Aus der Klinik für Neonatologie – Campus Virchow Klinikum
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Bedeutung des VEGF 405 G>C Polymorphismus beim Ductusverschluss sehr unreifer Frühgeborener

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tünay Aydin

aus Berlin

Datum der Promotion: 09.09.2016

INHALTSVERZEICHNIS

Abstrakt deutsch III

Abstract English V

Abkürzungsverzeichnis VII

1 EINLEITUNG 1

1. 1 Pathophysiologie des persistierenden Ductus arteriosus 1

1.1.1 Anatomie, Funktion und postnataler Verschluss 1

1.1.2 Besondere Bedeutung und mögliche Komplikationen des DA bei Frühgeborenen 3

1.1.3 Klinik und Diagnostik des PDA 4

1.1.4 Therapiemöglichkeiten 5

1. 2 VEGF 6

1.2.1 Aufbau und Isoformen von VEGF 6

1.2.2 Funktion von VEGF 7

1.2.3 Regulation der VEGF-Expression 8

1.2.4 Bedeutung von VEGF für sehr unreife Frühgeborene 8

1.2.5 Der VEGF 405G>C Polymorphismus 9

1. 3 Fragestellung 10

2 METHODEN UND MATERIALIEN 11

2. 1 Methoden 11

2.1.1 Studienpopulation 11

2.1.2 Optimierung der Versuchsbedingungen und Methodenübersicht 12

2.1.3 DNA-Isolierung 13

2.1.4 Polymerasekettenreaktion 14

2.1.5 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus und Gelelektrophorese 15

2.1.6 Sequenzierung 17

2.1.7 Statistik 17

2.2 Materialien 18

2.2.1 Chemikalien 18

2.2.2 Verbrauchsmaterialien 19

2.2.3 Geräte 19

3 ERGEBNISSE 19

3.1 Optimierte Versuchsbedingungen 20

3.2 Gelelektrophoretische Auftrennung der Patientenproben 20

3.3 Sequenzierung der Kontrollproben 21
3.4 Klinische Daten der Patientenpopulation 23
3.5 Die Allelfrquenz des VEGF-Polymorphismus in der Studienpopulation 25
3.6 PDA-Intervention und Therapieerfolg 25
3.6.1 Der Zusammenhang des VEGF-Polymorphismus zum COX-Hemmer-Therapieerfolg 26
3.6.2 Vergleich der klinischen Patientendaten beider COX-Hemmer-Gruppen..... 28
3.6.3 Vergleich der klinischen Parameter von Respondern und Non-Respondern der COX-Hemmer-Therapie 29
3.6.4 Der Zusammenhang des Polymorphismus mit dem COX-Hemmer Zyklusbedarf..31
3.6.5 Der Zusammenhang des Polymorphismus mit der Ligaturnotwendigkeit 32
3.6.6 Der Zusammenhang des PDA-Veschlusszeitpunktes mit dem Polymorphismus... 32
3.6.7 Ethnizität unter den Respondern und Non-Respondern 33
3.6.8 Mehrlingsbetrachtung 34
3.7 Zusammenhang von Polymorphismus und Komorbidität der VLBW-Kinder 34
3.7.1 Respiratory Distress Syndrom 34
3.7.2 Bronchopulmonale Dysplasie 34
3.7.3 IVH, PVL, NEC 35
3.7.4 Frühgeborenenretinopathie 35
4 DISKUSSION 38
4.1 Klinisches Profil der Gesamtpopulation 38
4.2 Allelfrequenz des VEGF G>C Polymorphismus. 40
4.3 Diskussion der genetischen Einflussfaktoren auf den PDA 40
4.4 Einfluss des VEGF und seiner Rezeptoren auf den PDA 41
4.5 Diskussion des Einflusses des VEGF-Polymorphismus auf den Therapieerfolg 43
4.6 Der VEGF Einfluss auf die ROP-Inzidenz 46
4.7 Stärken und Schwächen dieser Arbeit 47
5 LITERATURVERZEICHNIS 49
6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS 58
7 TABELLENVERZEICHNIS 59
8 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG 60
9 LEBENSLAUF 61
10 PUBLIKATIONSLISTE 62
11 DANKSAGUNG 63

Abstrakt deutsch

In der Neonatalmedizin wird heutzutage hauptsächlich versucht, die Therapiestrategien dahingehend zu verändern, dass sie zu einem verbesserten Langzeitüberleben von sehr unreifen Frühgeborenen beitragen. Der postnatale Verschluss des DA verläuft in zwei Phasen. Nach dem funktionellen Verschluss innerhalb der ersten 72 Lebensstunden folgt der dauerhafte anatomische Umbau zum Ligamentum arteriosum. Ist ein nach dem 3. Lebenstag noch offener sogenannter persistierender DA (PDA) hämodynamisch signifikant (hsPDA), so wird in der Regel eine medikamentöse Therapie mit Cyclooxygenase (COX)-Hemmern eingeleitet oder bei deren Versagen eine chirurgische Ligatur durchgeführt.

Der Hypoxie-abhängig regulierte Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist essentieller Mediator für den zellulären Umbau des Ductus. Das Wissen um das Vorliegen eines VEGF-Polymorphismus könnte somit dazu beitragen, die Ductustherapie bei Very low birth weight (VLBW)-Kindern zu optimieren.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Bedeutung des VEGF 405 G>C Polymorphismus im Rahmen des Ductusverschlusses bei VLBW-Kindern zu untersuchen. Hierzu wird laborexperimentell Desoxyribonukleinsäure aus Screening-Filterkarten von VLBW-Frühgeborenen mit und ohne PDA isoliert und mittels Polymerase-Kettenreaktion und Restriktionsfragmentlängen-polymorphismus der VEGF 405 G>C Polymorphismus detektiert.

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit 1053 VLBW-Kinder, hierunter 295 VLBW-Kinder mit hsPDA, auf den VEGF 405 G>C Polymorphismus untersucht. In unserer Studienpopulation lag die Allelfrequenz des mutierten Gens bei 77,7%. Die Inzidenz des PDA bei VLBW-Kindern mit und ohne VEGF-Polymorphismus zeigt keinen statistischen Unterschied. Die Betrachtung des Polymorphismuseinflusses auf den COX-Hemmer Therpieerfolg zeigt lediglich eine Tendenz. Homozygote Allelträger sind häufiger Therpieversager bei Erhalt einer Ibuprofentherapie zum Ductusverschluss: 38% der Ibuprofen-Responder sind Allelträger des homozygot mutierten Allels, bei den Non-Respondern 54%. Zudem beobachteten wir eine ebenso hohe Rate an Wiederöffnungen des initial mit Ibuprofen erfolgreich verschlossenen Ductus bei homozygoten Allelträgern des Polymorphismus. In der Ibuprofen-Gruppe benötigte nahezu die Hälfte der Kinder mehr als zwei Therapiezyklen. Mehr als ein Drittel der Kinder, die Indometacin zum Ductusverschluss erhielten, reagierten bereits nach einem Zyklus erfolgreich. VLBW-Kinder, die mehr als einen Zyklus Indometacin benötigten, waren zu 93% Allelträger

des VEGF-Polymorphismus (93% vs. 77%). Weitere bedeutsame Faktoren für ein Versagen der COX-Hemmer waren ein niedrigeres Geburtsgewicht und Gestationsalter der Frühgeborenen. Insgesamt erkrankten Non-Responder häufiger an einer Frühgeborenenretinopathie und einer bronchopulmonalen Dysplasie als Responder.

Abschließend zeigen unsere Ergebnisse, dass es in unserem großen VLBW-Kollektiv weder zwischen dem Auftreten eines hsPDA, noch zwischen dem Ansprechen auf die COX-Hemmer-Therapie und dem Nachweis des VEGF 405 G>C Polymorphismus einen Zusammenhang gibt. Dennoch wäre es sinnvoll, den Zusammenhang des VEGF-Polymorphismus und der VEGF- sowie der VEGF-Rezeptor-Expression in weiteren Studien in vitro und in vivo genauer zu untersuchen.

Abstract English

The main aim of neonatal medicine today is to change current therapeutic strategies to achieve better long-term survival of very immature preterm infants. Immaturity can result in the failed closure of the Ductus arteriosus. The postnatal closure of the DA consists of two phases: Functional closure in the first 72 hours of life is followed by the permanent anatomical conversion to the ligamentum arteriosum. In the case of a hemodynamically significant persisting ductus arteriosus (hsPDA), drug therapy with Cyclooxygenase (COX) inhibitors is initiated. Surgical PDA ligation is considered after failed COX inhibitor therapy.

Hypoxia-dependent regulated Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is an essential mediator for the cellular remodeling. Awareness of the presence of VEGF polymorphism could contribute to optimizing ductus therapy for very low birth weight VLBW infants.

The goal of this study was to explore the role of VEGF 405 G>C polymorphism during the closure of the DA in very low birth weight (VLBW) infants. For this purpose, desoxyribunucleic acid was isolated from blood samples from screening cards of VLBW newborns with and without PDA, and was amplified using polymerase chain reaction to detect VEGF 405 G>C polymorphism by the restriction fragment length polymorphism.

In this study, a total 1053 VLBW infants, hereunder 295 infants with an hsPDA, were tested for VEGF 405 G>C polymorphism. The results indicate that the allele frequency of the mutated allele in our study population is 77.7%. There is no statistical difference in the incidence between VLBW infants with and without VEGF polymorphism. The influence of VEGF polymorphism on the success of COX-inhibitor therapy only revealed a trend. Infants with a homozygote allele are more often non-responders to ductus therapy with ibuprofen: 38% of ibuprofen responders have a homozygote allele, while the prevalence among ibuprofen non-responders is 54%. Moreover, a higher rate of reopening after initial successful treatment with ibuprofen was observed with a homozygote allele. Half of all infants in the ibuprofen group needed more than two cycles. One third of infants who received indomethacin therapy responded successfully after the first cycle. Of the VLBW infants who needed more than one cycle, 93% carried a polymorphic allele (93% vs. 77%). Higher gestational age and birth weight were more relevant factors indicating responsiveness to COX-inhibitor. Overall, non-responders suffer more frequent from retinopathy of prematurity and bronchopulmonary dysplasia than responders.

Finally, our results indicate that there is no link in our large study population between VEGF 405 G>C polymorphism and the occurrence of either hsPDA, or the response to COX-inhibitor treatment.

Thus additional in vitro and in vivo studies to determine the role of VEGF polymorphism on VEGF expression and its VEGF receptors seem necessary.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
AMPK	AMP-aktivierter Proteinkinsae
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
bp	Basenpaar
BPD	bronchopulmonale Dysplasie
ca.	circa
CO_2	Kohlendioxid
COX	Cyclooxygenase
CRIB	Clinical Risk Index for Babies
CYP	Cytochrom P-450
DA	Ductus arteriosus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDHF	Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor
EET	Epoxyeicosatriensäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EPCs	Eppendorfcups
ELBW	extremely low birth weight infant
FGF-4	Fibroblast Growth Factor 4
GA	Gestationsalter
GG	Geburtsgewicht
HE	heterozygot
HIF-1	Hypoxie induzierbarer Faktor 1
HO	homozygot
HRE	Hypoxie responsives Element
hsPDA	hämodynamisch signifikanter PDA
IGF-I	Insulin-like Growth Factor I
IVH	intraventrikuläre Hirnblutung
kDA	Kilodalton
KGF	Keratinocyte Growth Factor
LA:Ao Ratio	Verhältnis von linkem Vorhof zur Aortenwurzel

mg/kg/KG	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NEC	nekrotisierende Enterokolitis
NO	Stickstoffmonoxid
NSAID	nicht-steroidales Antiphlogistikum
NT-proBNP	N-terminales Peptid des pro-BNP-Hormons
PCI	Phenolchloroformisoamylalkohol
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDA	Persistierender Ductus arteriosus
PDGF	Platelet derived Growth Factor
PGE_2	Prostaglandin E_2
PGI_2	Prostaglandin I_2
PIGF	Placenta derived Growth Factor
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
PVL	periventrikuläre Leukomalazie
RDS	Atemnotsyndrom
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
ROP	Frühgeborenenretinopathie
rpm	revolutions per minute
svVEGF	snake venom Vascular Endothelial Growth Factor
TGF-ß	Transforming Growth Factor ß
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor α
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
VATS	video-assistierte Thorakoskopie
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLBW	very low birth weight infant
vs.	versus
WT	Wildtyp

1 EINLEITUNG

1.1 Pathophysiologie des persistierenden Ductus arteriosus

Galen beschrieb erstmals in seinen Schriften die fetale Struktur, die wir heute Ductus arteriosus (DA) Botalli nennen [1]. Zum Verständnis über die funktionelle Bedeutung trug Harvey im 17. Jahrhundert mit der Entdeckung des Blutkreislaufes bei [2]. Die Erkenntnisse Virchows über den histologischen Aufbau des DA und dessen klinische Bedeutung für den postnatalen Verschluss gaben Anregungen für die weitere Erforschung des DA [3]. Heute ist das Verständnis der physiologischen Reifeprozesse des DA sowie die Erkenntnisse über deren genaue zeitliche Abläufe Voraussetzung für eine erfolgreiche Therapie. Im Folgenden werden die Bedeutung und Funktion des DA, wichtige Ursachen und Komplikationen der Ductuspersistenz bei Frühgeborenen sowie verschiedene Therpiemöglichkeiten eines persistierenden Ductus arteriosus dargestellt.

1.1.1 Anatomie, Funktion und postnataler Verschluss

Bedeutung und Anatomie des DA pränatal: Das Foramen ovale und der DA sind zwei fetale Strukturverbindungen zwischen dem rechten und linken Kreislauf. Ein Drittel des Herzzeitvolumens fließt über das Foramen ovale vom rechten in den linken Vorhof und versorgt über die Aorta ascendens das Myokard und das Gehirn. Die Funktion des DA im fetalen Blutkreislauf ist die Leitung eines Großteils des in der Plazenta mit Sauerstoff angereicherten Blutes unter Umgehung des Lungenkreislaufes direkt vom rechten Herzen in den großen Kreislauf. Infolge des hohen Gefäßwiderstandes im Pulmonalkreislauf der intrautrin nicht entfalteten Lunge erreichen lediglich 8 % des Herzzeitvolumens die Lungen. Das distal der Mündung des DA im Aortenbogen entstehende sauerstoffärmere Mischblut versorgt die restliche Körperpartie und drainiert anschließend über zwei Umbilikalarterien zum erneuten Gasaustausch in die Plazenta. Dieser Kreislauf gewährleistet die intrauterine Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Feten bei noch nicht belüfteten Lunge (Abbildung 1) [4].

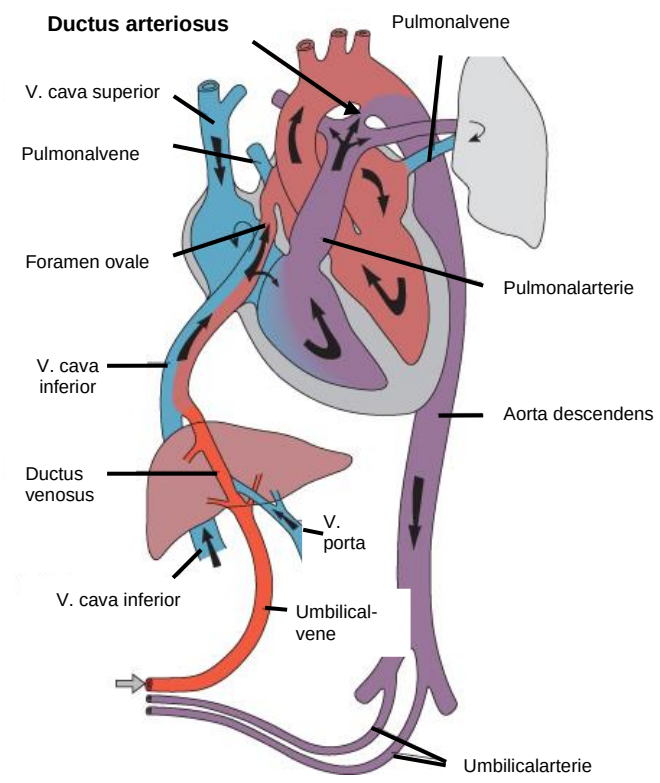

Abbildung 1: **Der fetale Kreislauf [5].**

Embryogenese und Aufbau: Embryonal entwickelt sich aus dem distalen Anteil des linken sechsten Kiemenbogens der sog. „Ductus arteriosus Botalli“ als eine Kurzschlußverbindung zwischen dem Pulmonalarterienstamm und dem absteigenden Teil des Aortenbogens [6]. Der Aufbau des DA ist genetisch anders determiniert als die anderen Aortenbogenäste, sodass er im Gegensatz zu diesen eine ausgeprägtere muskuläre Media aus longitudinal und spiralförmig angeodneten Glattmuskelfaserschichten aufweist [7]. Die subintimal konzentrisch angeordneten Elastica interna Faserschichten verleihen dem DA zusätzlich die Eigenschaften elastischer Arterien.

Verschluss: Der postnatale Verschluss des DA erfolgt in zwei Phasen. Diese sind der initiale funktionelle Verschluss gefolgt vom dauerhaften anatomischen Umbau des DA zum Ligamentum arteriosum.

Bereits ab dem zweiten Trimenon verändert sich die morphologische Struktur des DA. Luminale Endothelien lösen sich aus ihrem Verband und proliferieren. Gleichzeitig entstehen durch Migration glatter Muskelzellen aus der Media in die Intima neointimale Kissen. Diese

Veränderungen verkleinern das duktale Lumen in Vorbereitung auf den postnatalen Verschluss [8, 9]. Mit der Abnabelung wird die Plazentazirkulation unterbrochen. Folglich entfällt mit dem Plasmakonzentrationsabfall der plazentar produzierten Prostaglandine E_2 ($PGE_{2)}$ und I_2 (PGI_2) und Stickstoffmonoxid (NO) deren vasodilatierende Wirkung [10-12]. Der Anstieg des Kohlendioxid ($CO_{2)}$-Partialdrucks im arteriellen System aktiviert das Atemzentrum, wodurch Atembewegungen einsetzen und sich die Lungen entfalten. Der infolgedessen steigende Sauerstoffpartialdruck bewirkt eine Vasokonstriktion im DA und über die Vasodilatation beider Pulmonalarterien eine dramatische Widerstandssenkung im Pulmonalalkreislauf. Das nun erstmals umgekehrte Druckgefälle zwischen Lungen- und Körperkreislauf reduziert den rechts-links-Shunt über den DA und über das Foramen ovale auf 3-4% des Herzzeitvolumens und trägt ebenfals zum funktionellen Ductusverschluss bei [13]. Dieser sollte nach 10-72 Stunden postnatal abgeschlossen sein [14].

Zeitgleich beginnt die zweite Phase des anatomischen Umbaus. Diese wird durch den erhöhten Sauerstoffpartialdruck bedingten intrazellulären Kalziumeinstrom und die durch die vermehrte Ausschüttung von Endothelin 1 bedingte Kontraktion glatter Muskelzellen des DA induziert [15, 16]. Die hieraus resultierende lokale Hypoxie und die durch Ausschüttung von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Transforming Growth Factor ß (TGF-ß) bewirkte Dedifferenzierung und Apoptose glatter Muskelzellen tragen maßgeblich zum endgültigen Gefäßumbau des DA zum Ligamentum arteriosum bei [17]. Erst 2-3 Wochen postnatal ist diese Phase abgeschlossen [18].

Auch Thrombozyten scheinen eine wichtige Rolle beim Ductusverschluss zu spielen. Die veränderte luminale Intimaauskleidung des DA soll über die Ausbildung eines Thrombozytenpfropfes zum Verschluss des Ductusrestlumens führen [19].

1.1.2 Besondere Bedeutung und mögliche Komplikationen des DA bei Frühgeborenen

Die funktionelle Phase des Ductusverschlusses sollte physiologischerweise innerhalb der ersten 72 Lebensstunden abgeschlossen sein. Dies erreichen 95% der Reifgeborenen [18]. Von einem persistierenden DA (PDA) wird gesprochen, wenn bis zu diesem Zeitpunkt die Verkleinerung des Ductuslumens ausbleibt. Die hämodynamische Relevanz wird von der Größe und Länge des PDA, dem resultierenden Shuntvolumen und von kardiopulmonalen Reaktionen geprägt [20-22].

Zwischen Reif- und Frühgeborenen bestehen sowohl im funktionellen, als auch im anatomischen Umbauprozess des Ductusverschlusses mehrere Unterschiede, die bei circa (ca.) 60% der Frühgeborenen zu einem verzögerten bis unvollständigen Verschluss des DA führen

[23]. Die geringere Kontraktilität glatter Muskelzellen des unreifen DA bewirkt nicht den gleichen Hypoxiegrad wie am reifen DA, der am unreifen DA erst bei Verlegung des gesamten Ductuslumens erreicht wird. Zudem weisen Frühgeborene höhere Plasmaprostaglandinspiegel auf und reagieren sensitiver auf Prostaglandine, was die höhere Prävalenz eines PDA unter Very Low Birth Weight (VLBW)-Kindern von 60-72% erklärt [24-26].

Der hämodynamisch signifikante PDA (hsPDA) wird statistisch mit anderen Folgeerkrankungen von Frühgeborenen und der damit verbundenen hohen Morbidität in Zusammenhang gebracht, obwohl hierfür eine gute Datenlage fehlt [27]. Ein ausgeprägter links-rechts-Shunt über den PDA begünstigt die Extravasation von Plasma ins Lungeninterstitium. Bei Überlastung des Lymphabflusses resultiert hieraus ein Lungenödem mit erschwertem pulmonalen Gasaustausch [28]. Die hohe Beatmungspflichtigkeit dieser Kinder kann zur bronchopulmonalen Dysplasie (BPD) führen. In Abhängigkeit der Ductusshuntgröße kann ein niedrigerer Systemdruck die Durchblutung nachgeschalteter Organe beeinträchtigen [29]. Das so genannte „ductal steal" Phänomen kann sich in der Ausbildung von intraventrikulären Hirnblutungen (IVH), einer periventrikulären Leukomalazie (PVL), einer intestinalen Ischämie mit der Ausbildung einer nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) sowie in einer renaler Minderdurchblutung mit Oligo- bzw. Anurie äußern [30, 31].

1.1.3 Klinik und Diagnostik des PDA

In Abhängigkeit von der Ductusgröße und dem Ausmaß des links-rechts Shuntvolumens werden die klinischen Symptome geprägt. Zu den PDA-spezifischen, jedoch wenig sensitiven klinischen Zeichen zählen ein systolisch-diastolisches Maschienengeräusch über dem 2. Interkostalraum links parasternal, ein hyperaktives Präkordium, peripher kräftige Pulse mit großer Amplitude (Pulsus celer et altus) und eine Hypotension insbesondere bei kleinen Frühgeborenen. Tachykardie, Tachypnoe und Verschlechterung bzw. ausbleibende Verbesserung der respiratorischen Situation mit Unmöglichkeit der Extubation bzw. Entwöhnung von zusätzlichem Sauerstoffbedarf stellen sich als sensitive, jedoch unspezifische Kriterien dar [32]. Bei Fehlen dieser typischen Symptome trotz echokardiographisch nachgewiesenem Shunt wird von einem „silenten Ductus" gesprochen [33].

