Team mitzuarbeiten, stets für Nachfragen erreichbar war und mich mit seiner Freude an Forschung sehr motiviert hat.

Für die stets freundliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre möchte ich mich ganz herzlich bei dem Team von GNN bedanken: Bea Hatje, Lena Herrmann, Dr. Alexander Humberg, Stefanie Prien, Tim Rönckendorf, Birgit Schröder, Petra Sperner und Liane Triebwasser.

Mein außerordentlicher Dank gilt den Eltern und Kindern, die sich bereit erklärt haben an der GNN-Studie teilzunehmen. Ihnen ist es zu verdanken, dass die Ergebnisse dieser Arbeit erzielt werden konnten.

Meinen Eltern Dr. Anca Mannhardt und Albrecht Römhild und meinem Bruder Jacob Mannhardt danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und die vielen Korrekturlesungen. Ohne euch wäre ich heute nicht da, wo ich jetzt bin.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Clara Mannhardt
Geburtsdatum	05.10.1993
Geburtsort	Henstedt-Ulzburg



Schulischer Werdegang

1999 bis 2003	Grundschule Alsterdorferstraße 39, Hamburg
2003 bis 2011	Albert-Schweitzer-Gymnasium, Hamburg
2011	Abitur am Albert-Schweitzer-Gymnasium

Universitärer Werdegang

2013 bis 2015	Vorklinik an der Georg-August-Universität Göttingen
2015	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2015 bis 2019	Klinik an der Universität zu Lübeck
April - Oktober 2016	Promotionssemester und wissenschaftliche Hilfskraft in der GNN-Studienzentrale
2018	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Juli - Oktober 2019	PJ Tertial Pädiatrie im Katholischen Kinderkrankenhaus Wilhelmstift, Hamburg
2019	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Publikation

Mannhardt, C., Rausch, T.K., Fortmann, M.I., Swoboda, I., Humberg, A., Spiegler, J., Göpel, W., 2020. Genetic predisposition for vitamin D deficiency is not associated with adverse outcome of very low birth weight infants: A cohort study from the German Neonatal Network. *PLoS ONE* 15 (3): e0230426.