Die Echokardiographie ist unerlässlich für die Diagnose eines PDA, zur Bewertung von Größe, Gestalt und hämodynamischer Relevanz, die eine wesentliche Voraussetzung für die

Indikationstellung zur Therapie darstellt [34]. Hierbei werden der Shuntfluss, das Verhältnis zwischen Durchmesser des linken Vorhofs und der Aortenwurzel (LA:Ao Ratio), der Durchmesser des PDA, der diastolische Fluss in der Aorta descendens, das linksventrikuläre Schlagvolumen und der Fluss in der Vena cava superior zur PDA-Einschätzung ermittelt [35-38]. Allerdings existiert bislang keine einheitliche Definition von Kriterien sowie von Grenzwerten, die die eindeutige Einstufung eines PDA als „hämodynamisch singnifikant" und damit als therapiebedürftig erlauben [39].

Radiologische Zeichen sind die Herzsilhouettenzunahme mit Vergrößerung des linken Vorhofs und linken Ventrikels sowie ein Lungenödem [34].

Als biochemische Screeningmarker haben sich die Serumbestimmung des B-Typ natriuretischen Peptids (BNP) und seines N-terminalen Fragments (NT-proBNP) in der Ductusdiagnostik herausgestellt [40]. Das BNP-Pro-Hormon wird bei Druck- und Volumenbelastung des Herzens vom Myokard sezerniert und in BNP und NT-proBNP gespalten [41]. Der Konzentrationsanstieg dieser Parameter im Serum spiegelt die kardiale Belastung, die bei Erwachsenen auf eine Herzinsuffizienz und bei Frühgeborenen auf einen hsPDA hindeuten kann, wider [42].

1.1.4 Therapiemöglichkeiten

Medikamentöse Therapie

Der medikamentöse Ansatz der Ductustherapie besteht in der Hemmung der Synthese von ductusrelaxierenden Prostaglandinen. Dies wird mithilfe von nicht-selektiven Hemmern der Cyclooxygenase (COX) 1 und COX-2, die die Arachidonsäure in Prostaglandine, Leukotriene, Thromboxane sowie Prostazykline unwandeln, erreicht. Als wichtige Vertreter dieser Gruppe sind die nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAID) Indometacin und Ibuprofen zu erwähnen. Indometacin wird seit den 70er Jahren europaweit, mit Ausnahme von Großbritannien, im „off-label" Gebrauch zur Ductusintervention eingesetzt [43, 44]. Mittels Indometacinanwendung lässt sich in 70-90% der Fälle ein erfolgreicher Ductusverschluss erzielen. Die Indometacintherapie ist mit cerebralen, renalen, sowie mesenterialen Durchblutungstörungen assoziiert [45]. Generelle Empfehlungen zur Dosierung und zur Therapiedauer für Indometacin in der Ductustherapie existieren nicht.

Im Gegensatz zu Indometacin ist Ibuprofen seit 2005 europaweit für die medikamentöse Ductusintervention zugelassen. Bei vergleichbarer Effektivität führt Ibuprofen nicht zu einer relevanten Hypoperfusion lebenswichtiger Organe und erhöht sogar die cerebrale Autoregulation zur Sicherstellung der Sauerstoffversorgung [46-48].

Operativer Verschluss

Die erste erfolgreiche chirurgische Ductusligatur führte Robert Gross 1934 im Rahmen der Korrektur eines kongenitalen Herzfehlers bei einem 7 Jahre alten Kind in Boston durch [49]. Später wurde in den 90er Jahren die thorakoskopische PDA-Ligatur in Paris entwickelt [50]. Heute wird die chirurgische Intervention des PDA bei Frühgeborenen in Anbetracht von möglichen schweren Komplikationen als Methode zweiter Wahl nach erfolgloser medikamentöser Therapie bzw. bei Vorliegen von Kontraindikationen gegen Ibuprofen und Indometacin eingesetzt. Besonders die sehr unreifen Frühgeborenen sind mit dem Risiko des Auftretens von Pneumothoraces, Frühgeborenenretinopathie (ROP), BPD, Rekurrensparese und Thoraxdeformitäten wie der sekundären Thoraxskoliose behaftet [51-53]. Diese Erkenntnis führte zur Entwicklung einer sicheren und komplikationsärmeren Methode, der video-assistierten Thorakoskopie (VATS) [54].

1.2 VEGF

1.2.1 Aufbau und Isoformen von VEGF

Erstmals wurde 1983 VEGF als „vascular permeability factor", ein Protein mit einer um das 50-fach höheren gefäßpermeabilisierenden Potenz als Histamin, beschrieben [55]. 1989 wurde die komplette VEGF kodierende Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Sequenz entschlüsselt [56]. VEGF ist ein Heparin-bindendes homodimeres Glykoprotein, welches aus zwei Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je 23 Kilodalton (kDa) besteht [57]. Zur Familie der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren zählt eine Gruppe von homologen Proteinen, die man inzwischen als VEGF-A (häufig nur als VEGF bezeichnet), VEGF-B, -C, -D, -E, PIGF (Placenta derived Growth Factor) und svVEGF (snake venom VEGF) identifiziert hat [4, 58-60]. Lokalisiert ist das menschliche VEGF-Gen auf Chromosom 6p21.3 [61]. Die Kodierungsregion umfasst 8 Exons, die von 7 Introns getrennt werden. Die VEGF messenger Ribonukleinsäure (mRNA) enthält immer die Exons 1-5 und Exon 8. Infolge alternativen Splicings der Exons 6 und 7 entstehen acht verschiedene VEGF-A Subtypen, die jeweils nach der Aminosäurenkettenlänge benannt werden [62]. Diese sind VEGF 121, 145, 148, 162, 165, 183, 189 und 206 (Abbildung 2). Besonders hervorzuheben ist VEGF 165, das zusammen mit VEGF 121 und 189 das potenteste und am häufigsten exprimierte VEGF-Protein darstellt [63].

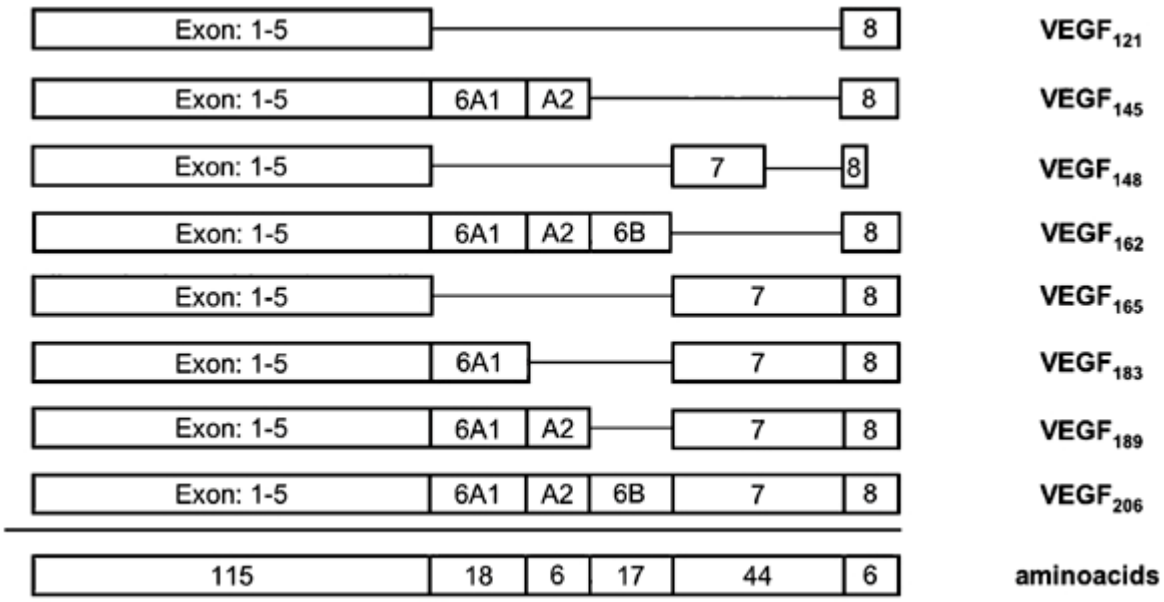

Abbildung 2: **Darstellung der VEGF-Isoformen [64].**

1.2.2 Funktion von VEGF

VEGF A, -B und PIGF sind vorwiegend Effektoren an vaskulären Endothelzellen, wobei hier besonders VEGF-A hervorzuheben ist [65]. VEGF-A reguliert als starkes Mitogen die Differenzierung, Proliferation und Migration von endothelialen Vorläuferzellen im Rahmen der Angio- und Vaskulogenese [66]. Eine erhöhte Gefäßpermeabilität bewirkt VEGF über die Fenestrierung und Kanalbildung des Endothelverbandes [67]. Hierdurch erklärt man sich beispielsweise das ischämisch induzierte Hirnödem, das hypoxische Lungenödem und das peritumoröse Ödem [68, 69]. Darüber hinaus vermittelt es gerinnungsfördernde, vasodilatatorische und vasokonskrikorische Eigenschaften [70].

VEGF-B wurde in vielen Geweben nachgewiesen. Insbesondere das Vorkommen in der Skelettmuskulatur und im Herzen ist für dessen Entwicklung von großer Bedeutung [4]. VEGF-C und –D sind Regulatoren der lymphatischen Angiogenese [59]. Zudem besitzt VEGF-D eine chemotaktische Wirkung auf Monozyten und fördert die Proliferation von Chondrozyten in der Wachstumsfuge. VEGF-E wird von einem Virus kodiert und weist angiogenetisches Potential auf [60].

Der hämatopoetische Effekt von VEGF ist an der Koloniebildung von Granulozyten und an der Rekrutierung hämatopoetischer Stammzellen erkennbar [71, 72]. In der Lunge steigert VEGF die Surfactantproduktion [73]. Zudem wird VEGF eine neuroprotektive Funktion zugesprochen, die durch seinen mitogenen Einfluss zur axonalen Aussprossung führt und Motoneurone vor Degeneration, wie beispielseise im Rahmen der amyotrophen

Lateralsklerose (ALS) schützt [74, 75]. Die zentrale Bedeutung von VEGF in der koordinierten Bildung von Blutgefäßen und Endothelien sowie der Organformation, erklärt, wieso die stärkste VEGF-Expression während der Embryonalentwicklung stattfindet. Bei Erwachsenen ist VEGF bei Prozessen, die mit einer Neovaskularisation einhergehen, erhöht. Dies kann physiologisch beim weiblichen Menstruationszyklus oder pathologisch im Rahmen von Entzündungen oder Tumorerkrankungen vorkommen.

1.2.3 Regulation der VEGF-Expression

VEGF wird von Makrophagen, Glattmuskelzellen, aktivierten T-Zellen und Endothelien produziert. Eine zentrale Rolle der transkriptionell regulierten VEGF-Genexpression nimmt der Hypoxie induzierbare Faktor 1 (HIF-1) ein. Unter Hypoxie dimerisiert die HIF-alpha Untereinheit mit der HIF-beta Untereinheit zum Transkriptionsfaktor HIF-1, der über die Bindung an das Hypoxie responsive Element (HRE) des VEGF-Promotors die Transkription von VEGF steuert [76]. Weitere Induktoren der VEGF-Expression sind Wachstumsfaktoren wie beispielsweise der Epidermal Growth Factor (EGF), der Tumor Nekrose Faktor α (TNF-α), der TGF-β [77], der Insulin-like Growth Factor I (IGF-I), der Keratinocyte Growth Factor (KGF), der Fibroblast Growth Factor (FGF-4) und der Platelet derived Growth Factor (PDGF) [78]. Des Weiteren induzieren die inflammatorischen Zytokine Interleukin-6 und -1β die VEGF-Freisetztung und untermauern so die These, dass VEGF Angiogenese-Faktor bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen sei [79, 80]. Als hormonelle Regulatoren der VEGF-Expression sind in Schilddrüsenkarzinomzellen das Thyroidea-stimulierende Hormon (TSH) und in den Ovarien die Gonadotropine bekannt [81, 82] .

1.2.4 Bedeutung von VEGF für sehr unreife Frühgeborene

VEGF ist essetieller Mediator für die endgültige Obliteration des DA mit Umbau zum Ligamentum arteriosum. Die durch Ductuskontraktion herrschende Hypoxie bewirkt die VEGF-Expression, die zur Hyperplasie neointimaler Endothelien und Proliferation von Vasa vasorum führt. Durch tierexperimentelle Arbeiten konnte bereits das Vorkommen von VEGF-mRNA und -Protein im Ductusgewebe verschiedender Spezies, wie neugeborener Paviane und Lämmer, bewiesen werden [83]. Im Ductusendothel von embryonalen Ratten wurden VEGF und seine Rezeptoren nachgewiesen. Im Gegensatz zu den Endothelzellen permenenter Gefäße unterliegen VEFG und seine Rezeptoren 1 und 2 im Ductusendothel einem eigenen Regulationsmechanismus [84]. Die Arbeitsgruppe von Weber et al. wies an post mortem Präparaten von 63 Feten das Vorkommen von VEGF im Endothel, der Intima und Media des

humanen DA immunhistochemisch nach [85]. Clyman zeigte in seiner Arbeit die essentielle Rolle des VEGF bei der Einsprossung der Vasa vasorum und der Migration der Glattmuskelzellen in der zweiten Phase des Ductusverschlusses [83].

Eine weitere entscheidende Rolle spielt VEGF bei sehr unreifen Frühgeborenen in der Pathophysiologie der ROP. Zum Zeitpunkt der Geburt ist die Hypoxie-abhängig regulierte Vaskularisation der Netzhaut bei Frühgeborenen noch nicht abgeschlossen. Primär herrscht postnatal in der unreifen Retina Frühgeborener ein relatives Überangebot an Sauerstoff, das die Gefäßaussprossung hemmt und zur Obliteration bereits existierender retinaler Gefäße führt. Hieraus resultiert eine lokale Hypoxie, die mit einer Latenz von mehreren Wochen sekundär über die VEGF-Ausschüttung zur Neovaskularisation retinaler Gefäße führt. Hierin verbirgt sich das Risiko von Retinaablösungen, die bis hin zur Erblindung des betroffenen Auges führen können.

Häufig überschneidet sich der Zeitpunkt der medikamentösen Ductustherapie mit der vulnerablen Phase der Retinopathieentstehung.

1.2.5 Der VEGF 405 G>C Polymorphismus

Der VEGF 405 G>C Polymorphismus bedeutet ein Basenaustasch von Cytosin durch Guanin an der 405ten Basenposition des Gens (Abbildung 3). Kommt dies bei mehr als 1% der Population einer Spezies vor, so spricht man von einem Polymorphismus. Aus dem Basenaustausch resultiert eine verminderte VEGF-Expression infolge der Beeinflussung des Promotorbereiches.

Der VEGF 405 G>C Polymorphismus ist Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen geworden. So weiß man heute, dass er womöglich an der Entstehung u.a. von Endometriose und Magenkarzinom beteiligt ist [86, 87].

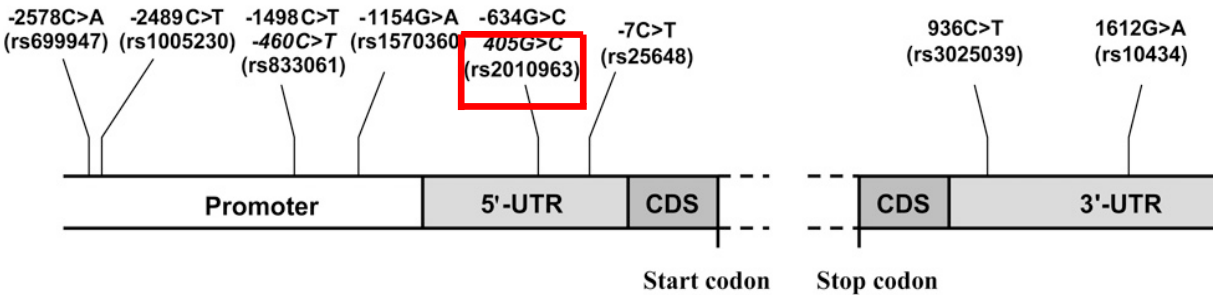

Abbildung 3: **Struktur des VEGF Gens [88].**

Markierung der Lokalisation des VEGF 405 G>C Polymorphismus im Kästchen.

1.3 Fragestellung

Aufgrund der verbesserten medizinischen Versorgung ist die Überlebenswahrscheinlichkeit sehr unreifer Frühgeborener unter 1500g (VLBW), die in Europa ca. 1-2% aller Neugeborenen ausmachen, in den letzten Jahrzehnten stetig gestiegen. VLBW-Kinder sind durch zahlreiche prädisponierende Faktoren dem Risiko der Entwicklung typischer Frühgeborenenerkrankungen und somit einer hohen Morbiditätsrate ausgesetzt. Daher werden die heutigen Therapiestrategien in der Neonatalmedizin vor allem auf eine Verbesserung des Langzeitüberlebens von Frühgeborenen ausgerichtet. Das Bestehen eines PDA wird mit dem Auftreten typischer Frühgeborenenerkrankungen wie IVH, PVL, ROP, BDP und NEC in Zusammenhang gebracht. So wird angenommen, dass die Prävention und adäquate Therapie des PDA, das Outcome der VLBW-Kinder verbessern könnte.

Das Hypoxie-abhängig regulierte VEGF spielt vor allem beim zellulären Umbau des Ductus, der in der zweiten Phase des Ductusverschlusses zur Obliteration des Gefäßes führt, eine entscheidende Rolle. Das Wissen um das Vorliegen eines VEGF-Polymorphismus könnte dazu beitragen, die Ductustherapie bei VLBW-Kindern zu optimieren.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Bedeutung des VEGF 405 G>C Polymorphismus im Rahmen des Ductusverschlusses bei VLBW-Kindern zu untersuchen. Hierzu wird laborexperimentell DNA aus Screening-Filterkarten von VLBW-Frühgeborenen mit und ohne PDA isoliert und mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) der VEGF 405 G>C Polymorphismus detektiert.

Mittels der Genanalyse sollen folgende Fragen erörtert werden:

- Ist die Inzidenz eines PDA bei VLBW-Kindern, bei denen der VEGF 405 G>C Polymorphismus nachgewiesen werden konnte, erhöht?
- Beeinflusst der Polymorphismus den Ductustherapieerfolg?
- Erfordert das Vorliegen des Polymorphismus höhere Medikamentenzyklen für den erfolgreichen Ductusverschluss?
- Steht der VEGF-Polymorphismus im Zusammenhang mit dem Auftreten von anderen Frühgeborenenerkrankungen?

2 METHODEN UND MATERIALIEN

2. 1 Methoden

2.1.1 Studienpopulation

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden DNA Proben aus Screening-Filterkarten von 1118 VLBW-Kindern der Klinik für Neonatologie der Charité Universitätsmedizin Berlin aus dem Zeitraum von 1995 bis 2008 untersucht (Abbildung 4). Die klinischen Daten wurden aus den archivierten Epikrisen und Akten entnommen und blieben bis zur Vervollständigung der experimentellen Ergebnisse verschlüsselt. Aufgrund der schlechten Qualität der älteren DNA Proben konnten nur 1053 Proben bezüglich des Polymorphismusnachweises sicher ausgewertet werden.

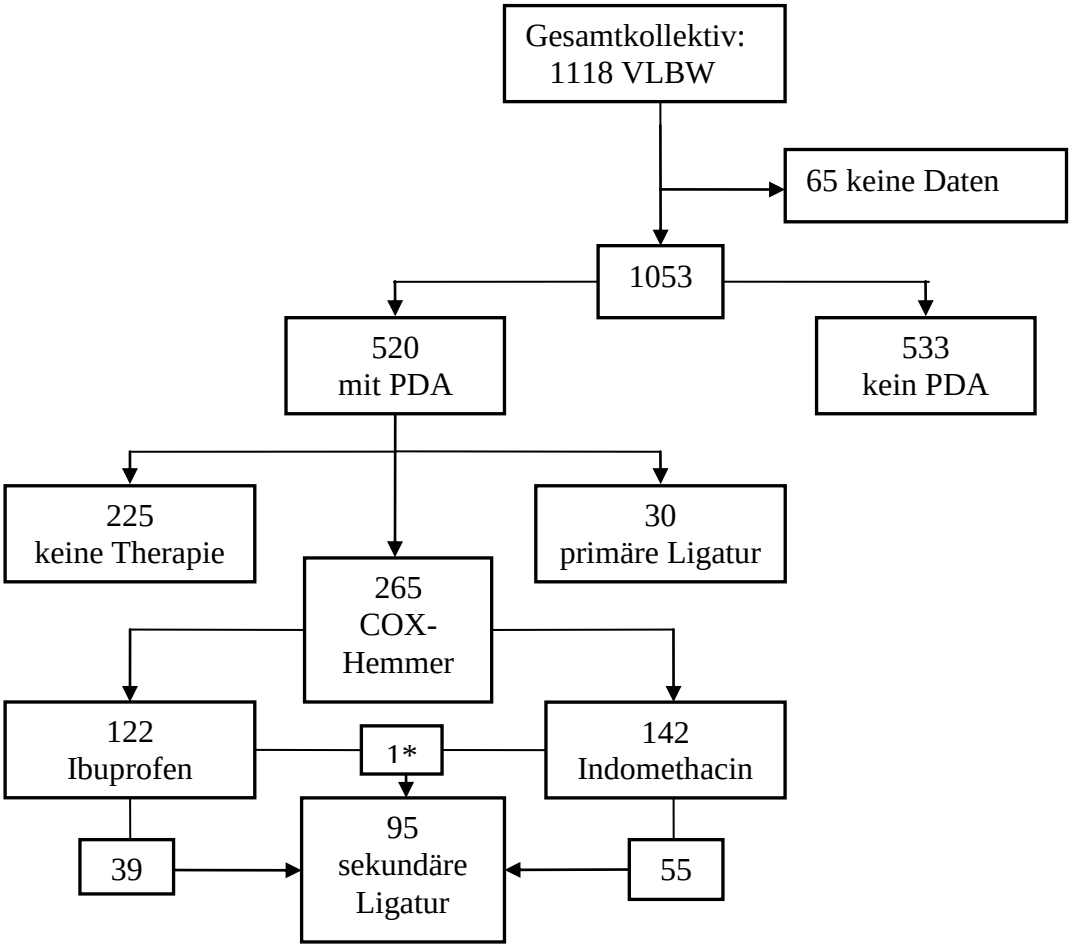

Abbildung 4: **Studienpopulation.**

*Ein Patient erhielt beide COX-Hemmer (Ibuprofen und Indometacin).

2.1.2 Optimierung der Versuchsbedingungen und Methodenübersicht

Die im Folgenden darstellten Versuchsmethoden wurden hinsichtlich der Annealing Temperatur der Primer, der DNA-Konzentration, der Magnesium ($MgCl_2$)-Konzentration sowie der PCR-Produkt-Konzentration für den Verdau optimiert. Die Abbildung 5 gibt eine schematische Übersicht über die verwendeten Methoden.

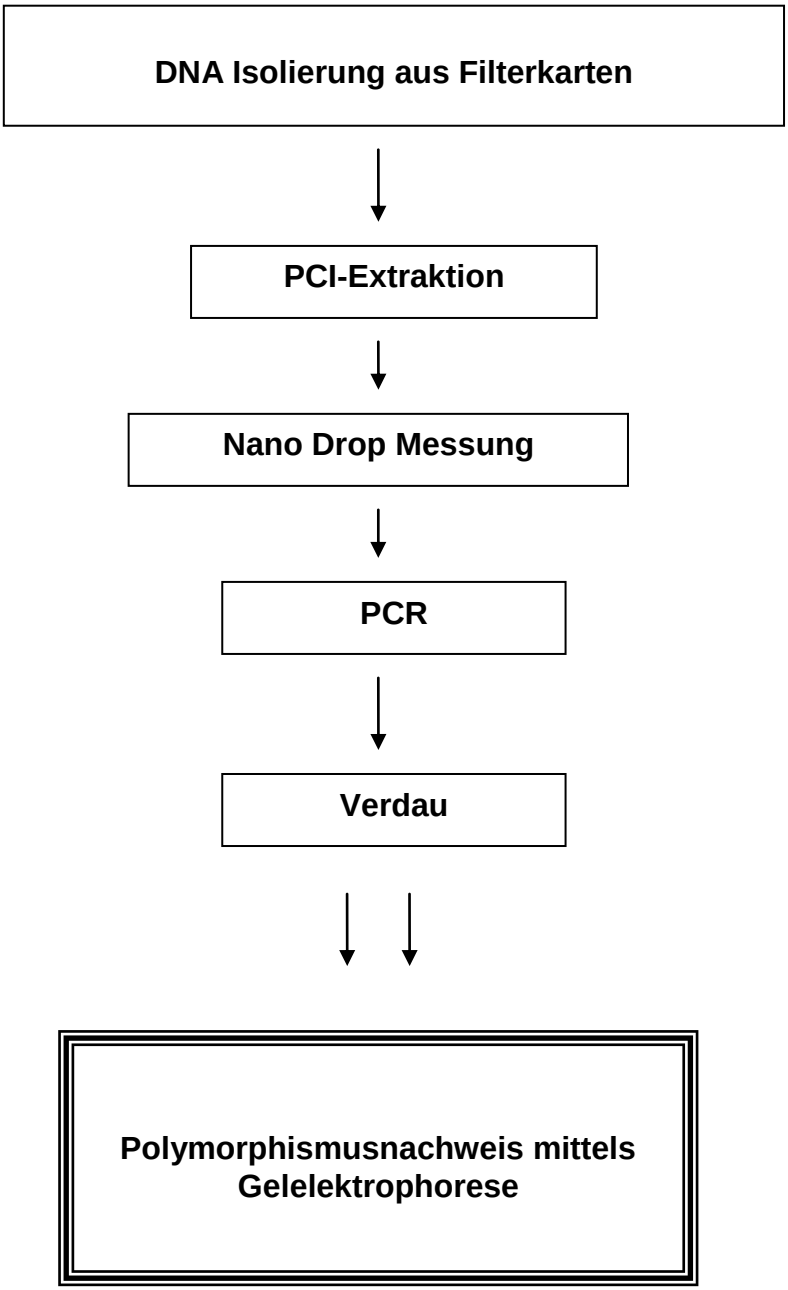

***Abbildung 5*: Schematische Methodenübersicht.**

2.1.3 DNA-Isolierung

DNA-Isolierung aus Filterpapierkarten

Die für den Nachweis des VEGF 405 G>C Polymorphismus benötigte DNA wurde aus den mit getrocknetem Patientenblut getränkten und archivierten Neugeborenenscreening-Filterkarten wie folgt isoliert:

Mit einer sterilen Pinzette und einem sterilen Skalpell wurden ein bis zwei Plättchen mit getrocknetem Blut vorsichtig aus den Filterkarten herausgeschnitten und in sterile 50ml Falconröhrchen gegeben. Nach der Durchtränkung dieser mit 2ml Puffer A, 40µl Proteinkinase K (20mg/ml) und 20µl 10% SDS erfolgte die Inkubation bei 55°C über Nacht.

PCI-Extraktion

Im Anschluss an die Inkubation wurden die Plättchen mit Hilfe einer sterilen Pipette vorsichtig unter Ausdrücken aus der Lösung herausgezogen und entsorgt. Der Inhalt des Falconröhrchens wurde 10min bei 3000 revolutions per minute (rpm) zentrifugiert. Nach Abpipettieren von 600µl des Überstandes in jeweils ein 1,5ml Eppendorfcup (EPC) erfolgte die Zugabe von 1 Volumen Phenol. Dann wurde der Inhalt gemischt und für 10min bei 15000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut in frische 1,5ml EPCs überführt, je 1 Volumen Phenolchloroformisoamylalkohol (PCI 25:24:1) hinzupipettiert und bei 15000rpm für 10min zentrifugiert. Der so neu entstandene Überstand wurde nochmals in 1,5ml EPCs überführt und mit Isoamylalkohol (24:1) versetzt und abermals für 10min bei 15000rpm zentrifugiert. Der gebildete Überstand wurde wieder in frische 1,5ml EPCs pipettiert und mit 1/10 Volumen 3mol/L Natriumacetat (pH 5,2), 1 Volumen Isopropanol sowie 1µl Glycogen (1µg/µl) versetzt. Nach dem Mischen wurde die Lösung bei −20°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Zentrifugation der inkubierten Lösung für 30min bei 15000rpm. Daraufhin wurde der Überstand sehr vorsichig abpiperttiert und verworfen, sodass im EPC nur ein kleines weißes Pellet zurück blieb. Diesem wurden 500µl Ethanol hinzugegeben und das Gemisch anschließend für 5min bei 15000rpm zentrifugiert. Der Überstand hiervon wurde abpipettiert, mit 500µl Ethanol gemischt und erneut für 5min bei 15000rpm zentrifugiert. Zur Verbesserung des Reinheitsgrades der extrahierten DNA kann die Ethanolgabe mit anschließender Zentrifugation wiederholt werden. Das Ethanol im EPC wurde verworfen und die EPCs zum Trocknen in einen 37°C Thermoblock überführt. In die getrockneten EPCs erfolgte die Zugabe von 30µl TE-Puffer. Anschließend wurden diese 1-2h im Thermoblock bei 55°C inkubiert. Die Lagerung der DNA erfolgt bei −20°C.

Nano Drop Messung

Um vergleichbare Versuchsergebnisse erzielen zu können, ist der Einsatz konstanter DNA Konzentrationen in der PCR erforderlich. Die Nano Drop Analysesoftware bestimmt photometrisch die DNA-Konzentration in ng und den Reinheitsgrad der Proben. Hierfür wurden 1,5µl der DNA-Lösung auf die Messstelle appliziert und das System gestartet.

2.1.4 Polymerasekettenreaktion

In diesem Versuchsaufbau haben wir den von Young et al. 2004 veröffentlichten PCR-Ansatz nebst Programm verwendet [89]. Modifiziert wurden die eingesetzten Primer, die Annealingtemperatur und die Menge der eingesetzten DNA. Die PCR wurde im Rahmen der Praxisarbeit von T. Hiller 2009 optimiert [90].

Die PCR ist eine Methode der in vitro Amplifikation von kurzen, spezifischen DNA Abschnitten. Die Bezeichnung „Kettenreaktion" beschreibt den Umstand, dass das Endprodukt eines PCR Zyklus als Ausgangsprodukt des nachfolgenden Zyklus dient. So wird mit jedem Zyklusschritt ein exponentieller Anstieg der DNA-Konzentration erreicht.

Die PCR Ansätze von je 20µl Endvolumen setzen sich aus dem in Tabelle 1 angegebenen Reaktionsgemisch zusammen.

***Tabelle 1*: Modifizierte Zusammensetzung des PCR-Ansatzes nach Young et al. [91].**

PCR Komponeneten	Volumen [µl]	Endkonzentration
DNA Template (25ng)	Gemäß Endkonzentration	25ng
Ammoniumsulfat (99,9%)	0,44	16,6mM
Tris-HCl (1M)	1,34	67mM
BSA (1%)	0,17	85µg/ml
DMSO (99,5%	2,01	10%
dNTP Mix 2 mM	7,5	0,75mM
Humaner VEGF vorwärts Primer (10µM)	0,2	0,5µM
Humaner VEGF rückwärts Primer (10µM)	0,2	0,5µM
DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,1	0,5U
ddH_2O	to 20µl	-

Ein vorzeitiger Reaktionsstart wurde durch das kontinuierliche Kühlen des Reaktionsgemisches auf Eis und durch die zuletzt erfolgte Zugabe der thermosensiblen DreamTaq DNA-Polymerase vermieden.

Im Eppendorf Mastercycler erfolgte die DNA-Amplifikation in drei Schritten mit 32 Wiederholungszyklen des zweiten Schrittes. Der erste Schritt stellt die Denaturierung dar. Mit der Erhitzung des PCR-Ansatzes für 3 Minuten auf 94°C erfolgte über das Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen in der DNA-Doppelhelix die Trennung der DNA in ihre beiden Einzelstränge. Daraufhin schlossen sich die regulären Wiederholungszylen des zweiten Schrittes an. Dieser setzte sich aus drei Unterschritten zusammen: Nach einer weiteren kurzen Denaturierung folgte das Annealing bei 60°C. Diese Temperatursenkung erlaubt dem Vorwärts- und Rückwärtsprimer die Anlagerung an komplementäre Sequenzen der Template-DNA. Somit ist der zu amplifizierende DNA-Bereich markiert. Im darauf folgenden Elongationsschritt füllt die DNA-Polymerase beginnend am 3`-Ende des angelagerten Primers, die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf.

Den letzten Schritt der PCR stellt die terminale Elongation dar (Tabelle 2).

***Tabelle 2*: Das PCR-Programm.**

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklusanzahl
1. Denaturierung	94	3	1
2. Denaturierung Annealing Elongation	94 60 72	1 1 1	32
3. Elongation	72	5	1

2.1.5 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus und Gelelektrophorese

RFLP ist eine Methode zum Nachweis von Polymorphismen. Das Prinzip besteht darin, dass mit Hilfe von Restriktionsenzymen eine spezifische DNA-Sequenz von vier bis acht Nukleotiden erkannt und geschnitten wird. Die Schnittstellen werden von Primern markiert. So entstehen beim Polymorphismus von der Norm abweichende DNA-Fragmentlängen, die mittels Gelelektrophosese ermittelt werden können.

In unserem Versuch wird das PCR-Produkt mit dem Restriktionsenzym Faq1 (BsmF1) entsprechend des in Tabelle 4 dargestellten Programms verdaut (Tabellen 3 und 4). Bei Vorliegen des VEGF 405 G>C Polymorphismus entstehen zwei DNS-Fragmente unterschiedlicher Länge.

***Tabelle 3*: Zusammensetzung des Verdau-Ansatzes.**

Verdau-Komponeneten	Volumen [µl]
PCR Produkt (245bp)	10
ddH_2O	18
10x Buffer Tango	2
50x SAM	0,6
Faq1 (BsmF1)	1

***Tabelle 4*: Programm des Verdaus.**

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Abschnitt des Verdaus
37	960	Verdau
65	20	Enzyminaktivierung

Anschließend erfolgt nach Lagerung des Ansatzes bei 4°C die Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese. Das hierzu genutzte 3%ige Agarosegel (3g Agarose/100ml 1xTAE Puffer) enthält 3µl 1%iges Ethidiumbromid, das mit der DNA interagiert und durch seine Fluoreszenzeigenschaften den DNA Banden Nachweis unter UV-Licht ermöglicht[92]. In der Elektrophoresekammer werden in die im 1xTEA Puffer schwimmenden Geltaschen, je 10µl der zu untersuchenden PCR-Produkte pipettiert. Desweiteren werden 5µl des Molekulargewichts-markers pro Tasche aufgetragen. Nach 1-2 Stunden Elektrophorese bei 80mV werden die DNA-Banden unter UV-Licht visualisiert und fotographiert.

Das VEGF-Gen existiert auf beiden Allelen des diploiden Chromosomensatzes, sodass beim Polymorphismus beider Allele eine homozygote Mutation vorliegt. So resultiert beim 245 Basenpaar (bp) großen PCR-Produkt ein 175 bp und ein 70 bp großes Fragment. Ist ein Allel betroffen, so liegt eine heterozygote Mutation mit drei Fragmenten aus 245 bp, 175 bp und 70 bp vor.

2.1.6 Sequenzierung

Zur Sicherstellung des korrekten Nachweises des VEGF 405 G>C Polymorphismus wurden exemplarisch drei unterschiedliche Fragmentmuster nach elektrophoretischer Auftrennung sequenziert. Hierzu wurde nach der PCR das Produkt auf eine MSB Spin PCRapace-Säule pipettiert. Dies diente der Entfernung von Primer, Nukleotiden und der Polymerase. Das doppelsträngige DNA-Fragment bleibt an die Säule gebunden und wird durch steriles deionisiertes Wasser von der Säule eluiert. Anschließend wird die DNA-Konzentration des aufgereinigten PCR-Produktes am Nano Drop gemessen und nach den Anfordeungen der Firma AGOWA vorbereitet.

Die Sequenzierung wurde nach Sanger durchgeführt [93]. Hierfür werden vier Reaktionsansätze, die eine Teilprobe der zu sequenzierenden DNA enthalten mit dem entsprechenden Primer, Nukleotiden, einer DNA-Polymerase und jeweils einem der vier möglichen 2`3` Didesoxyanaloge versetzt. So entstehen in jedem Ansatz entsprechend des 2`3` Didesoxyanalogons Fragmente unterschiedlicher Größe. Die vermischten Ansätze werden nun in zylindrischen Gelen entsprechend der Fragmentgröße anhand der unterschiedlichen Durchlaufgeschwindigkeit aufgetrennt. Jedem Fragment kann anhand der jeweiligen Fluoreszenz eine Base zugeordnet werden. So ermittelt man Schritt für Schritt die gesamte DNA-Basensequenz.

2.1.7 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Daten bedienten wir uns der Programme SPSS, Version 22 (SPSS inc., Chicago, Illionois, USA) und Microsoft® Exel 2010. Die Datenanalyse erfolgte nach der empirischen Statistik. Die Auswertung von zwei unabhängigen quantitativen Variablen erhielten wir mit dem Mann-Whitney-U-Test und von zwei unabhängigen qualitativen Variablen mit dem Chi-Quadrat-Test. Bei einer Fallzahl unter 5 kam der Fisher-Exact-Test zum Einsatz. Zur Ergebnisdarstellung quantitativer Variablen berechneten wir das Minimum, Maximum und Median. Qualitative Merkmale wurden als absolute und prozentuale Werte veranschaulicht. Die Auswertung des Therapieerfolges erfolgte nach der bivarianten Risikoanalyse. Mit Hilfe des gemeinsamen Quotenverhältnisses nach Mantel-Haenszel berechneten wir die Odds-Ratio und das 95% Konfidenzintervall.

Bei p-Werten unter 0,05 lag statistische Signifikanz vor.

Der Statistiker Herr Boris Metze unterstützte uns bei der statistischen Auswertung der Daten.

2.2 Materialien

2.2.1 Chemikalien

DNA Isolierung und PCI Extraktion

Puffer A	0,1mol/L NaCl / 0,05mol/L Tris / 5mmol/L EDTA / pH 7,5
Proteinkinase K	20mg/ml
SDS	Fermentas, York, UK
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenolchloroformisoamylalkohol	Fermentas, York, UK
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Fermentas, York, UK
Isopropanolol	Roth, Karlsruhe
Glykogen	Fermentas, York, UK
TE	10mmol/L Tris / HCL / pH 7,4 / 1mmol/L EDTA / pH 8

PCR

Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
dNTP Mix	Fermentas, York, UK
Human VEGF vorwärts-Primer: GACGGCTTGGGGAGATTGCT	50 pmol/l, Bio Tez, Berlin
Human VEGF rückwärts-Primer: TCAGCTGCGGGATCCCAAGG	50 pmol/l, Bio Tez, Berlin
DreamTaq DNA-Polymerase	Fermentas, York, UK
PCR-H_2O	Fermentas, York, UK

Verdau

10x Buffer Tango	Fermentas, York, UK
50x SAM	Fermentas, York, UK
Faq1 (BsmFI)	Fermentas, York, UK

Gelelektrophorese

Molekulargewichtsmarker-O´GeneRuler	
50 bp DNA Ladder, ready-to-use	Fermentas, York, UK
Agarose	Fermentas, York, UK
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
50x TAE Electrophoresis Buffer	Fermentas, York, UK
1x TAE Electrophorese Puffer	Fermentas, York, UK

2.2.2 Verbrauchsmaterialien

Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Pipetten und Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Falconröhrchen	Falcon BD, Heidelberg

2.2.3 Geräte

Mastercycler ep gradient S	
PTC-100 Programable Thermical	Eppendorf, Hamburg
Controller	MJ Research Inc., Waltham, USA
Nano Drop	peqlab, Erlangen
Biofuge fresco-Zentrifuge	Heraeus, Osterode
Centrifuge 5410	Eppendorf, Hamburg
Megafuge 1,0R	Heraeus, Osterode
Minishaker MSI	IKA, Willington, USA
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Schüttler MTS2	IKA, Willington, USA
PP3000-Stromversorger	Biometra, Goettingen
EPS 2A200-Stromversorger	Hoefer, Holliston, USA
Wide Mini-Sub Cell GT	BioRad, München
Video Graphic Printer UP.890 CE	Sony, Köln
Gene Flash-UV Gerät	Syngene, Cambridge, UK

3 ERGEBNISSE

3.1 Optimierte Versuchsbedingungen

Die Versuchsbedingungen dieser Arbeit wurden im Rahmen der Praxisarbeit „Etablierung und Optimierung von PCR und RFLP zum Nachweis des VEGF 405 G>C Polymorphismus" von Thomas Hiller etabliert und optimiert [90]. Seine Versuchsergebnisse zeigten, dass für den Nachweis des VEGF 405 G>C Polymorphismus mittels PCR und RFLP eine Modifikation der Versuchsansätze nach Young et al. erforderlich ist [91]. Es kamen andere Primer, die höhere Annealingtemperatur von 60°C anstatt von 55°C und die niedrigere Template DNA- Konzentration zum Einsatz. Unter den optimierten Versuchsbedingungen erhielten wir aussagekräftigere Ergebnisse zur Auswertung des Polymorphismus.

3.2 Gelektrophoretische Auftrennung der Patientenproben

Abbildung 6 zeigt unsere unter UV-Licht fotographierten Ergebnisse der gelelektrophoretischen Auftrennung nach dem Prinzip des RFLP der verschiedenen PCR-Produkte. Hierbei enthält die erste Tasche des 3%igen Agarosegels die 50 bp DNA-Ladder zur Abschätzung der DNA-Größen der Kontrollproben. Die im Anschluss sequenzierten Kontrollproben wurden in jedem Elektrophoresegang als Kontrollproben mit eingesetzt. Dies ermöglichte uns die sichere Zuordnung der VEGF-Polymorphismus Formen in Wildtyp, heterozygot mutiert und homozygot mutiert.

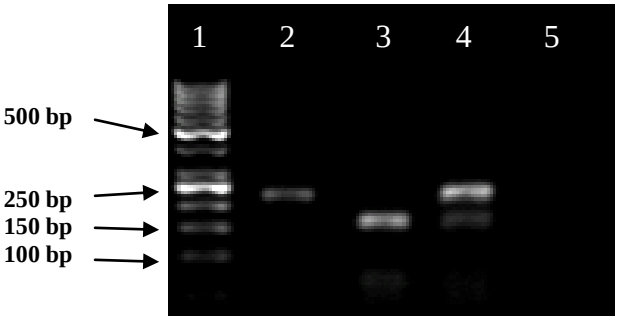

***Abbildung 6*: Das Ergebnis der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Kontrollproben.**

Geltasche 1= 50 bp DNA-Ladder, 2= Wildtyp, 3= homozygot mutiert, 4= heterozygot mutiert, 5= Negativkontrolle.

3.3 Sequenzierung der Kontrollproben

Die bei jedem Elektrophoresegang mitlaufenden Kontrollproben wurden vorher sequenziert. Mittels Sequenzierung wurde die Nukleotidabfolge der DNA-Probe bestimmt. Aus der Basenreihenfolge erfolgte die Einteilung in Wildtyp, homozygot mutiert oder heterozygot mutiert. Die Abbildungen 5-7 zeigen die Sequenzierungsergebnisse der jeweiligen Kontrollproben. Hierbei ist die für den VEGF Polymorphismus relevante Base mit der roten Pfeilmarkierung hervorgehoben. Das erhöhte Vorkommen einer Base markiert den höchsten Peak im Sequenzierungsdiagramm. Zur besseren Zuordnung sind die Basendiagramme farblich gekennzeichnet. Hierbei stellt schwarz Guanin, blau Cytosin, grün Adenin und rot Thymin dar. Ausschläge, die nicht das Hintergrundrauschen überschreiten, sind vernachlässigbar.

Abbildung 7 stellt das Sequenzierungsergebnis einer nicht mutierten Probe dar. Der Wildtyp ist durch das ausschließliche Vorkommen von Cytosinbasen charakterisiert. Abbildung 8 ist durch einen Guanin-Peak gefolgt von einem Cytosinpeak gekennzeichnet. Diese Konstellation ist beweisend für das Vorliegen einer heterozygot mutierten Probe. In Abbildung 9 finden sich im markierten Sequenzbereich ausschließlich Guaninbasen.

Diese Verteilung ist typisch für eine homozygot mutierte Probe.

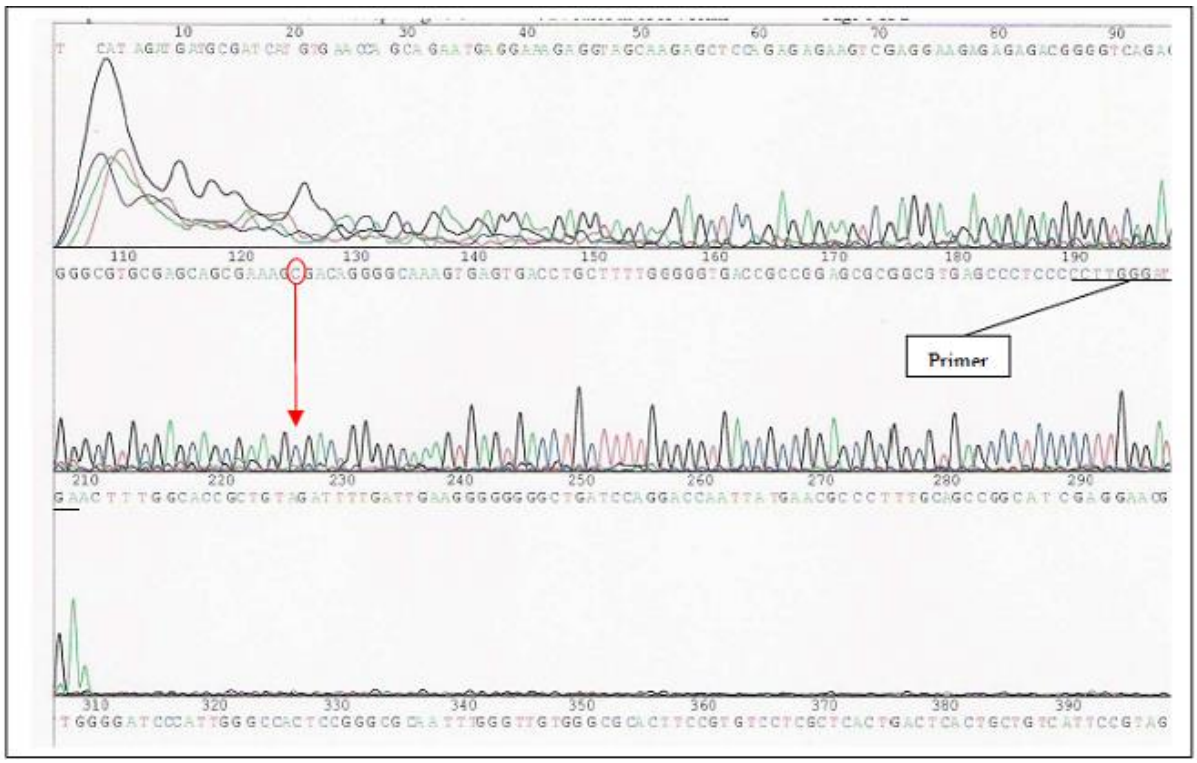

Abbildung 7: **Das Sequenzierungsdiagramm einer nicht mutierten Probe [94].**

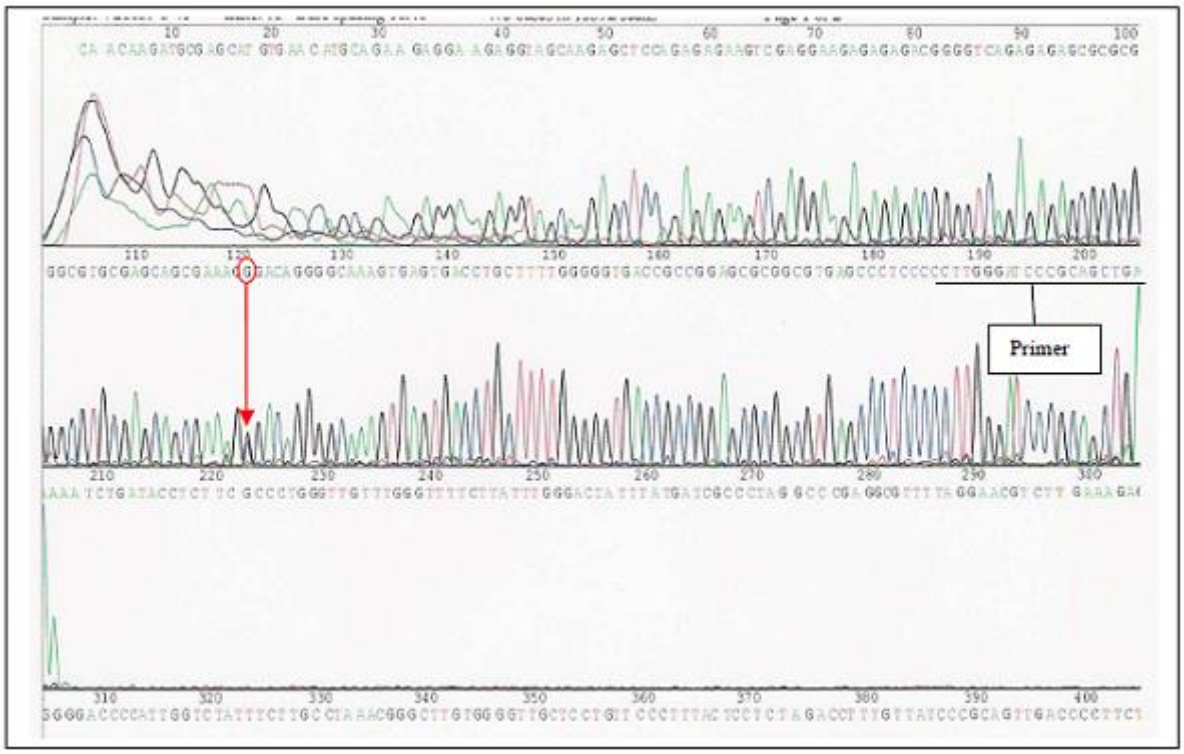

***Abbildung 8*: Das Sequenzierungsdiagramm einer heterozygot mutierten Probe [94].**

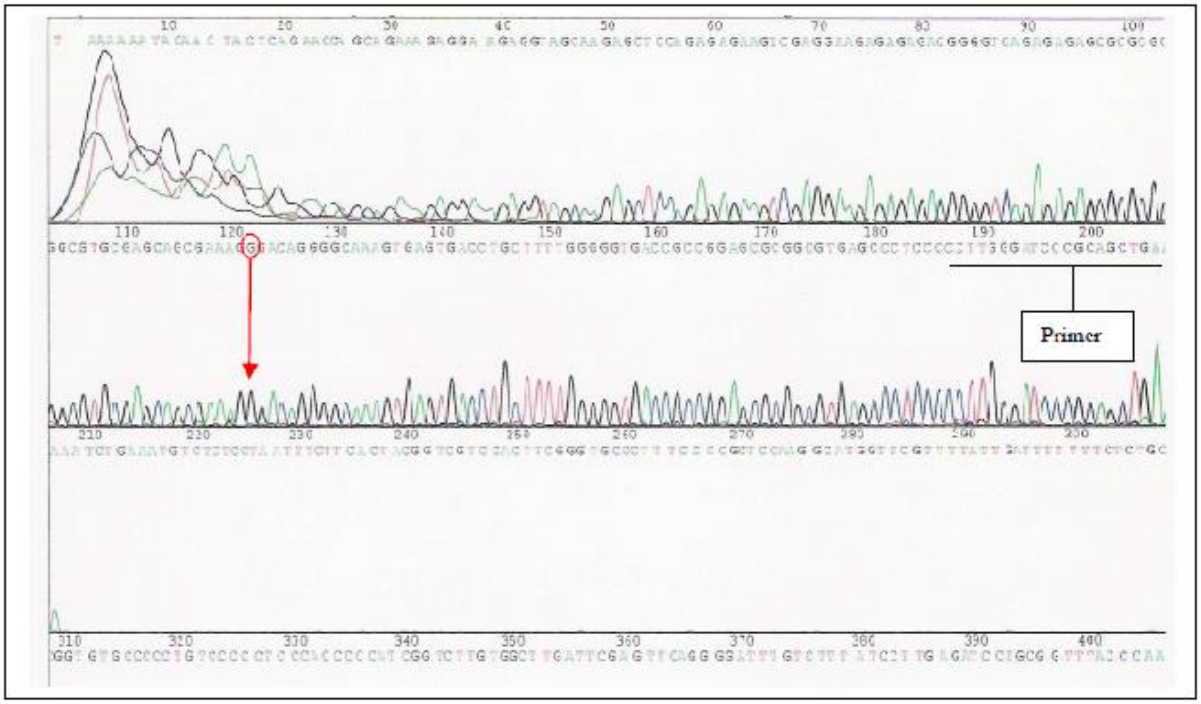

***Abbildung 9*: Das Sequenzierungsdiagramm einer homozygot mutierten Probe [94].**

3.4 Klinische Daten der Patientenpopulation

Die Zusammensetzung unserer Studienpopulation ist der Abbildung 4 im Methodenteil dieser Arbeit zu entnehmen. Tabelle 5 veranschaulicht die ermittelten Patientendaten der untersuchten Studienpopulation von 1053 sehr unreifen Frühgeborenen. Nahezu die Hälfte des Gesamtkollektivs weist einen PDA auf. Hiervon erhielt im Verlauf ungefähr die Hälfte der Kinder aufgrund eines hsPDA eine medikamentöse Therapie mit COX-Hemmern. Nach Versagen der medikamentösen Intervention wurde bei ca. 1/5 der Kinder eine chirurgische Ductusligatur durchgeführt. In der Gesamtpopulation sowie in den beiden Untergruppen mit und ohne PDA sind nahezu ein Drittel der Kinder Mehrlinge. VLBW-Kinder mit PDA sind im Durchschnitt bei Geburt 3 Wochen unreifer (Median GA 26+7 SSW), haben ein signifikant geringeres Geburtsgewicht (Median 920g) und sind mit einem medianen Clinical Risk Index for Babies (CRIB)-Score von 5, als Ausdruck des perinatalen Mortalitätsrisikos, insgesamt kränker als die VLBW-Kinder ohne PDA. Zudem tritt ein PDA signifikant häufiger bei männlichen Frühgeborenen auf. Diese Beobachtungen haben Auswirkungen auf die höhere Mortalitätsrate von 4,2% unter den Kindern mit PDA. Die Kinder mit PDA haben pränatal häufiger eine vollständige Lungenreifeinduktion mit Celestan erhalten und dennoch postnatal häufiger eine Surfanctant-Therapie aufgrund eines RDS gebraucht. Im Verlauf wurde unter den PDA Kindern das Vorkommen einer BPD häufiger beobachtet. Außerdem sind VLBW-Kinder mit PDA signifikant häufiger von weiteren typischen Frühgeborenenerkrankungen betroffen: 16,2% der Kinder haben eine ROP und fünfmal häufiger eine IVH. Auch NEC und PVL betreffen die VLBW-Kinder ohne PDA seltener.

Tabelle 5: **Klinische Patientendaten der Gesamtpopulation und der Gruppen mit und ohne PDA.**

	Gesamtpopulation n=1053	**mit PDA n=520**	**ohne PDA n=533**
GA (SSW)	**28,3** (22,9/37,4)	**26,7** (22,9/34,7)*	**30** (24,0/37,4)
GG (g)	**1070** (430/1495)	**920** (430/1095)*	**1191** (495/1495)
Geschlecht, n (%) weiblich männlich	**546** (51,9) **507** (48,1)	**249** (45,6) **271** (53,4)*	**297** (54,4) **236** (46,5)
Mehrlinge, n (%)	**353** (33,5)	**178** (34,2)	**172** (32,3)
CRIB-Score	**2** (1/6)	**5** (2/8)	**1** (1/3)
Vollständige Lungenreife, n (%)	**500** (47,5)	**277** (53,3)	**223** (41,8)
Surfactant-Gabe, n (%)	**369** (35)	**285** (54,8)*	**84** (15,7)
RDS, n (%)	**505** (47,9)	**336** (64,6)*	**169** (31,7)
IVH, n (%)	**133** (12,6)	**107** (20,5)*	**26** (4,9)
ROP ≥II°, n (%)	**96** (9,1)	**84** (16,2)*	**12** (2,3)
BPD gesamt, n (%)	**253** (24)	**220** (42,3)*	**33** (6,2)
NEC, n (%)	**75** (7,1)	**43** (8,2)*	**32** (6,0)
PVL, n (%)	**32** (3)	**25** (4,8)*	**7** (1,3)
Ligatur, n (%)	**125** (11,9)	**125** (24)	**0**
Verstorben, n (%)	**34** (3,2)	**22** (4,2)	**12** (2,2)

Die Ergebnisse sind als Absolutwerte (%) oder Median (min., max.) dargestellt.

* = statistische Signifikanz bei $p < 0,05$ für den Vergleich zwischen den Gruppen mit und ohne PDA.

3.5 Die Allelfrequenz des VEGF-Polymorphismus in der Studienpopulation

Der VEGF 405 G>C Polymorphismus zeigt im untersuchten Gesammtkollektiv eine Allelfrequenz von 77,7%. Hiervon entfallen 42,3% auf homozygot mutierte Patienten. Betrachtet man das Vorkommen des VEGF-Polymorphismus in den Gruppen von Kindern mit und ohne PDA, so zeigt sich aus diesem Vergleich kein signifikanter Unterschied. Detaillierte Angaben sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: **Verteilung des VEGF-Polymorphismus in der Gesamtpopulation und in den Gruppen mit und ohne PDA.**

VEGF Polymorphismus	Auftreten		
	Gesamtpopulation	**mit PDA**	**ohne PDA**
WT, n (%)	**182** (22,3)	**92** (22,2)	**90** (22,5)
HE, n (%)	**288** (35, 4)	**154** (37,2)	**134** (33,5)
HO, n (%)	**344** (42,3)	**168** (40,6)	**176** (44)

Alle Werte sind Absolutwerte (%).

3.6 PDA-Intervention und Therapieerfolg

Anhand von echokardiographischen und klinischen Parametern wurde die Indikation zur PDA-Intervention gestellt. Kriterien zur Beurteilung der hämodynamischen Relevanz waren ein Ductusdurchmesser ≥1,5mm, eine LA:Ao Ratio ≥1,4, ein RI ≥0,85 und die Beatmungspflichtigkeit. Ein hsPDA der untersuchten VLBW-Kinder wurde, sofern keine Kontraindikationen vorlagen, zunächst mit einem der beiden COX-Hemmern therapiert. Hierbei kamen, wie in Abbildung 10 dargestellt, Indometacin und Ibuprofen nahezu gleichermaßen zum Einsatz. Bei 10% der VLBW-Kinder mit hsPDA lagen Kontraindikationen gegen den Einsatz von COX-Hemmern vor, sodass man sich für eine primäre Ligatur entschied (Abbildung 10). Am Charité Campus Virchow-Klinikum kam bis 2004 ausschließlich Indometacin zum Einsatz. Mit den Erkenntnissen zur Beeinträchtigung der Nierenfunktion und einer möglichen Einschränkung des cerebralen Blutflusses während der Indometacininfusion wurde das Therapieregime auf Ibuprofen umgestellt.

Die Indometacintherapie erfolgte über einen Zeitraum von 5 Tagen. Begonnen wurde mit 3 Gaben je einer Dosis von 0,2mg/kg/KG im Abstand von 12 Stunden, gefolgt von einer Erhaltungstherapie über 3 Tage mit jeweils 0,1 mg/kg/KG im Abstand von 24 Stunden.

Die Ibuprofentherapie erfolgte über 3 Tage mit dem Dosierungsregime von 10-5-5 mg/kg/KG im 24-stündigen Zeitabstand. Nach erfolgloser der Indometacintherapie erhielten 39% der Kinder sekundär eine Ductusligatur. Die Ligaturnotwendigkeit war nach Ibuprofentherapie mit 32% etwas niedriger. Insgesamt betrug die Notwendigkeit zur sekundären Ligatur nach erfolgloser COX-Hemmertherapie 35,8%.

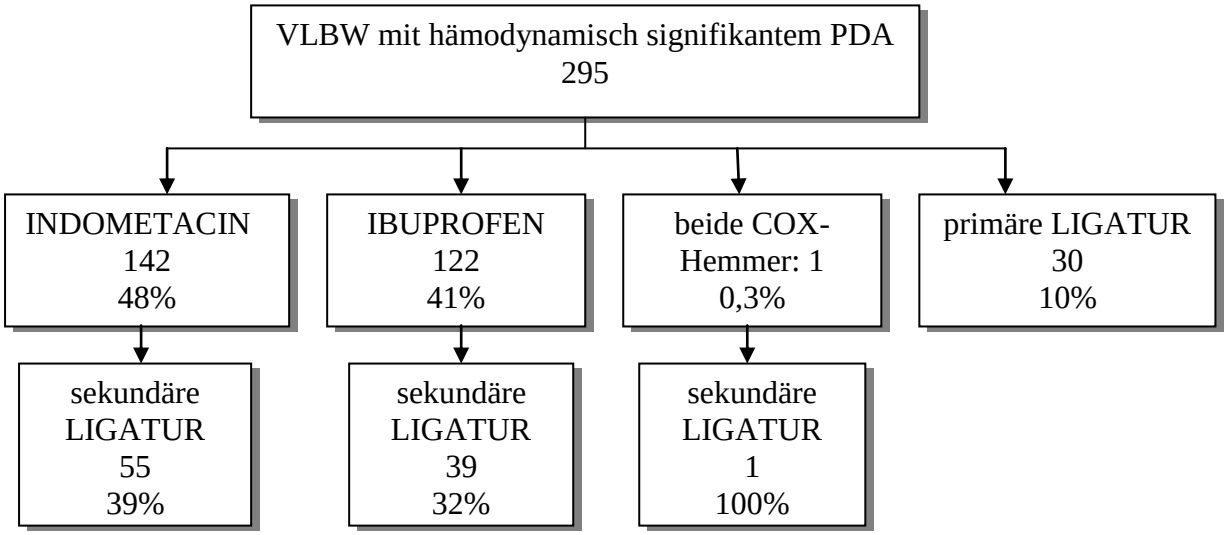

Abbildung 10: **Übersicht zur PDA-Intervention.**

Die Ergebnisse sind als absolute Zahlen und Prozent dargestellt.

Die Prozentzahlen beziehen sich auf die Fallzahl des darüber liegenden Kästchens.

3.6.1 Der Zusammenhang des VEGF-Polymorphismus zum COX-Hemmer-Therapieerfolg

Eine Hauptfragestellung dieser Arbeit war es, die mögliche Assoziation des VEGF 405 G>C Polymorphismus mit dem Therapieerfolg der COX-Hemmer-Therapie zu untersuchen. Insgesamt sprachen 63,8% der VLBW-Kinder, die aufgrund eines hsPDA einen COX-Hemmer erhielten, erfolgreich auf die Therapie an. Hierbei war der Therapieerfolg definiert als kompletter Ductusverschluss oder eine Ductusverkleinerung bis hin zur hämodynamischen Irrelevanz. Tabelle 7 veranschaulicht die Erfolgsrate der COX-Hemmer-Behandlung und zeigt die Relevanz des Polymorphismus innerhalb der Responder- und Nonrespondergruppen. Hier ist zu erwähnen, dass in der Indometacingruppe bei 28 Kindern und in der Ibuprofengruppe bei 17 Kindern der Polymorphismusnachweis missglückte. In der Indometacingruppe war die Rate der Responder mit 66,7% etwas höher als in der Ibuprofengruppe mit 60,6%. Betrachtet man die mit Indometacin therapierten VLBW-Kinder,

so besteht in der Polymorphismusverteilung zwischen der Responder- und Non-Respondergruppe kein signifikanter Unterschied.

Tabelle 7: **Polymorphismus-Verteilung unter den Respondern und Non-Respondern.**

	Indometacintherapie n=142			**Ibuprofentherapie** n=122		
	Responder	Reopening	Non-Responder	Responder	Reopening	Non-Responder
WT	16 (21,1)	3 (15,8)	6 (15,8)	13 (20,6)	2 (14,3)	8 (20,5)
HE	30 (39,5)	7 (36,8)	17 (44,7)	26 (41,3)	5 (35,7)	10 (25,6)
HO	30 (39,5)	9 (47,4)	15 (39,5)	24 (38,1)	7 (50,0)	21 (53,9)

Die Ergebnisse sind als absolute Zahlen (Prozent) dargestellt.

Dagegen sind in der Ibuprofengruppe 54% der Non-Responder Träger des homozygot mutierten VEGF Polymorphismus (Abbildung 11). Unter den initial mit Indometacin erfolgreich therapierten VLBW-Kindern kam es bei 28% zu einer Wiederöffnung des Ductus. Die Rezidivrate unter Ibuprofen war mit 18% geringer als unter Indometacin. In beiden COX-Hemmer-Therapiegruppen waren nahezu die Hälfte der Kinder mit einem PDA Rezidiv Träger des homozygot mutierten VEGF-Polymorphismus (Abbildung 11).

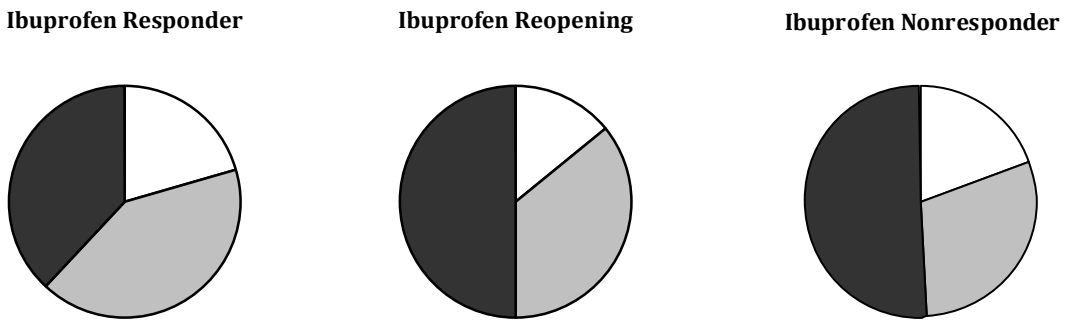

Abbildung 11: **Verteilung des Polymorphismus und Ibuprofentherapieerfolg.**

Weiß= Wildyp; hellgrau= heterozygot; dunkelgrau= homozygot.

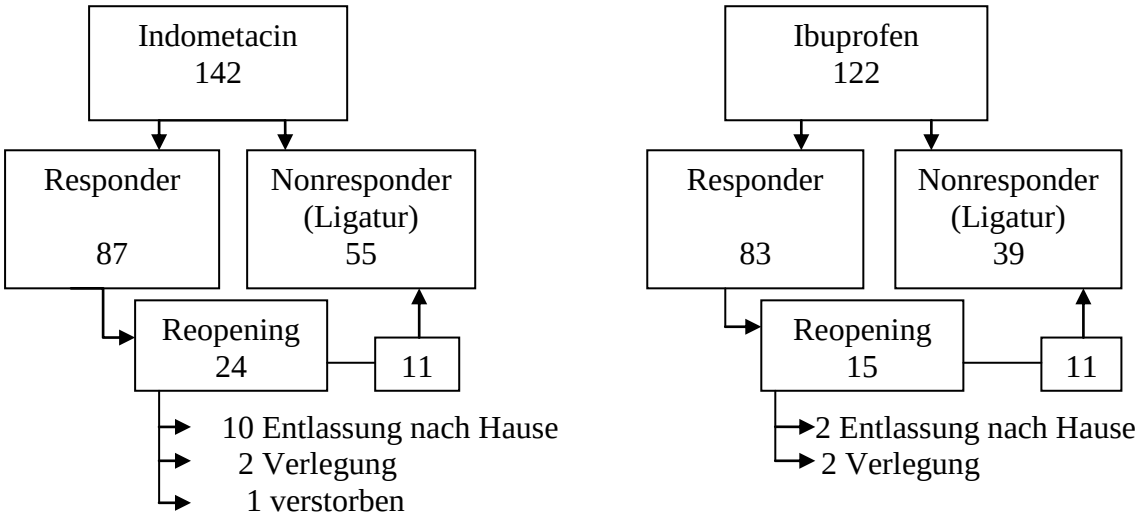

***Abbildung 12*: Übersicht zum COX-Hemmer-Therapieerfolg.**

3.6.2 Vergleich der klinischen Patientendaten beider COX-Hemmer-Gruppen

Die Patientendaten der VLBW-Kinder, die Indometacin oder Ibuprofen zum Ductusverschluss erhalten haben, gleichen sich nahezu hinsichtlich des Gestationsalters, des Geburtsgewichts, der Geschlechterverteilung, der Mehrlingshäufigkeit und des CRIB-Scores. Die Mortalitätsrate beträgt in beiden Gruppen ca. 7%. Die Ligaturrate ist in der Indometacingruppe um 5% höher als in der Ibuprofengruppe. Durchschnittlich waren die Kinder der Indometacingruppe nahezu gleich häufig von einer ROP und einer BPD betroffen wie die Ibuprofengruppe. Dagegen wurde eine NEC in der Ibuprofengruppe seltener beobachtet. Da es insgesamt zwischen beiden COX-Hemmer-Gruppen keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der klinischen Parameter gab, wurden nachfolgend die Reponder- und Non-Responder beider Gruppen gemeinsam betrachtet. Allerdings unterschieden sich beide COX-Hemmer-Gruppen in Bezug auf die durchschnittlich erforderliche Zyklenanzahl für einen Verschluss des Ductus.

So kann man aus der Tabelle 8 entnehmen, dass 76% der VLBW-Kinder mit einem Zyklus Indometacin auskamen. VLBW-Kinder, die Ibuprofen zum PDA-Verschluss erhielten, benötigten zu 45% einen weiteren COX-Hemmer Zyklus. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant.

Tabelle 8: **Die klinischen Parameter der Indometacin- und Ibuprofengruppe.**

Klinische Daten	**Indometacin** n=142	**Ibuprofen** n=123
GA (SSW)	26 (25/27,3)	26,3 (23/34,7)
GG (g)	797 (680/945)	818 (700/1035)
Geschlecht, n (%) weiblich männlich	71 (50) 71 (50)	50 (40,7) 73 (59,3)
Mehrlinge, n (%)	52 (36,6)	41 (33,3)
CRIB-Score	6 (0/17)	5 (0/15)
Vollständige Lungenreife, n (%)	97 (72,4)	78 (65)
Surfactant-Gabe, n (%)	112 (78,9)	100 (81,3)
COX-Hemmer-Zyklus: 1 ≥2	 107 (75,9)* 34 (24,1)*	 66 (55) 54 (45)
RDS, n (%)	116 (81,2)	109 (88,6)
IVH, n (%)	37 (26)	43 (35)
ROP ≥II°, n (%)	40 (28,2)	36 (29,2)
BPD gesamt, n (%)	100 (70,4)	86 (70)
NEC, n (%)	19 (13,4)	13 (10,6)
PVL, n (%)	7 (4,9)	5 (4,0)
Ligatur, n (%)	54 (38)	41 (33,3)
Verstorben, n (%)	10 (7)	8 (6,5)

Die Ergebnisse sind als Absolutwerte (%) oder Median (min., max.) dargestellt.

* = statistische Signifikanz bei $p < 0,05$ für den Vergleich zwischen den COX-Hemmern.

3.6.3 Vergleich der klinischen Parameter von Respondern und Non-Repondern der COX-Hemmer-Therapie

Die Betrachtung der Responder und Nonresponder der COX-Hemmer-Therapie zeigt, dass die Non-Responder unreifer und leichter sind als die Responder waren. Non-Responder benötigten trotz vollständiger Lungenreifeinduktion häufiger eine Surfactanttherapie. Die Non-Responder waren initial kränker (höherer CRIB-Score) und im Verlauf auch häufiger von den sogennanten „Dreibuchstabenerkrankungen“ Frühgeborener betroffen. Insbesondere die Erkrankung an einer höhergradigen ROP und BPD kam signifikant häufiger unter den

Non-Respondern vor. Mehr als die Hälfte der Responder ist deutscher Abstammung. Unter den Non-Respondern ist der Anteil von Kindern deutscher Abstammung mit 72% höher.

In dieser Gruppe ist nahezu die Hälfte der Kinder Allelträger des homozygot mutierten VEGF-Gens. Allerdings gibt es bezüglich der Verteilung des VEGF-Polymorphismus keine signifikanten Unterschiede zwischen Respondern und Non-Respondern.

Tabelle 9: **Die klinischen Parameter der Responder und Non-Responder der COX-Hemmer-Therapie.**

Klinische Daten	**Responder** n=170	**Non-Responder** n=94
GA (SSW)	**26,5** (23/34,7)	**25,6** (23,4/30,7)
GG (g)	**894** (442/1490)	**778** (465/1290)
Geschlecht, n (%) weiblich männlich	 **75** (44,1) **95** (55,9)	 **46** (49,5) **47** (50,5)
Mehrlinge, n (%)	**60** (35,3)	**32** (34,4)
CRIB-Score	**6** (4; 9)	**7** (4; 7)
Ethnizität -Deutsch (%) -Andere (%)	 **95** (55,2) **77** (44,8)	 **57** (72,2) **22** (27,9)
Vollständige Lungenreife, n (%)	**108** (62,8)	**66** (83,5)
Surfactant-Gabe, n (%)	**134** (77,9)	**77** (97,5)
RDS, n (%)	**145** (84,3)	**79** (100)
IVH, n (%)	**50** (29,1)	**29** (36,7)
ROP ≥II°, n (%)	**42** (24,4)*	**34** (43,0)
BPD gesamt, n (%)	**108** (62,8)*	**79** (100)
NEC, n (%)	**21** (12,2)	**11** (13,9)
PVL, n (%)	**8** (4,7)	**4** (5,1)
Verstorben, n (%)	**11** (6,4)	**6** (7,6)
VEGF-Polymorphismus° - WT - HE - HO	 **29** (20,9) **56** (40,3) **54** (38,9)	 **14** (22,2) **19** (30,2) **30** (47,6)

Die Ergebnisse sind als Absolutwerte (%) oder Median (min., max.) dargestellt.

* = statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen. ° Die Absolutwerte (%) beziehen sich auf die Auswertung von 139 Respondern und 63 Non-Respondern.

3.6.4 Der Zusammenhang des Polymorphismus mit dem COX-Hemmer-Zyklusbedarf

Die Verteilung des VEGF-Polymorphismus innerhalb der Gruppen von VLBW-Kindern, die eine Therapie mit Indometacin oder Ibuprofen zum PDA-Verschluss erhalten haben, ist in der Tabelle 7 aufgeführt (siehe Punkt 3.6.1). Betrachtet man den COX-Hemmer Zyklusbedarf der beiden COX-Hemmer-Gruppen und das Vorhandensein des Polymorphismus, so besteht kein signifkanter Unterschied (Tabelle 10).

Tabelle 10: **Darstellung des COX-Hemmer Zyklusbedarfs und der Verteilung des VEGF-Polymorphismus.**

COX-Hemmer-Zyklen	**Indometacin** (n=115)			**Ibuprofen** (n=102)		
	WT	**HO**	**HE**	**WT**	**HO**	**HE**
1 Zyklus	20 (23)	34 (39,1)	33 (37,9)	10 (18,9)	20 (37,7)	23 (43,4)
≥ 2 Zyklen	2 (7,4)	13 (46,4)	13 (46,4)	10 (20,4)	17 (34,7)	22 (44,9)

Die Ergebnisse sind als absolute Zahlen (%) dargestellt. Aufgrund von fehlenden Daten hinsichtlich der Polymorphismusauswertung ist die Fallzahl für Indometacin um 27 Patienten und für Ibuprofen um 21 Patienten kleiner als die der korrespondierenden klinischen Gruppengröße.

Die mit Indometacin therapierten Kinder kamen häufiger mit einem Therpiezyklus aus, als die mit Ibuprofen behandelten Kinder. VLBW-Kinder, die mehr als einen Zyklus Indometacin für den Ductusverschluss benötigten, waren zu 93% Allelträger des VEGF-Polymorphismus (Abbildung 13).

Abbildung 13: **Betrachung des Polymorphismus hinsichtlich des Indometacin-Zyklusbedarfs.** Weiß=Wildtyp; hellgrau= heterozygot; dunkelgrau=homozygot.

3.6.5 Der Zusammenhang des Polymorphismus mit der Ligaturnotwendigkeit

Untersuchungen bezüglich des Ligaturzeitpunktes der primär oder sekundär ligierten Kinder und der Verteilung des VEGF-Polymorphismus haben keine signifikanten Unterschiede gezeigt. Im Median wurde ein primär als ligaturbedürftig eingestufter hsPDA zwischen dem 15. und 17. Lebenstag ligiert. Bei 95 Kindern wurde nach der frustranen COX-Hemmer-Therapie eine sekundäre Ductusligatur nötig. In der Gruppe der sekundär ligierten Kinder beobachteten wir einen im Durchschnitt bei heterozygot und homozygot mutierten Allelträgern (Median HE 19, HO 17 Tage) früheren Interventionszeitpunkt als dies beim Wildtyp der Fall war (Median 24 Tage). Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

Betrachtet man die Polymorphismus-Verteilung unter allen VLBW-Kindern, deren PDA primär oder sekundär ligiert wurde, so besteht kein signifikanter Unterschied.

***Tabelle 11*: Verteilung des VEGF-Polymorphismus innerhalb der Gruppen mit primärer oder sekundärer Ligatur.**

	Ligatur	
	primär (n=19)	sekundär (n=83)
WT	**3** (15,8)	**12** (14,5)
HE	**9** (47,4)	**28** (33,7)
HO	**7** (36,8)	**43** (51,8)

Die Ergebnisse sind als absolute Zahlen (%) dargestellt. Von den 30 primär ligierten Kindern konnten aufgrund fehlender experimenteller Daten zum Polymorphismusnachweis nur 19, von den 95 sekundär ligierten Kindern lediglich 83 ausgewertet werden.

3.6.6 Der Zusammenhang des PDA-Verschlusszeitpunktes mit dem Polymorphismus

Die Diagrammdarstellung in Abbildung 14 veranschaulicht den PDA-Verschlusszeitpunkt der Population von 604 VLBW-Kindern. Hiervon wurden insgesamt 83 Kinder mit einem echokardiographisch nicht als hsPDA beurteilten offenen Ductus nach Hause entlassen.

Homozygote Allelträger machen tendentiell einen geringeren Anteil der mit „nicht-hsPDA“ entlassenen Kinder aus. Insgesamt verschloss sich der PDA bei 66% der Kinder innerhalb der ersten Lebenswoche. Es besteht kein signifikanter Unterschied bezüglich des Verschlusszeitpunktes unter den mutierten Allelträgern.

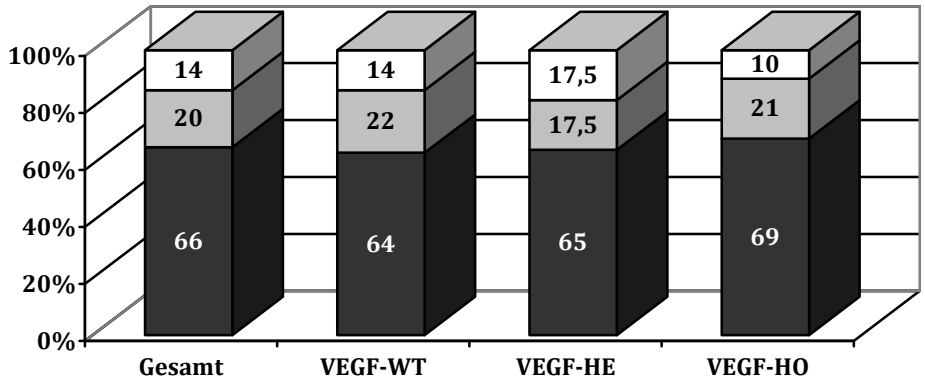

Abbildung 14: **Einfluss des Polymorphismus auf den PDA-Verschlusszeitpunkt.**

Weiß=Entlassung mit PDA; hellgrau=PDA-Verschluss >7. LT; dunkelgrau=PDA-Verschluss ≤7. LT.

3.6.7 Ethnizität unter den Respondern und Non-Respondern

In der Gesamtpopulation war bei 14% der VLBW-Kinder die Nationalität in der Akte nicht hinterlegt. Bei einigen Kindern war die Nationalität beider Elternteile unterschiedlich, sodass auch diese als unbekannt eingestuft wurden. 57,8% der Gesamtpopulation sind deutscher Abstammung. Die Betrachtung der Ethnizitätsverteilung der Responder- und Non-Respondergruppen zeigt, dass Kinder anderer Ethnität häufiger erfolgreich auf die COX-Hemmer-Therapie ansprechen als deutsche Kinder.

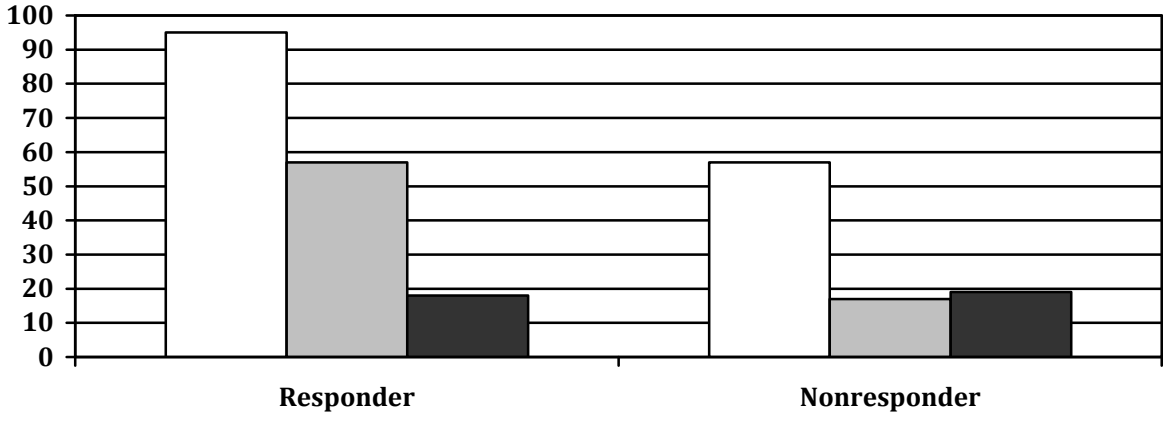

***Abbildung 15*:** **Ethnische Zugehörigkeit der Responder und Non-Responder.**

Weiß=deutsch; hellgrau=andere; dunkelgrau=unbekannt.

3.6.8 Mehrlingsbetrachtung

In der Studienpopulation kamen 101 Zwillingsgeschwisterpaare vor. Es fehlte die Information über das Vorliegen von mono- oder dizygoten Zwillingen. Hinsichtlich der VEGF-Mutationsverteilung wiesen die Zwillingsgeschwister nahezu die gleiche Allelkonstellation auf.

Tabelle 12: **VEGF-Polymorphismusverteilung bei Zwillingspaaren.**

	Erster Zwilling	Zweiter Zwilling	Gesamt
WT	17 (16,8)	22 (21,8)	39 (19,3)
HT	38 (37,6)	36 (35,6)	74 (36,6)
HT	46 (45,5)	43 (42,6)	89 (44,1)
Gesamt	101 (100)	101 (100)	202 (100)

Die Ergebnisse sind als absolute Zahlen (%) dargestellt.

3.7 Zusammenhang von Polymorphismus und Komorbidität der VLBW-Kinder

Tabelle 13 gibt eine Übersicht über den Zusammenhang von VEGF 405 G>C Polymorphismus und dem Auftreten typischer Frühgeborenenerkrankungen.

3.7.1 Respiratory Distress Syndrom

Bezogen auf die Gesamtpopulation entwickeln 63% der VLBW-Kinder ein RDS. Hinsichtlich des Polymorphismus weisen 77% der Kinder mit RDS eine heterozygote oder homozygote Mutation auf. Dies entspricht der Allelfrequenz der Gesammtpopulation. Hierbei überwiegt der Anteil des homozygot mutierten Gens. Kinder mit einem PDA sind zwar häufiger von einem RDS höheren Schweregades betroffen als Kinder ohne PDA, aber ein bedeutsamer Unterschied in der Verteilung des Polymorphismus ergab sich nicht. Der VEGF 405 G>C Polymorphismus hat somit weder einen signifikanten Einfluss auf das Auftreten eines RDS, noch auf dessen Schweregrad.

3.7.2 Bronchopulmonale Dysplasie

Die BPD ist eine chronische Lungenerkrankung, die häufig bei Frühgeborenen mit lange erfolgter künstlicher Beatmung beobachtet wird. Nach Jobe und Bancalari wird die BPD in eine milde, moderate und schwere Verlaufsform eingeteilt [95, 96]. Insgesamt konnte durch die Akteneinsicht bei 770 VLBW-Kindern eine sichere Aussage über die bronchopulmonale

Dysplasie getroffen werden. Demnach entwickelte nahezu ein Drittel der Kinder unseres Gesammtkollektivs eine BPD. Hiervon wiesen 87% ebenfalls einen PDA auf. 78% der Kinder mit PDA und BPD tragen den VEGF 405 G>C Polymorphismus. Weder hinsichtlich des Auftretens einer BPD, noch des BPD-Schweregrades und der Verteilung des Polymorphismus lässt sich ein signifikanter Zusammenhang feststellen (siehe Tabelle 13).

3.7.3 IVH, PVL und NEC

Zur Beurteilung des Schweregrades dieser typischen Frühgeborenenerkrankungen wurde für die IVH die Klassifikation nach Papille, für die PVL die Definition von Resch und für die NEC die nach Bell herangezogen [97-99]. Die Betrachtung des Gesamtkollektivs ergibt, dass 13% der VLBW-Kinder eine IVH, 3% eine PVL und 7% eine NEC entwickeln. VLBW-Kinder mit einem PDA sind signifikant häufiger von einer dieser Komplikationen betroffen als Kinder ohne PDA (IVH: 21% vs. 5%; PVL: 5% vs. 1%; NEC: 8% vs. 6%) (siehe Tabelle 5). Es ergab sich hinsichtlich der prozentualen Verteilung des Polymorphismus kein Unterschied zwischen der Gesamtpopulation und den beiden Untergruppen mit und ohne PDA. Allerdings fällt auf, dass Kinder mit IVH oder PVL häufiger homo- oder heterozygote Allelträger des VEGF-Polymorphismus sind. Der Polymorphismus war bei 68% der an NEC erkrankten Kinder aller Gruppen nachweisbar (siehe Tabelle 13).

3.7.4 Frühgeborenenretinopathie

Die ROP wurde nach der Internationalen Klassifikation der Frühgeborenenretinopathie (ICROP) in 5 Stadien eingeteilt [100]. Insgesamt lag bei 7/6 Kindern nach Einsicht der Patientenakte ein eindeutiger Befund zur Ausprägung der ROP vor. Demnach tritt die Frühgeborenenretinopathie mit einer Häufigkeit von 18% in unserem VLBW-Kollektiv auf. 84% der VLBW-Kinder mit ROP hatten auch einen PDA. Die Heterozygotenhäufigkeit unter den an Retinopathie erkrankten Kindern ist um ca. 10% höher als bei den nicht ROP-Erkrankten. Dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant (siehe Abbildung 16).

Tabelle 13: **Zusammenhang von VEGF-Polymorphismus und Auftreten von typischen Frühgeborenenerkrankungen.**

	Gesamtpopulation			**mit PDA**			**ohne PDA**		
	WT	**HE**	**HO**	**WT**	**HE**	**HO**	**WT**	**HE**	**HO**
RDS, n (%)									
≤ II°	**144** (22,5)	**225** (35,3)	**269** (42,2)	**64** (22,6)	**105** (37,2)	**113** (40)	**80** (22,5)	**120** (33,7)	**156** (43,8)
≥ III°	**36** (23)	**55** (35,3)	**65** (41,6)	**26** (22,2)	**44** (37,6)	**47** (40,1)	**10** (25,6)	**11** (28,2)	**18** (46,1)
BPD, n (%)									
mild	**30** (21,9)	**67** (48,9)	**40** (29,2)	**22** (19,6)	**55** (49,1)	**35** (31,3)	**8** (32)	**12** (48)	**5** (20)
moderat	**24** (26,7)	**25** (27,8)	**41** (45,6)	**22** (25,9)	**24** (28,2)	**39** (45,9)	**2** (40)	**1** (20)	**2** (40)
schwer	**4** (15,4)	**10** (38,5)	**12** (46,2)	**4** (17,4)	**9** (39,1)	**10** (43,5)	**0**	**1** (33,3)	**2** (66,7)
IVH, n (%)									
≤ II°	**14** (15,9)	**38** (43,1)	**36** (40,9)	**11** (17)	**27** (42,2)	**26** (40,6)	**3** (12,5)	**11** (45,8)	**10** (41,6)
≥ III°	**7** (15,5)	**21** (46,7)	**17** (37,8)	**6** (14)	**21** (48,8)	**16** (37,2)	**1** (50)	**0**	**1** (50)
PVL, n (%)	**4** (12,5)	**12** (37,5)	**16** (50)	**4** (16)	**9** (39)	**12** (48)	**0**	**3** (42,9)	**4** (57,1)
NEC, n (%)	**24** (32)	**22** (29,4)	**29** (38,7)	**14** (32,5)	**15** (34,9)	**14** (32,5)	**10** (31,3)	**7** (21,9)	**15** (46,9)
ROP, n (%)									
≤ II°	**19** (20)	**36** (37,9)	**40** (42,1)	**16** (20)	**31** (38,8)	**33** (41,1)	**3** (20)	**5** (33,3)	**7** (46,6)
≥ III°	**5** (14,7)	**17** (50)	**12** (35,3)	**5** (17,9)	**13** (46,4)	**10** (35,7)	**0**	**4** (66,6)	**2** (33,3)

Die Ergebnisse sind als absolute Zahlen (%) dargestellt.

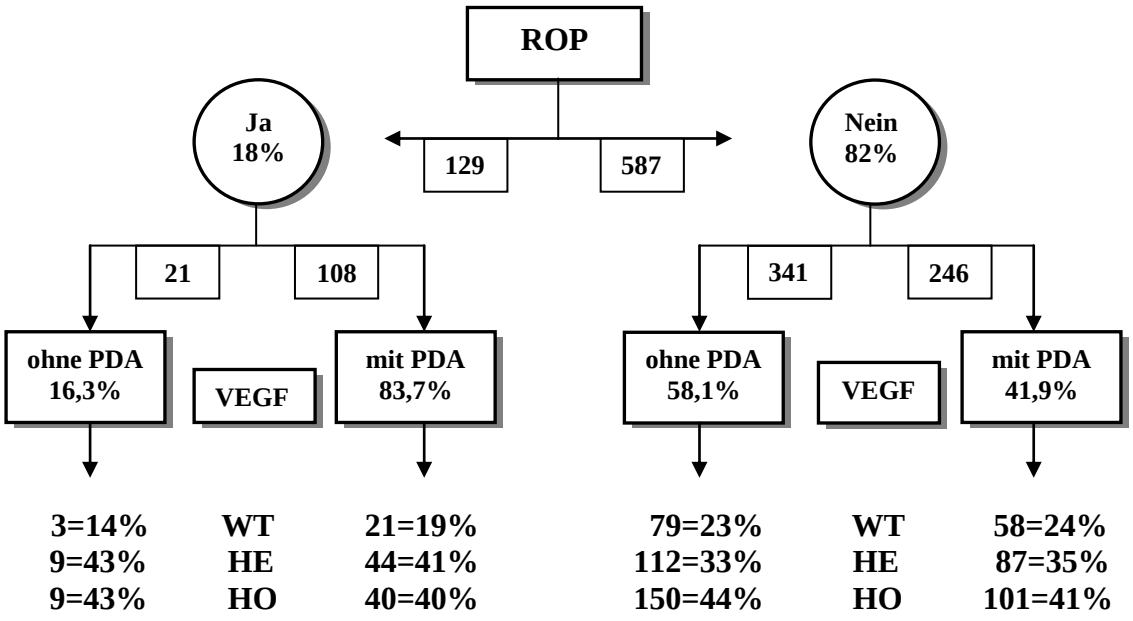

Abbildung 16: **Übersicht zur VEGF-Polymorphismus-Verteilung unter den an einer ROP erkrankten Kindern.**

Die Ergebnisse sind als absolute Zahlen und Prozent dargestellt.

4 DISKUSSION

Very low birth weight Kinder sind aufgrund von typischen Frühgeborenenerkrankungen einer hohen Morbiditätsrate ausgesetzt. Der PDA gilt hierbei als Risikofaktor für die Entstehung von IVH, PVL, ROP, BPD und NEC. In der Literatur wird eine Prävalenz des PDA von bis zu 70% bei VLBW-Frühgeborenen beschrieben [25]. Trotz der fortschreitenden wissenschaftlichen Erkenntnisse bezüglich der multifaktoriellen Pathophysiologie des PDA bleiben noch viele Fragen zum Ductusverschluss ungeklärt.

Zahlreiche v.a. tierexperimentelle Arbeiten haben die Rolle des VEGF während des Ductusverschlusses untersucht. So weiß man heute um die Bedeutung des VEGF als Angiogenesefaktor und als essentieller Mediator für die endgültige Obliteration des DA zum Ligamentum arteriosum. Eine weitere entscheidende Rolle spielt VEGF bei sehr unreifen Frühgeborenen auch in der Pathophysiologie der Frühgeborenenretinopathie (ROP) und bronchopulmonalen Dysplasie (BPD).

Der VEGF 405 G>C Polymorphismus hat durch seine Lokalisation im Promotorbereich des Gens einen signifikanten Einfluss auf die VEGF-Expression [101]. Somit könnte infolge der veränderten VEGF-Expression der Polymorphismus im VEGF Gen eine entscheidende Rolle in der Entstehung des PDA und im Therapieverlauf eines hsPDA spielen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung des VEGF 405 G>C Polymorphismus für die Inzidenz des PDA und dessen Einfluss auf den medikamentösen Therapieerfolg eines hsPDA mit COX-Hemmern anhand einer großen Studienpopulation sehr unreifer Frühgeborener zu untersuchen. Zur Durchführung der Untersuchungen wurde die bereits etablierte Methodik dieser Arbeit optimiert, um den Polymorphismus sicher nachweisen zu können.

4.1 Klinisches Profil der Gesamtpopulation

In der für die vorliegende Arbeit untersuchten Studienpopulation von 1053 VLBW-Kindern, die innerhalb eines Zeitraums von 1992 bis 2008 in der Klinik für Neonatologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin behandelt wurden, weißt der PDA eine Prävalenz von 49% auf. Dies ist niedriger als in der Literatur angegeben [25]. Die große Studienpopulation ermöglicht es, repräsentative Ergebnisse darzustellen. Der laborexperimentell untersuchte VEGF 405 G>C Polymorphismus zeigt im Gesammtkollektiv eine hohe Allelfrequenz von 77,7%. Die Prävalenz eines als behandlungsbedürftig eingestuften hsPDA beträgt in der dargestellten Arbeit 28%. Das entspricht der in der Literatur beschriebenen Therapierate bei VLBW-

Kindern mit hsPDA [102]. Im Rahmen der multifaktoriellen Genese hat die Unreife des Kindes einen entscheidenden Einfluss. Mit abnehmendem Gestationsalter und Geburtsgewicht wurde das proportional häufigere Vorkommen eines hsPDA in verschiedenen Studien zitiert [102-104]. Diese Erkenntnis können wir mit unseren Daten bestätigen. Im Durschnitt wiegen die Kinder unserer Studienpopulation mit nachgewiesenem PDA 271g weniger als die VLBW-Kinder ohne PDA (Median GG 920g vs. 1191g). Ferner sind die VLBW-Kinder mit PDA im Durchschnitt bei Geburt 3 Wochen unreifer (Median GA 26+7 SSW vs. 30 SSW) und sind häufiger männliche Frühgeborene. Mit einem medianen CRIB-Score von 5, als Ausdruck des höheren perinatalen Mortalitätsrisikos, sind unsere VLBW-Kinder insgesamt kränker als die VLBW-Kinder ohne PDA. Alle genannten Unterschiede klinischer Patientendaten beider Gruppen sind statistisch signifikant. Diese Beobachtungen haben Auswirkungen auf die höhere Mortalitätsrate von 4,2% unter unseren Kindern mit PDA. Hierzu passen die jüngsten Ergebnisse, die die Arbeitsgruppe von Rosé et al. in diesem Jahr veröffentlicht hat [105]. Die Franzosen haben in einer landesweiten Longitudinalstudie zeigen können, dass Frühgeborene, bei denen nicht in den ersten zwei Lebenstagen echokardiographisch ein PDA ausgeschlossen wurde, ein signifikant erhöhtes Risiko haben, während des primären Krankenhausaufenthaltes zu versterben.

Die biologische Unreife der VLBW Kinder ist in mehreren Studien assoziiert mit Frühgeborenenerkrankungen wie IVH, PVL, RDS, BPD und NEC [24, 106, 107]. Es wird angenommen, dass die veränderten physiologischen Gegebenheiten während des Vorhandenseins eines PDA ebenfalls einen Risikofaktor für deren Entstehung darstellen [22]. Die aktuelle Arbeit von Clyman et al. erhärtet abermals die Bedeutung des Reifealters für den Ductusverschluss. Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Clyman`s Arbeitsgruppe an 273 humanen fetalen Ductusgeweben eines mittleren Gestationsalters zwischen der 13.-23. SSW die RNA-Expression von 48 Genen, die möglicherweise eine bedeutsame Rolle während des funktionellen Ductusverschlusses spielen. Dabei handelte es sich um Gene der sauerstoffabhängigen Signalkaskade, der an der Reifung beteiligten kontraktilen Proteine, der durch Prostaglandine und Stickstoffmonoxid (NO) vermittelten Gefäßrelaxation, der Gewebsinflammation, sowie der Remodellingprozesse. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass vor allem das Gestationsalter die mRNA-Expression dieser Zielgene entscheidend beeinflusst [108].

4.2 Allelfrequenz des VEGF 405 G>C Polymorphismus

Die Allelfrequenz des VEGF 405 G>C Polymorphismus unserer Studienpopulation von 814 VLBW-Kindern betrug 77,7%. Hiervon waren 42,3% homozygote und 35,4% heterozygote Allelträger des Polymorphismus. Wir konnten keinen statistischen Zusammenhang zwischen dem VEGF 405 G>C Polymorphismus und der Inzidenz eines PDA feststellen. Banyasz et al. untersuchten 2006 an 128 VLBW-Kindern auch den VEGF 405 G>C Polymorphismus. Diese stellten eine höhere Allelfrequenz von 89% mit einem Homozygotenanteil von 45,3% und Heterozygotenanteil von 43,7% fest [109]. Der Unterschied zu unserer Studie ist eventuell mit der geringeren Fallzahl und der ungarischen Herkunft der Studienpopulation von Banyasz et al. erklärbar. Weitere Untersuchungen zeigen eine Allelfrequenz des VEGF 405 G>C Polymorphismus in der Normalbevölkerung von 65-91% [110-112].

4.3 Diskussion der genetischen Einflussfaktoren auf den PDA

Der Verschluss des PDA unterliegt einem komplexen Mechanismus prä- und postnataler Einflussfaktoren. Das multifaktorielle Geschehen des Ductusverschlusses wird von genetischen Faktoren beeinflusst. Der von uns untersuchte VEGF 405 G>C Polymorphismus ist mit großer Wahrscheinlichkeit nicht der einzige Polymorphismus, der einen Einfluss auf das Vorhandensein und auf den Verschlussprozess des Ductus haben könnte. Allein im VEGF-Gen sind zahlreiche weitere Polymorphismen beschrieben, die ebenfalls zu einer veränderten Funktionalität des Transkriptionsproduktes führen. Darüber hinaus stellt sich die Frage, inwieweit sich Polymorphismen anderer Enzyme (z.B. COX) oder Rezeptoren (z.B. für COX, VEGF, oder Prostaglandine), die für den DA-Verschluss als Schlüsselfaktoren identifiziert wurden, auswirken.

So untersuchten Treszl et al. den Angiotensin II Typ 1 Rezeptor Polymorphismus und beschreiben einen protektiven Einfluss des AT1R CC 1166 Genotyps auf den PDA [113].

Die Studie, die 333 dizygote Zwillinge und 99 monozygote Zwillinge untersuchte, kam zu dem Ergebnis, dass der PDA einer familiären Prädisposition unterliegt [114]. Zur Determination der genetischen Prädisposition beim PDA untersuchten Dagle et al. 377 single-nucleotide Polymorphismen. Hiernach spielen der Transkriptionsfaktor AP-2 beta und der TNF-Rezeptor-assoziierte Faktor 1 eine signifikante Rolle bei der Persistenz des DA [115]. In diesem Zusammenhang ist der in der Literatur beschriebene Fall zweier Verwandter mit einer Mutation des MYH11 Genes, der ein kontraktiles Protein der Glattmuskelzelle kodiert und für das Auftreten eines PDA mit dem Vorkommen eines thorakalen Aortenaneurysmas in Verbindung gesetzt wird, interessant [116].

Eine Studie untersuchte an 153 VLBW-Kindern den Einfluss des Interferon γ^{+874}T-Polymorhismus auf die PDA Inzidenz und stellte hierbei fest, dass dieser Polymorphismus das Auftreten eines PDA verhindert [117]. Eine ungarische Arbeitsgruppe fand eine Assoziation zwischen dem Estrogen-Rezeptor-Alpha Pvull-Polymorphismus und dem Vorkommen des PDA bei männlichen Frühgeborenen heraus [118].
Die Untersuchung von Polymorphismen beim Verschluss des DA ist zudem, aufgrund der Tatsache, dass die Unreife des Kindes eine wesentliche Rolle beim Verschlussprozess spielt, erschwert. Folglich ist eine klare Differenzierung Unreife-bedingter gegenüber genetischer Einflussfaktoren kaum möglich.
Es gibt bisher keine Studie, die den Einfluss des VEGF-Polymorphismus auf den humanen Ductusverschluss an einem großen Kollektiv sehr unreifer Frühgeborener untersucht hat.

4.4 Einfluss des VEGF und seiner Rezeptoren auf den PDA

VEGF, das auch als „vascular permeability factor" bekannt ist, gehört zur Familie der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren. Die zentrale Bedeutung des VEGF in der koordinierten Bildung von Blutgefäßen, Endothelien und Organformation erklärt, wieso die stärkste VEGF-Expression während der Embryonalentwicklung stattfindet. Die durch Ductuskontraktion herrschende Hypoxie bewirkt bei Neugeborenen die VEGF-Expression, die zur Hyperplasie neointimaler Endothelien und Proliferation von Vasa vasorum führt und somit die endgültige Obliteration des DA zum Ligamentum arteriosum bewirkt. Die Arbeitsgruppe um R. Clyman waren die ersten, die im Tiermodell die Bedeutung von VEGF für den Ductusverschluss untersucht haben [119]. Waleh et al. wiesen am unreifen Ductusendothel von Pavianbabies nach, dass VEGF unerlässlich ist für die CD14/CD163 Zelladhäsion. Auch am Ductusgewebe von Schafen wurde die Bedeutung des VEGF an der Formation von Endothelkissen und Einsprossung von Vasa vasorum festgestellt [120]. Die VEGF-Expression kann durch die um 71% höhere Promotoraktivität bei gleichzeitigem Vorhandensein der Allele VEGF 405 G und VEGF 460 C gesteigert werden [121]. Banyasz et al. untersuchten bei 128 VLBW-Kindern die Inzidenz von VEGF-Polymorphismen unter den Kindern mit PDA. Hierbei stellten sie eine höhere Polymorphismusrate von VEGF 2578 C>A und VEGF 460 T>G bei Kindern mit PDA fest. Der VEGF 405 G>C Polymorphismus kam in derer Studie häufiger bei Kindern ohne PDA vor [109].
Gebunden wird VEGF-A von den Rezeptoren VEGF-R1 und VEGF-R2. Der VEGF-R1 Rezeptor ist ein transmembranöses Glykoprotein, der auf vaskulären Endothelien, Makrophagen, Monozyten und hämopoetischen Stammzellen lokalisiert ist.

Es gibt bisher nur wenige Arbeiten, die die Expression von VEGF und dessen Rezeptoren am Ductusgewebe untersucht haben.

In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse von Weber et al. aus dem Jahr 2011 interessant, die VEGF und seine Rezeptoren in fetalen Rattenductus- und Aortenendothelzellkulturen nachgewiesen haben. Die Regulationsmechanismen im Ductusendothel unterscheiden sich von denen im Endothel der permanenten Gefäße. Hierbei wurde die Expression von VEGF-R1 in der Ductusendothelzellkultur nachgewiesen. VEGF-R1 vermittelt u.a. die Endotheldifferenzierung und Gefäßorganisation. Durch Phosphorylierung seines Liganden hemmt er die VEGF Wirkung und erhöht die Gefäßpermeabilität [122]. Webers Arbeit untersuchte die Wirkung der COX-Hemmer auf das Endothel des DA und kam zu der Erkenntnis, dass Ibuprofen die mRNA-Expression von VEGF und seinen Rezeptoren R1 und R2 erhöht, während Indometacin nur einen geringen Einfluss auf deren Expression zu haben scheint [123].

Dies könnte eventuell erklären, dass mehr als die Hälfte der Non-Responder der Ibuprofengruppe (53,9%) dieser Arbeit Allelträger des homozygot mutierten VEGF-Gens ist. Man könnte annehmen, dass diese Therapieversager weniger VEGF exprimieren und somit der PDA persistiert. Wohingegen der Polymorphismus womöglich in der Indometacintherapie weniger Bedeutung hat, wie bereits die o.g. Arbeiten zeigten.

Der VEGF-R2 Rezeptor ist als transmenbranöser Tyrosinkinaserezeptor auf Endothelien und auf hämopoetischen Stammzellen der wichtigste Regulator der Proliferation und Differenzierung der Endothelzellen durch Vermittlung von Mitogenese, Angiogenese, Permeabilitätserhöhung und antiapoptotischer Effekte insbesondere im Endothel der Nabelschnur [124]. Es wird angenommen, dass der VEGF-R2 Rezeptor vorwiegend im späteren Signalweg der Angiogenese bedeutsam ist, wohingegen VEGF-R1 und VEGF-R3 in der frühen Phase der Angiogenese und der Lymphangiogenese Relevanz zeigen [85]. Die Arbeitsgruppe von Frau Koehne konnte die erhöhte VEGF-R2 mRNA-Expression in den Ductusendothelzellen in Normoxie nach Zugabe von COX-Inhibitoren nachweisen. Insgesamt schien Indometacin hierbei im Vergleich zu Ibuprofen einen geringeren Einfluss auf das VEGF-R1-R2 System zu haben [123]. Bereits 1998 zeigten Marti et al. an adulten Rattenendothelzellen unterschiedlicher Organe, dass Ibuprofen unter Hypoxie die VEGF-R2 mRNA Expression im Ductusendothel verändert. Die Expression im Aortenendothel blieb unverändert [125].

Die vielfältige Interaktion der COX- und VEGF-Stoffwechselwege wird auch an einem anderen Beispiel deutlich. Cytochrom P-450 (CYP)-Epoxygenase metabolisiert Arachidonsäure in Epoxyeicosatriensäure (EET), welche mehrere Signalwege der Endothelproliferation, Zellmigration und Angiogenese aktiviert [126]. VEGF stimuliert über die Phosphorylierung von AMP-aktivierter Proteinkinsae (AMPK) die CYP2C-Promotoraktivität in Endothelzellen und bewirkt über die erhöhte CYP2C8 RNA und Proteinexpression die Bildung von vasoaktiven EETs [127]. Weitere Wirkungen des CYP2C8 sind u.a. die Wirkung als Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF)-Synthase, welcher als reaktive Sauerstoffspeziesbildner den Gefäßtonus reguliert [128]. So kann man annehmen, dass ein CYP2C8 Polymorphismus die VEGF-Signalkaskade beeinflusst. Interessant wäre die gemeinsame Betrachtung der Auswirkung beider Polymorphismen, des VEGF 405 G>C und CYP2C8-Polymorphismus, auf den Ductusverschluss. Eine isolierte Untersuchung der Bedeutung des CYP2C8-Polymorphismus für das Auftreten des hsPDA bei VLBW-Kindern und deren Ansprechen auf die COX-Hemmer-Therapie hat allerdings keinen Zusammenhang gezeigt [129, 130].

4.5 Diskussion des Einflusses des VEGF-Polymorphismus auf den Therapieerfolg

Trotz Entwicklung unterschiedlicher Therapiestrategien ist die Datenlage hinsichtlich der Vorteile einer Ductusintervention insbesondere für das langfristige entwicklungsneurologische Outcome der Frühgeborenen immer noch dürftig. Dies ist dem Umstand zu schulden, dass es in den bisher durchgeführten großen randomisierten Multicenterstudien nie eine Kontrollgruppe gab, bei der gänzlich auf eine Therapie des PDA verzichtet wurde. Gegenstand aktueller Diskussionen ist daher nicht nur, ob und nach welcher Methode (konservativ, pharmakologisch oder chirurgisch) eine Intervention bei Frühgeborenen mit nachgewiesenem PDA erfolgen sollte, sondern auch wann der optimierte Zeitpunkt der Diagnosestellung ist und welche Kriterien zur Beurteilung seiner hämodynamischen Relevanz und damit seiner Therapiebedürftigkeit herangezogen werden sollten [131].

Derzeit stellt nach wie vor der medikamentös therapeutische Ansatz mit Cyclooxygenasehemmern die häufigste Therapiewahl bei Vorliegen eines hsPDA dar. In dieser Arbeit wurde der hsPDA der untersuchten VLBW-Kinder in 89,9% der Fälle primär medikamentös behandelt. Es kam zunächst einer der beiden COX-Hemmer zum Einsatz. Hierbei wurden Indometacin und Ibuprofen nahezu gleichermaßen eingesetzt (Indometacin n=142; Ibuprofen n=122). Die Wahl des COX-Hemmers unterliegt kontinentalen Unterschieden. In den USA und Canada kamen bevorzugt Indometacin zum Einsatz,

wohingegen Ibuprofen in Europa häufiger Anwendung bei der Ductustherapie fand [132]. In unserer Studienpopulation deckt sich die Erfolgsrate der Ibuprofen- (60,6%) und der Indometacintherapie (66,7%) mit der aktuellen Studienlage aus 2015, die für die intravenöse Therapie mit Indometacin und Ibuprofen eine vergleichbare Wirksamkeit auf den PDA zeigt [133]. Es sind lediglich Unterschiede im Nebenwirkungsprofil beider COX-Hemmer bekannt. Betrachtet man die Non-Responder beider COX-Hemmer-Gruppen unserer Studienpopulation, so fällt auf, dass diese Kinder verglichen mit den Respondern im Durchschnitt kleiner (Median 778g vs. 894g) und unreifer (Median 25,6 SSW vs. 26,5 SSW) sind. Diese Beobachtung bezieht sich auf VLWB Kinder der COX-Hemmer-Therapie, bei denen eine Polymorphismusermittlung möglich war. Die Unreife des Frühgeborenen verändert die physiologischen Eigenschaften des Ductus arteriosus, wodurch es zu einer geringeren Verschlussrate kommt. Dies ist zum einen durch die erhöhte Sensitivität des DA bei sehr unreifen Frühgeborenen auf Prostaglandine, insbesondere auf PGE_2, die verminderte Sensitivität des DA auf Sauerstoff und die verstärkte Expression von NO-Synthase bedingt [11, 103]. Dagegen ist die Reifung des Ductusgewebes und die damit verbundene Minderregulierung durch die Prostaglandine mit einer geringeren Ansprechrate auf die COX-Hemmer assoziiert [134]. Ähnlich ist ein späterer Therapiebeginn, infolge der postnatalen Reifung des Cytochrom P450-Systems, über das sowohl Indometacin, als auch Ibuprofen verstoffwechselt werden, mit einer reduzierten Erfolgsrate verbunden [135]. Leider können wir aufgrund fehlender Information zum Therapiebeginn keine Aussage dazu machen, inwieweit dies in unserer Studienpopulation den Erfolg der COX-Hemmer-Therapie beeinflusst hat.

Die Versagerrate der COX-Hemmer-Therapie zum Ductusverschluss wurde in vorherigen Untersuchungen mit bis zu 30% beschrieben [51, 136]. In unserer Kohorte von 264 VLBW-Kindern liegt die Non-Responderrate bei 35,6%. Die höhere Versagerrate liegt womöglich an dem hohen Anteil an Frühgeborenen unter 1000g. Dies wurde bereits 2005 von Van-Overmeire beschrieben [24]. Hamrick beschrieb sogar eine Non-Responderrate unter Extremely low birth weight (ELBW)-Kindern von 60-66% [103].

In dieser Arbeit betrachteten wir u.a. den Einfluss des Polymorphismus auf den COX-Hemmer-Therapieerfolg. Der Vergleich der Responder und Non-Responder ergibt eine höhere Homozygotenrate von 54% in der Gruppe der Ibuprofen-Non-Responder (vs. Responder 38%). Jedoch entspricht die Prävalenz des Polymorphismus in der Responder und Non-Responder-Gruppe nahezu der Verteilung in der Gesamtpopulation. Damit ist es eher unwahrscheinlich, dass homozygote Allelträger des VEGF-Polymorphismus den

Ductustherapieerfolg mit COX-Hemmern (insbesondere für die schlechtere Erfolgsrate unter Ibuprofen) negativ beeinflussen.

Die Wiederöffnung eines initial erfolgreich medikamentös verschlossenen Ductus war bei VLBW-Kindern unter Ibuprofentherapie um 10% geringer als unter Indometacin. Eine mögliche Erklärung ist, dass VLBW-Kinder, die eine Ibuprofentherapie erhielten im Durchschnitt, etwas reifer und schwerer und weniger krank waren. Mehr als ein Drittel der Kinder, die Indometacin zum Ductusverschluss erhielten, reagierten bereits nach einem Zyklus erfolgreich. VLBW-Kinder, die mehr als einen Zyklus Indometacin benötigten, waren zu 93% Allelträger des VEGF-Polymorphismus (93% vs. 77%). Man könnte daher annehmen, dass der VEGF-Polymorphismus einen negativen Einfluss auf den Indometacintherapieerfolg hat. In der Ibuprofen-Gruppe benötigte nahezu die Hälfte der Kinder mehr als zwei Therapiezyklen. Allerdings gab es in der Ibuprofengruppe keinen Unterschied hinsichtlich der Verteilung des VEGF-Polymorphismus. So waren 81,1% der Kinder, die einen Ibuprofenzyklus erhielten Allelträger des VEGF-Polymorphismus und 79,6% derjenigen Kinder, die mindestens 2 Zyklen Ibuprofen bekamen. Über die Gründe für den statistisch signifikant höheren Zyklusbedarf in der Ibuprofengruppe lässt sich nur spekulieren. Mögliche Erklärungsansätze wären die kürzere Zyklusdauer von Ibuprofen und die unterschiedlichen Dosierungen beider Wirkstoffe. Die VLBW-Kinder dieser Arbeit erhielten die Ibuprofentherapie über 3 Tage mit dem Dosierungsregime von 10-5-5 mg/kg/KG im 24-stündigen Zeitabstand. Aufgrund der bekannten geringeren Erfolgsrate bei sehr unreifen Frühgeborenen findet heutzutage eher das Dosierungsregime mit 20-10-10 mg/kg/KG im 24-stündigen Zeitabstand Anwendung. Die Indometacintherapie erfolgte über 5 Tage, wobei 3 Gaben von 0,2 mg/kg/KG im 12-stündigen Zeitabstand erfolgten, gefolgt von einer Erhaltungstherapie über 3 Tage mit jeweils 0,1 mg/kg/KG im 24-stündigen Zeitabstand.

Der operative Verschluss stellt die Therapieoption der zweiten Wahl dar. Der PDA wird bei Kontraindikation oder Versagen der COX-Hemmer operativ ligiert, falls diese Kinder nicht von der maschinellen Beatmung zu entwöhnen sind. Insgesamt wurden in der untersuchten Studienpopulation in der Charité 10% der VLBW-Kinder mit einem hsPDA primär ligiert. Nach einem frustanen Therapieergebnis der COX-Hemmer-Behandlung wurde sekundär der PDA bei 35,8% der Kinder operativ verschlossen. Die Betrachtung des Ligaturzeitpunktes des primär oder sekundär ligierten hsPDA und der Verteilung des VEGF-Polymorphismus haben keinen signifikanten Unterschied ergeben. Allerdings beobachteten wir in der Gruppe des sekundär ligierten hsPDA einen durchschnittlich früheren Interventionszeitpunkt bei homozygot und heterozygot mutierten Allelträgern als beim Wildtyp.

Aus der Literatur ist bekannt, dass ein früherer Ligaturzeitpunkt häufiger mit einer neurologischen Entwicklungsstörung des Kindes verbunden ist [84].
Die Untersuchung einer Kohorte von 604 VLBW-Kindern dieser Arbeit zeigte, dass sich der PDA bei 66% der Kinder innerhalb der ersten Lebenswoche verschloss und 14% mit einem nicht hämodynamisch signifikanten PDA nach Hause entlassen worden sind. Wir konnten keinen Zusammenhang des Polymorphismus mit dem Verschlusszeitpunkt feststellen.
Die vorliegende Arbeit sollte u.a. die Frage beantworten, ob der VEGF-Polymorphismus im Zusammenhang mit dem Auftreten anderer Frühgeborenenerkrankung steht. Das Bestehen eines prädisponierenden Einflusses eines hsPDA auf die typischen Frühgeborenen-erkrankungen war bereits Diskussionspunkt anderer Arbeiten [103]. In unserer Studienpopulation waren die typischen Frühgeborenenerkrankungen mit dem PDA assoziiert und wurden häufiger unter den Non-Respondern beobachtet. Diese Assoziation könnte das Resultat eines erhöhten Risikos, infolge der Unreife und des Vorhandenseins von weiteren Krankheiten sein. Wie bereits in anderen Untersuchungen gezeigt wurde, waren auch in der vorliegenden Arbeit insbesondere die ROP und BPD signifikant häufiger bei den Non-Respondern der medikamentösen COX-Hemmer-Therapie [51, 136].

4.6 Der VEGF Einfluss auf die ROP-Inzidenz

Eine weitere entscheidende Rolle spielt VEGF bei sehr unreifen Frühgeborenen in der Pathophysiologie der Frühgeborenenretinopathie (ROP). Primär herrscht postnatal in der unreifen Retina des Säuglings ein relatives Überangebot an Sauerstoff, das zur Obliteration von retinalen Gefäßen führt. Hieraus resultiert eine lokale Hypoxie, die wiederum sekundär über die VEGF Ausschüttung zur Neovaskularisation retinaler Gefäße führt. Hierin verbirgt sich das Risiko von Retinaablösungen bis hin zur Erblindung des betroffenen Auges.
Häufig überschneidet sich der Zeitpunkt der medikamentösen Ductustherapie mit der vulnerablen Phase der Retinopathieentstehung. In der Studienpopulation dieser Arbeit beträgt die Rate der an ROP erkrankten Kinder mit PDA 18%.
Eine Untersuchung aus dem Jahr 2006 an neugeborenen Ratten, die intraperitoneal mit Ibuprofen oder Indometacin therapiert wurden, hat einen inhibitorischen Effekt von Ibuprofen auf die retinale Neovaskularisierung ergeben. Hierbei nahm die retinal gemessene Expressionsrate an mRNA von VEGF und dessen Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 unter der Ibuprofentherapie ab [137].
Prospektive Studien zur Evaluierung des Einflusses der postnatalen Exposition von COX-Hemmern auf die Retinopathieinzidenz und deren Schweregrad bei Frühgeborenen existieren

nicht. Die Häufigkeitsverteilung einer ROP wurde im Rahmen der großen prospektiven Multicenter-Studien zur Ductusintervention, wenn auch als Komorbiditätsfaktor, immer mit erhoben. Aus den entsprechenden Metaanalysen ergibt sich bei der vergleichenden Betrachtung von Ibuprofen und Indometacin ähnlich wie für deren Wirksamkeit bei der Ductustherapie kein Unterschied in der ROP-Inzidenz. Jedoch zeigt sich, dass die Therapieversager einer medikamentösen Ductusintervention häufig eine höhere ROP-Inzidenz haben als erfolgreich therapierte Frühgeborene [138]. So hatten auch in unserer Studie 43% der Non-Responder signifikant häufiger eine ROP als Responder (vs.24%). Viele aktuelle Untersuchungen haben gezeigt, dass ein Polymorphismus im VEGF-Gen nicht mit dem Risiko der ROP assoziiert ist. Kalmeh et al. haben keine Assoziation zwischen den VEGF 405 G>C und VEGF 936 Polymorphismen und der ROP Entstehung festgestellt [139].

Wir konnten mit der vorliegenden Arbeit zeigen, dass das Vorkommen des VEGF 405 G>C Polymorphismus tendentiell höher ist unter den an ROP betroffenen VLBW Kindern. Die Heterozygoten Allelträger sind um 10% häufiger und der Wildtyp um bis zu 9% seltener vertreten unter den ROP Erkrankten. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

Abgesehen von der Retinopathieentstehung ist auch eine pathophysiologische Bedeutung von VEGF und dessen Rezeptoren bei der Entwicklung anderer typischer Frühgeborenenerkrankungen, wie beispielsweise der BPD bekannt. Eine Untersuchung an humanen postmortalen Lungen von 10 Kindern zeigt eine geringere VEGF-mRNA-Expression in den BPD erkrankten Alveolen als in gesunden Lungen [140]. Ein möglicher gemeinsamer Trigger könnte der zum Zeitpunkt der Geburt bei Frühgeborenen verfrüht stattfindende unphysiologische Sprung des Sauerstoffpartialdruckes (von intrauterin pO_2 25mmHg auf extrauterin pO_2 75mmHg) sein.

Durchschnittlich waren die Kinder unserer Studienpopulaion, die Indometacin zum Ductusverschluss erhielten nahezu gleich häufig von ROP und BPD betroffen, wie die mit Ibuprofen therapierten VLBW-Kinder.

4.7 Stärken und Schwächen dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit bedient sich der retrospektiven Analyse klinischer Daten und Blutproben einer großen Kohorte von 1118 VLBW-Kindern innerhalb des Zeitraumes von 1992 bis 2008. Die bereits vorhandenen Guthrie-Filterkarten ermöglichten allerdings nur die Rekrutierung eines Kollektivs von 1053 Kindern, da durch das Alter der Blutproben die DNA-Extraktion erschwert war und in 65 Fällen das DNA-Material zur PCR- und RFLP-Untersuchung nicht ausreichte. Hierdurch ergab sich eine Reduktion der in die

Ergebnisauswertung eingeflossenen Fallzahl in beiden COX-Hemmer-Gruppen (Verlust von 28 Kindern in der Indometacingruppe und 17 Kindern in der Ibuprofengruppe). Die restlichen 20 Proben ohne Polymorphismusauswertung entfallen auf Kinder in der Gruppe ohne PDA.

Während des Untersuchungszeitraumes blieben infolge der einheitlichen Klinik internen Standards, die zur Diagnostik und Therapieindikation verwendeten Kriterien konstant. Die sonographische und klinische Diagnostik erfolgte durch qualifizierte Fachärzte der Kinderheilkunde. Eine engmaschige Überwachung, insbesondere mittels echokardiographischer Verlaufskontrollen erfolgte in Kooperation mit der Klinik für Kinderkardiologie. Die fachliche Kompetenz ist somit ein sehr geringer Störfaktor für die klinischen Ergebnisdaten. Die Wahl des COX-Hemmer-Wirkstoffes unterlag bis 2004 campusgebundenen Unterschieden. Am Charité Campus Virchow-Klinkum kam bis 2004 ausschließlich Ibuprofen zum Einsatz. Die Dosierungsregime von Ibuprofen und Indometacin waren Campus übergreifend einheitlich.

Aufgrund von Metaanalysen, die sich auf eine Fallzahl von mehreren tausend Frühgeborenen stützen, geht man von einer vergleichbaren Wirksamkeit der beiden nicht selektiven COX-Hemmer Ibuprofen und Indometacin beim medikamentösen Ductusverschluss Frühgeborener aus. Daher sollte sich der in unserer Patientenkohorte erfolgte Einsatz beider COX-Hemmer nicht negativ auf die Datenqualität ausgewirkt haben.

Den Zusammenhang des Polymorphismus mit der Ethnie und die Bedeutung der Ethnie für den Therapieerfolg konnten wir aufgrund der unvollständigen Erfassung des Migrationshintergrundes der Kinder nicht abschließend untersuchen.

5 LITERATURVERZEICHNIS

1. Galenus. *Opera Omnia.* 131 a.D.
2. French, R.K. The thorax in history. 6. Circulation of the blood. Thorax 1978;33:714-27.
3. Coceani F, PM Olley. Role of prostaglandins, prostacyclin, and thromboxanes in the control of prenatal patency and postnatal closure of the ductus arteriosus. Semin Perinatol 1980;4(2):109-13.
4. Olofsson B, Pajusola K, Kaipainem A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, Orpana A, Pettersson RF. *Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells.* Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93(6):2576-81.
5. Sinha S, M.L. *Essential Neonatal Medicine. 5. Auflage. UK.* Wiley-Blackwell, 2012.
6. Congdon ED. *Transformation of the aortic-arch system during the development of the human embryo.* Contributions to Embryology 1922;14(68):49-U7.
7. Schneider DJ, Moore JW. *Patent ductus arteriosus.* Circulation 2006;114:1873-82.
8. Gittenberger-de Groot AC, SJ, Mentink M, Poelmann RE, Patterson DF. *Histologic studies on normal and persistent ductus arteriosus in the dog. J Am Coll Cardiol 1985;6:394-404*
9. Hornblad PY. *Embryological observations of the ductus arteriosus in the guinea-pig, rabbit, rat and mouse. Studies on closure of the ductus arteriosus. IV.* Acta Physiol Scand 1969;76(1):49-57.
10. Clyman RI. *PGE2 is a more potent vasodilator of the lamb ductus arteriosus than is either PGI2 or 6 keto PGF1alpha.* Prostaglandins 1978;16(2):259-64.
11. Momma K, Toyono M. *The role of nitric oxide in dilating the fetal ductus arteriosus in rats.* Pediatr Res 1999;46(3):311-5.
12. Seidner SR, Chen YQ, Oprysko PR, Mauray F, Tse MM. *Combined prostaglandin and nitric oxide inhibition produces anatomic remodeling and closure of the ductus arteriosus in the premature newborn baboon.* Pediatr Res 2001;50(3):365-73.
13. Speer C, Gahr M. *Pädiatrie. 2. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag 2004:634-635.*
14. Thorburn GD. *The placenta, PGE2 and parturition.* Early Hum Dev 1992;29(1-3):63-73.
15. Nakanishi T, Gu H, Hagiwara N, Momma K. *Mechanisms of oxygen-induced contraction of ductus arteriosus isolated from the fetal rabbit.* Circ Res 1993;72(6):1218-28.
16. Coceani F, Liu Y, Seidlitz E, Kelsey L, Kuwaki T, Ackerley C, Yanagisawa M. *Endothelin A receptor is necessary for O(2) constriction but not closure of ductus arteriosus.* Am J Physiol 1999;277(4 Pt 2):H1521-31.
17. Slomp J, Gittenberger-de Groot AC, Glukhova MA, Conny J. *Differentiation, dedifferentiation, and apoptosis of smooth muscle cells during the development of the human ductus arteriosus.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. 17(5): p. 1003-9.
18. Reller MD, Ziegler ML, Rice MJ, Solin RC, McDonald RW. *Duration of ductal shunting in healthy preterm infants: an echocardiographic color flow Doppler study.* J Pediatr 1988;112(3):441-6.
19. Echtler K, Stark K, Lorenz M, Kertan S, Walch A, Jennen L, Rudelius M, Seidi S, Kremmer E, Emambokus NR, von Bruehi ML, Frampton J, Isermann B, Genzel-Boroviczeny O, Schreiber C, Mehili J, Kastraci A, Schwaiger M, Shivdasani RA, Massberg S. *Platelets contribute to postnatal occlusion of the ductus arteriosus.* Nat Med 2010;16(1):75-82.

20. Coombs RC, Morgan ME, Durbin GM, Booth IW, McNeish AS. *Abnormal gut blood flow velocities in neonates at risk of necrotising enterocolitis.* J Pediatr Gastroenterol Nutr 1992;15(1):13-9.
21. Evans N, Kluckow M. *Early ductal shunting and intraventricular haemorrhage in ventilated preterm infants.* Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 1996;75(3):F183-6.
22. Kluckow M, Evans N. *Ductal shunting, high pulmonary blood flow, and pulmonary hemorrhage.* J Pediatr 2000;137(1):68-72.
23. Gersony WM, Peckham GJ, Ellison RC, Miettinem OS, Nadas AS. *Effects of indomethacin in premature infants with patent ductus arteriosus: results of a national collaborative study.* J Pediatr 1983;102(6):895-906.
24. Van Overmeire B, Chemtob S. *The pharmacologic closure of the patent ductus arteriosus.* Semin Fetal Neonatal Med 2005;10(2):177-84.
25. Obladen M, Koehne P. *Interventions for Persisting Ductus Arteriosus in the preterm infant.* New York: Springer Medizin Verlag 2005:15-18.
26. Clyman RI, Mauray F, Rudolph AM, Heymann MA. *Age-dependent sensitivity of the lamb ductus arteriosus to indomethacin and prostaglandins.* J Pediatr 1980;96(1):94-8.
27. Noori S, McCoy M, Friedlich P, Bright B, Gottipati V, Seri I, Sekar K. *Failure of ductus arteriosus closure is associated with increased mortality in preterm infants.* Pediatrics 2009;123(1):138-44.
28. Clyman RI. *Mechanisms regulating the ductus arteriosus.* Biol Neonate 2006;89(4):330-5.
29. Deeg KH. *Doppler sonographic detection of reduced flow velocity in the celiac trunk of the newborn infant with patent ductus arteriosus Botalli compared to a healthy control group.* Monatsschr Kinderheilkd 1987;135(1):24-9.
30. Van de Bor M, Verloove-Vanhorick SP, Brand R, Ruys JH. *Patent ductus arteriosus in a cohort of 1338 preterm infants: a collaborative study.* Paediatr Perinat Epidemiol 1988;2(4):328-36.
31. Osborn DA, Evans N, Kluckow M. Haemodynamic and antecedent risk factors of early an late periventricular/intraventricular hemorrhage in premature infants. Pediatrics 2003;112:33-9.
32. Ellison RC, Peckham GJ, Lang P, Talner NS, Lerer TJ, Lin L, Dooley KJ, Nadas AS. *Evaluation of the preterm infant for patent ductus arteriosus.* Pediatrics 1983;71(3):364-72.
33. McGrath RL, McGuinness GA, Way GL, Wolfe RR, Nora JJ, Simmons MA. *The silent ductus arteriosus.* J Pediatr 1978;93(1):110-3.
34. Davis P, Turner-Gomes S, Cunningham K, Way C, Roberts R, Schmidt B. *Precision and accuracy of clinical and radiological signs in premature infants at risk of patent ductus arteriosus.* Arch Pediatr Adolesc Med 1995;149(10):1136-41.
35. Johnson GL, Breart GL, Gewitz MH, Brenner JI, Lang P, Dooley KJ, Ellison RC. *Echocardiographic characteristics of premature infants with patient ductus arteriosus.* Pediatrics 1983:72(6):864-71.
36. Kluckow M, Evans N. *Early echocardiographic prediction of symptomatic patent ductus arteriosus in preterm infants undergoing mechanical ventilation.* J Pediatr 1995;127(5):774-9.
37. Mellander M, Larsson LE, Ekstrom-Jodal B, Sabel KG. *Prediction of symptomatic patent ductus arteriosus in preterm infants using Doppler and M-mode echocardiography.* Acta Paediatr Scand 1987;76(4):553-9.
38. Schmitz L, Stiller B, Koch H, Koehne P, Lange P. *Diastolic left ventricular function in preterm infants with a patent ductus arteriosus: a serial Doppler echocardiography study.* Early Hum Dev 2004;76(2):91-100.

39. Skinner J, Alverson D, Hunter S. *Echocardiography for the neonatologist. Edinburgh: Churchill Livingstone 2000:151-167.*
40. El-Khuffash AF, Molloy EJ. *Influence of a patent ductus arteriosus on cardiac troponin T levels in preterm infants.* J Pediatr 2008;153(3):350-3.
41. Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, Suga S, Saito Y, Ogawa Y, Shirakami G, Jougasaki M, Obata K,Yasue H et al. *Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide.* J Clin Invest 1991; 87(4):1402-12.
42. Mukoyama M, Nakao K, Saito Y, Ogawa Y, Hosoda K, Suga S, Shirakami G, Jougasaki M, Imura H. *Increased human brain natriuretic peptide in congestive heart failure.* N Engl J Med 1990;323(11):757-8.
43. Friedman WF, Hischklau MJ, Printz MP, Pitlick PT, Kirkpatrick SE.*Pharmacologic closure of patent ductus arteriosus in the premature infant.* N Engl J Med 1976;295(10):526-9.
44. Heymann MA, Rudolph AM, Silverman NH. *Closure of the ductus arteriosus in premature infants by inhibition of prostaglandin synthesis.* N Engl J Med 1976;295(10):530-3.
45. Jones LJ, Craven PD, Attia J, Thakkinstian A, Wright I. *Network meta-analysis of indomethacin versus ibuprofen versus placebo for PDA in preterm infants.* Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2011;96(1):F45-52.
46. Chemtob S, Beharry K, Rex J, Chatterjee T, Varma DR, Aranda JV. *Differences in the effects in the newborn piglet of various nonsteroidal antiinflammatory drugs on cerebral blood flow but not on cerebrovascular prostaglandins.* Pediatr Res 1991;30(1):106-11.
47. Pezzati M, Vangi V, Biagiotti R, Bertini G, Cianciulli D, Rubaltelli FF. *Effects of indomethacin and ibuprofen on mesenteric and renal blood flow in preterm infants with patent ductus arteriosus.* J Pediatr 1999;135(6):733-8.
48. Mosca F, Bray M, Lattanzio M, Fumagalli M, Tosetto C. *Comparative evaluation of the effects of indomethacin and ibuprofen on cerebral perfusion and oxygenation in preterm infants with patent ductus arteriosus.* J Pediatr 1997;131(4):549-54.
49. Gross RE. *Surgical Management of the Patent Ductus Arteriosus: With Summary of Four Surgically Treated Cases.* Ann Surg 1939;110(3):321-56.
50. Laborde F, Noirhomme P, Karam J, Batisse A, Saint Maurice O. *A new video-assisted thoracoscopic surgical technique for interruption of patient ductus arteriosus in infants and children.* J Thorac Cardiovasc Surg 1993;105(2):278-80.
51. Kabra NS, Schmidt B, Roberts RS, Doyle LW, Papille L, Fanaroff A. *Neurosensory impairment after surgical closure of patent ductus arteriosus in extremely low birth weight infants: results from the Trial of Indomethacin Prophylaxis in Preterms.* J Pediatr 2007;150(3):229-34, 234 e1.
52. Zbar RI, Chen AH, Behrendt DM, Bell EF, Smith RJ. *Incidence of vocal fold paralysis in infants undergoing ligation of patent ductus arteriosus.* Ann Thorac Surg 1996;61(3):814-6.
53. Wagner HR, Ellison RC, Zierler S, Lang P, Purohit DM, Behrendt D, Waldhausen JA. *Surgical closure of patent ductus arteriosus in 268 preterm infants.* J Thorac Cardiovasc Surg 1984;87(6):870-5.
54. Burke RP, Jacobs JP, Cheng W, Trento A, Fontana GP. *Video-assisted thoracoscopic surgery for patent ductus arteriosus in low birth weight neonates and infants.* Pediatrics 1999;104(2 Pt 1):227-30.
55. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid.* Science 1983;219(4587):983-5.

56. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT. *Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF.* Science 1989;246(4935):1309-12.
57. Plouet J, Schilling J, Gospodarowicz D. *Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. EMBO. 1999;8:3801-3806.*
58. Persico MG, Vincenti V, DiPalma T. *Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (PlGF).* Curr Top Microbiol Immunol 1999;237: 31-40.
59. Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, Kaipainen A, Jeltsch M, Joukov V, Alitalo K. *VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development.* Development 1996;122(12):3829-37.
60. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. *Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor.* Proc Natl Acad Sci U S A 1991;88(20):9267-71.
61. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. *Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3.* Circulation 1996;93(8):1493-5.
62. Tischer E, Mitchell R, Hartmann T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. *The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing.* J Biol Chem 1991;266(18):11947-54.
63. Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, Peat D, Gillat D, Harper SJ. *VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma.* Cancer Res 2002;62(14):4123-31.
64. Eming S, Krieg T. *Molecular mechanisms of VEGF-A action during tissue repair.* Journal of Investigative Dermatology 2006;11:79-86.
65. Stacker SA. *Lymphangiogenesis and cancer metastasis.* Nat Rev Cancer 2002;2(8):573-83.
66. Carmeliet P, Collen D. *Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development.* Curr Top Microbiol Immunol 1999;237:133-58.
67. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovith S, Poltorak Z. *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors.* FASEB J 1999;13(1):9-22.
68. Schoch HJ, Fischer S, Marti HH. *Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression causes vascular leakage in the brain.* Brain 2002;125(Pt 11):2549-57.
69. Kosmidou I, Karmpaliotis D, Kirtane AJ, Barron HV, Gibson CM. *Vascular endothelial growth factors in pulmonary edema: an update.* J Thromb Thrombolysis 2008;25(3):259-64.
70. Kroll J, Waltenberger J. *A novel function of VEGF receptor-2 (KDR): rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells.* Biochem Biophys Res Commun 1999;265(3):636-9.
71. Broxmeyer HE, Cooper S, Li ZH, Lu L, Song HY, Kwon BS, Warren RE, Donner DB. *Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor.* Int J Hematol 1995;62(4):203-15.
72. Hattori K, Dias S, Heissing B, Hackett NR, Lyden D, Tateno M et al. *Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells.* J Exp Med 2001;193(9):1005-14.
73. Compernolle V, Brusselmans K, Acker T, Hoet P, et al. *Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice.* Nat Med 2002;8(7):702-10.

74. Sondell M, Lundborg G, Kanje M. *Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system.* J Neurosci 1999;19(14):5731-40.
75. Poesen K, Lambrehts D, Van Damme P, Dhondt J, Bender F, Frank N, Bogaert E, Claes B, Heylen L, Verheyen A, Raes K et al. *Novel role for vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 and its ligand VEGF-B in motor neuron degeneration.* J Neurosci 2008;28(42):10451-9.
76. Ikeda E, Achen MG, Breiler G, Risau W. *Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells.* J Biol Chem 1995;270(34):19761-6.
77. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, Alitalo K. *Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-b in fibroblastic and epithelial cells. Journal of Biological Chemistry 1994;269:6271-74.*
78. Finkenzeller G, Sparacio A, Technau A, Marme D, Siemeister G. *Sp1 recognition sites in the proximal promoter of the human vascular endothelial growth factor gene are essential for platelet-derived growth factor-induced gene expression.* Oncogene 1997; 15(6):669-76.
79. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. *Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor.* J Biol Chem 1996;271(2):736-41.
80. Li J, Perrella MA, Tsai JC, Yet SF, Hsieh CM, Yoshiziumi M, Patterson C, Endege WO, Zhou F, Lee ME. *Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells.* J Biol Chem 1995;270(1):308-12.
81. Soh EY, Sobhi SA, Wong MG, Meng YG, Siperstein AE, Clark OH, Duh QY. *Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines.* Surgery 1996;120(6):944-7.
82. Christenson LK, Stouffer RL. *Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles.* J Clin Endocrinol Metab 1997;82(7):2135-42.
83. Clyman RI, Seidner SR, Kajino H, Roman C, Koch CJ, Ferrara N, Waleh N, Mauray F, Chen YQ, Parkett EA, Quinn T. *VEGF regulates remodeling during permanenet anatomis closure of the ductus arteriosus. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;282(1):R199-206.
84. Wickremasinghe AC, Rogers EE, Piecuhh RE, Johnson BC, Golden S, Moon-Grady AJ, Clyman RI. *Neurodevelopmental outcomes following two different treatment approaches (early ligation and selective ligation) for patent ductus arteiosus. J Pediatr* 2012;161:1065-72..
85. Weber SC, Rheinlaender C, Sarioglu N, Peiser C, Rüdiger M, Obladen M, Koehne P. *The expression of VEGF and its receptors in the human ductus arteriosus.* Pediatr Res 2008;64(4):340-5.
86. Vanaja MC, Rozati R, Nassaruddin K, Vishnupriya S. *Association of VEGF +405G>C polymorphism with endometriosis.* Front Biosci (Elite Ed) 2013;5:748-54.
87. Li A, Gao P, Wang Z, Song Y, Xu Y, Miao Y, Zhuu J, Xu H. *Positive association of the vascular endothelial growth factor-A +405 GG genotype and poor survival in stage I-II gastric cancer in the Northern Chinese population.* Mol Biol Rep 2013;40(3):2741-8.

88. Jain L, Vargo CA, Danesi R, Sissung TM, Price DK, Venzon D, Venitz J, Figg WD. *The role of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) SNPs as Predictive and Prognostic Markers for Major SolidTumors.* Mol Cancer Ther 2009;8(9):2496-2508.
89. Young HS, Summers AM, Bhushan M, Brenchley PE, Griffiths CE. *Single-nucleotide polymorphisms of vascular endothelial growth factor in psoriasis of early onset.* J Invest Dermatol 2004;122(1):209-15.
90. Hiller T. *Praxisphasenarbeit: Etablierung und Optimierung von PCR und RFLP zum Nachweis der VEGF +405 G>C Polymorphismus, 2009*
91. Young HS, et al. *Single nucleotide polymorphism of vascular endothelial growth factor in psoriasis of early onset.* J Invest Dermatol 2004;122:209-215.
92. Seyyfert W. *Lehrbuch der Genetik: Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1998:968-1027.*
93. Sanger F, et al. *DNS sequencing with chain-terminating inhibitors.* Proc Natl Acad Sci U S A 1977;74:5463-5467.
94. Hiller T. *Untersuchung von VEGF Polymorphismen bei sehr unreifen Frühgeborenen mit und ohne persistierenden Ductus arteriosus.* 2010.
95. Jobe AJ. *The new BPD. An arrest of lung development.* Pediatr Res 1999;46(6):641-3.
96. Bancalari E, Abdenour GE, Feller R, Gannon J. *Bronchopulmonary dysplasia: clinical presentation.* J Pediatr 1979;95:819-23.
97. Bell MJ, Ternberg J, Feigin RD, Keating JP, Marshall R, Barton L, Brotherton T. *Neonatal necrotizing enterocolitis. Therapeutic decisions based upon clinical staging.* Ann Surg 1978;187(1):1-7.
98. Resch B, Vollaard E, Maurer U, Haas J, Rosegger H, Muller W. *Risk factors and determinants of neurodevelopmental outcome in cystic periventricular leucomalacia.* Eur J Pediatr 2000;159:663-70.
99. Papile LA, Burstein J, Burstein R, Koffler H. *Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage. A study of infants wirth birth weight less than 1500 grams.* J. Pediatr 1978;92:529-34.
100. Krohne TU. *Frühgeborenenretinopathie.* Der Ophthalmologe 2012;109(12).
101. Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE. *Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production.Cytokine* 2000;12(8):1232-5.
102. Bhat R, Das UG. *Management of panent ductus arteriosus in premature infants. Indian J Pediatr* 2015;82(1):53-60.
103. Hemrick SE, Hansmann G. *Patent ductus arteriosus of the preterm infant. Pediatrics* 2010; 125(5):1020-30..
104. Horbar JD. *The Vermont-Oxford Neonatal Network: itegrating research and clinical practice to improve the quality of medical care.* Seminars in perinatology 1995;19(2):124-31.
105. Rozé JC, Carnbornie G., Marchand-Martin L, Gournay V, Durrmeyer X, Durox M, Strome L, Porcher R, Ankel PY. *Association Between Early Sreening for Patent Ductus Arteriosus and In-Hospital Mortality Among Extremely Preterm Infants.* JAMA 2015;313(24):2441-8.
106. Evans N. *Preterm patent ductus arteriosus: should we treat it J Paediatr Child Health* 2012;48:753-8..
107. Ohlsson A, Walia R, Shan SS. *Ibuprofen for the treatment of patent ductus arteriosus in preterm and/or low birth weight infants. Cochrane Database Syst Rev.2*013;4:CD003481.
108. Waleh N, Barrette AM, Dagle JM, Momany A, Jin C, Hills NK, Shelton EL, Reese J, Clyman RI. *Effects of Advancing Gestation and Non-Caucasian Race on Ductus Arteriosus Gene Expression.* J Pediatr 2015;167(5):1033-1041.

109. Banyasz I, Bokodi G, Vasarhelyi B, Treszl A, Derzbach L, Szabo A, Tulassay T, Vannay A. *Genetic polymorphisms for vascular endothelial growth factor in perinatal complications.* Eur. Cytokine Netw. 2006;17(4):266-70.
110. Attar R, Agachan B, Kuran SB, Toptas B, Eraltan IY, Attar E, Isbir T. *Genetic variants of vascular endothelial growth factor and risk for the development of endometriosis. In Vivo2010;*24(3):297-301.
111. Kwinta P, Bik-Multanowski M, Mitkowska Z, Tomasik T, Pietryzk JJ. *The clinical role of vascular endothelial growth factor (VEGF) system in the pathogenesis of retinopathyof prematurity.* Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2008;246:1467-1475.
112. Bhanoori M, Arvind Babu K, Reddy NGP, Rao LK, Zondervan K, Deenadayal M, Kennedy S. *The vascular endothelial growth factor (VEGF)+405 G>C 5'-untranslated region polymorphism an increased risk of endometriosis in South Indian women: a case control study.* Human Reproduction 2005;20(7):1844-1849.
113. Treszl A, Szabo M, Dunai G, Nobilis A, Kocsis I, Machay T, Tulassay T, Vasarhelyi B. *Angiotensin II type 1 rezeptor A1166C polymorphism and prophylactic indomethacin treatment induced ductus arteiosus closure in very low birth weight neonates.* Pediatr Res. 2003;54(5):753-5.
114. Bhandari V, Zhou G, Bizzarro MJ, Buhimschi C, Hussain N, Gruen JR, Zhang H. *Genetic Contribution to Patent Ductus Arteriosus in the Premature Newborn.* Pediatrics 2009;123(2):669-73.
115. Dagle J, et al. *Determination of genetic predisposition to patent ductus arteriosus in preterm infants. Pediatrics* 2009;123(4):1116-23.
116. Zhu L, Vrancky R, Khau Van Kien P, Lalande A, Biosset N, Mathieu F, Glancy L, Gasc JM, et al. *Mutations in myosin heavy chain 11 cause a syndrome associationg thoracic aortic aneurysm/aoritic dissection and patent ductus arteriosus. Nat. Genet* 2006;38:343-9.
117. Bokodi G, Banyasz I, Tulussay T, Vasarhelyi. *Assiciation of interferon γ T+874 A an d interleukin 12 p40 promoter CTCTAA/GC polymorphism with the need for respiratory support and perinatal complikations in low bithweight neonates.* Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2007;92:F25-F29.
118. Derzbach L, Treszl A, Balogh A, Vasarhelyi B, Tulassay T, Janos Rigo J. *Gender dependent association between perinatal morbidity and estrogen rezeptor-alpha Pvull polymorphism.* J Perinat Med 2005;33(5):461-2.
119. Clyman RI, Seidner SR, Kajino H, Roman C, Koch CJ, Ferrara N, Waleh N, Mauray F, Chen YQ, Perkett EA, Quinn T. *VEGF regulates remodeling during permanent anatomic closure of the ductus arteriosus.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2002;282(1):199-206.
120. Borowicz PP, Arnold DR, Johnson ML, Grazul-Bilska AT, Redmer DA, Reynolds LP. *Placental growth throughout the last two thirds of pregnancy in sheep: vascular development and angiogenic factor expression.* Biol Reprod 2007;76(2):259-67.
121. Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson IV, Harden PN. *Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection.* J Am Soc Nephrol 2002;13(1):260-4.
122. Takahashi H, Shibuya M. *The vascular endothelial growth factor(VEGF)/VEGF receptor system and ints role under physiological and pathological conditions.* Clin Sci (Lond) 2005;109(3):227-41.
123. Weber SC, Gratopp A, Akanbi S, Rheinländer C, Sallmon H, Barikbin P, Koehne PS. *Isolation and culture of fibroblasts, vascular smooth muscle, and endothelial cells from the fetal rat ductus arteriosus.* Pediatr Res 2011;70(3):236-41.

124. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. *Vascular entothelial growth factor induces expression of the antiapoptic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. Nat Med.* 1998;4(3):336-40.
125. Marti HH, Risau W. *Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors.* Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95:15809-14.
126. Michaelis UR, et al. *From endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) to angiogenesis: epoxyeicosatrienoic acids (EETs) and cell signaling.* Pharmacol Ther 2006;111:584-595.
127. Webler AC, Michaelis UR, Popp R,Barbosa-Sicard E, Murugan A, Falck JR, Fissithaler B, Fleming I. *Epoxyeicosatrienoic acids are part of the VEGF-activated signaling cascade leading to angiogenesis.* AM J Physiol Cell Physiol 2008;295(5):C292-301.
128. Fleming I, Michaelis UR, Bredenkötter D, Fisslthaler B, Dehghani F, Brandes RP, Busse R. *Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries.* Circulation research 2001;88(1):44-51.
129. Durrmeyer X, Hoyhannisyan S, Medard Y, Jacqz-Aigrain E, Decobert F, Barre J, Alberti C, Aujard Y, Danan C, Baud O. *Are cytochrome P450 CYP2C8 und CYP2C9 polymorphisms associated with ibuprofen response in very preterm infants?* Plos One 2010;5:e12329.
130. Garcia-Martin E, Martinez C, Tabares B, Frias J, Agundez JA. *Interindividual variability in ibuprofen pharmakokinetics is related to interaction of cytochrome P450 2C8 and 2C9 amino acid polymorphisms.* Clin Pharmacol Ther 2004;76:119-27.
131. Koehne P. *Routinemäßiges Screening auf offenen Ductus arteriosus bei sehr kleinen Frühgeborenen?* Neonatologie Scan, 2015. Springer Verlag, Auflage 4.
132. Irmesi R, Marcialis MA, Anker JV, Fanos V. *Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in the management of patent ductus arteriosus (PDA) in preterm infants and variations in attitude in linical practice:a flight around the world. Curr Med Chem.* 2014;21(27):3132-52.
133. Ohlsson A, Walia R, Shah SS. *Ibuprofen for the treatment of patent ductus arteriosus in preterm or low birth weight (or both) infants.* Cochrane Database Syst Rev 2015;2:CD003481.
134. Lee C, Yang CZ. *Factors affecting succsesful closure of hemodynamically significant patent ductus arteriosus with indomethacin in extremly low birth weight infants.Yonsei Med J.* 2008;49(2):265-71.
135. Hirt D, Van Overmeire B, Treluver JM, Langhendries JP, Marguglio A, Eisinger MJ, Schepens P. Urien S, *An optimized ibuprofen dosing scheme for preterm neonates with patent ductus arteriosus, based on a population pharmacodynamic study.* Br J Clin Pharmacol 2008;65(5):629-36.
136. Rheinlaender C, Helfenstein D, Pees C, Walch E, Czernik C, Obladen M, Koehne P. *Neurodevelopmental outcome after COX inhibitor treatment for patent ductus arteriosus.* Early Hum Dev. 2010;86(2):87-92.
137. Beharry KD, Modanlou HD, Hasan J, Gharraee Z, Abad-Santos S, Sills JH, Jan A, Nageotte S, Aranda JV. *Comparative effects of early postnatal ibuprofen and indomethacin on VEGF, IGF-I, and GH duing rat ocular development.Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(7):3036-43.
138. Ohlsson A, WaliaR., Shah SS. *Ibuprofen for the treatment of patent ductus arteriosus in preterm and/or low birth weight infants.* Cochrane Database Syst Rev 2008;23(1):CD003481.

139. Kalmeh ZA, Azarpira N, Mosallaei M, Hosseini H, Malekpour Z. *Genetic polymorphismus of vascular endothelial growth factor and risk for retinopathy of prematurity in South of Iran. Mol Biol Rep.* 2013;40(7):4613-8..
140. Bhatt AJ, Pryhuber GS, Huyck H, Watkins RH, Matlay LA, Maniscaico WM. *Disrupted pulmonary vasculature and decreased vascular endothelial growth factor, Flt-1, and TIE-2 in human infants dying with bronchopulmonary dsyplasia.* Am J Respir Crit Care Med. 2001;162(10 Pt 1):1971-80.

6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Der fetale Kreislauf ……... 2
Abbildung 2: Darstellung der VEGF-Isoformen ……7
Abbildung 3: Struktur des VEGF-Gens ……. 9
Abbildung 4: Studienpopulation ……..11
Abbildung 5: Schematische Methodenübersicht ……. 12
Abbildung 6: Das Ergebnis der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Kontroll-proben ……..…….……..... 20
Abbildung 7: Das Sequenzierungsdiagramm einer nicht mutierten Probe ……..... 21
Abbildung 8: Das Sequenzierungsdiagramm einer heterozygot mutierten Probe …….. 22
Abbildung 9: Das Sequenzierungsdiagramm einer homozygot mutierten Probe …...….. 22
Abbildung 10: Übersicht zur PDA-Intervention ……...……...….... 26
Abbildung 11: Verteilung des Polymorphismus und Ibuprofentherapieerfolg ……. 27
Abbildung 12: Übersicht zum COX-Hemmer-Therpieerfolg ……... 28
Abbildung 13: Betrachung des Polymorphismus hinsichtlich des Indometacin-Zyklus-bedarfs……..... 31
Abbildung 14: Einfluss des Polymorphismus auf den PDA-Verschlusszeitpunkt …...…... 33
Abbildung 15: Ethnische Zugehörigkeit der Responder und Non-Responder …….. 33
Abbildung 16: Übersicht zur VEGF-Polymorphismus-Verteilung unter den an einer ROP erkrankten Kindern…….....37

7 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Modifizierte Zusammensetzung des PCR-Ansatzes nach Young et al…….. 14

Tabelle 2: Das PCR-Programm …….. 15

Tabelle 3: Zusammensetzung des Verdau-Ansatzes ……...….... 16

Tabelle 4: Programm des Verdaus ……. 16

Tabelle 5: Klinische Patientendaten der Gesamtpopulation und der Gruppen mit und ohne PDA ……..... 24

Tabelle 6: Veteilung des VEGF-Polymorphismus in der Gesamtpopulation und in den Gruppen mit und ohne PDA……...……25

Tabelle 7: Polymorphismus-Verteilung unter den Respondern und Non-Respondern... 27

Tabelle 8: Die klinischen Parameter der Indometacin- und Ibuprofengruppe ……... 29

Tabelle 9: Die klinischen Parameter der Responder und Non-Responder der COX-Hemmer-Therapie ……..…...…...…..30

Tabelle 10: Darstellung des COX-Hemmer Zyklusbedarfs und der Verteilung des VEGF-Polymorphismus……...……..31

Tabelle 11: Verteilung des VEGF-Polymorphismus innerhalb der Gruppen mit primärer oder sekundärer Ligatur ……...……..32

Tabelle 12: VEGF-Polymorphismusverteilung bei Zwillingspaaren ……... 34

Tabelle 13: Zusammenhang von VEGF-Polymorphismus und Auftreten von typischen Frühgeborenenerkrankungen……..36

8 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

„Ich, Tünay Aydin, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Bedeutung des VEGF 405 G>C Polymorphismus beim Ductusverschluss sehr unreifer Frühgeborener “ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE –www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

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

Datum Unterschrift

9 LEBENSLAUF

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

10 PUBLIKATIONSLISTE

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Tünay Aydin hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

1. Bedeutung des CYP2C8*3 Polymorphismus für den medikamentösen Ductusverschluss mit COX-Hemmern bei sehr kleinen Frühgeborenen.
   S Berkmann, S Endesfelder, T Klippstein, C Mayerhofer, T Aydin, C Bührer, P Koehne, Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, 2012, Abstract veröffentlicht in: Monatsschrift Kinderheilkunde, September 2012, Supplement 1, Seite 142.

   Beitrag im Einzelnen:
   Frau Tünay Aydin hat gemeinsam mit Frau Tamara Klippstein retrospektiv die klinischen Daten erhoben, die diesem Kongressbeitrag zugrunde liegen. An der Ausgestaltung des Posters war sie nicht beteiligt. Ihr Anteil des Abstracts beträgt ca. 20%.

2. The role of CYP2C8*3 polymorphism in patent ductus arteriosus and ist treatment with COX-inhibitors in very low birth weight infants.
   S Hort, T Klippstein, T Aydin, C Mayerhofer, A Kubinski, S Endesfelder, C Bührer, P Koehne, Submitted August 2015 to the Journal of Pediatrics.

   Beitrag im Einzelnen:
   Frau Tünay Aydin hat im Wesentlichen die retrospektiven Daten erhoben, die dieser Veröffentlichung zugrunde liegen. Ferner hat Frau Aydin die zur Polymorphismen-analyse notwendige DNA-Isolierung der Patientenproben durchgeführt. An der schriftlichen Abfassung des Manuskripts ist sie nur in geringem Maße beteiligt. Ihr Anteil an der Veröffentlichung beträgt ca. 20%.

Datum Unterschrift der betreuenden Hochschullehrerin

11 DANKSAGUNG

Ich möchte Frau PD Dr. Petra Koehne für die Bereitstellung des interessanten Promotionsthemas herzlich danken. Insbesondere bedanke ich mich für jede erdenkliche, hilfreiche Unterstützung und viele anregende Ratschläge. Jede Phase dieser Arbeit wurde von ihr professionell, warmherzig und intensiv betreut. Sie stand mir mit ihrem Fachwissen zur Seite, opferte für mich viele ihrer freien Abende und wurde mir nicht zuletzt auch durch private Gespräche zu einem wertvollen und freundschaftlichen Wegbegleiter.

Herrn Prof. Dr. Christoph Bührer danke ich herzlich für die freundliche Unterstützung dieser Arbeit.

Stefanie Endesfelder bedanke ich mich für die gute und schnelle Einarbeitung in die Methodik dieser Arbeit. Sie hatte jederzeit ein offenes Ohr für Probleme und Fragen.

Besonderer Dank an Boris Metze für die freundliche und unermüdbare Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Herrn Tulunay möchte ich hier besonders danken für die seelische Unterstützung in allen Lebensbereichen. Hätte er mir nicht den Rücken freigehalten, wäre ein erfolgreicher Abschluss nicht möglich gewesen.

Nicht zuletzt möchte ich mich riesig bei meiner lieben Familie bedanken, die in jeder Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt hat und mich immer unterstützte.