

Aus der Klinik für Neonatologie
der Medizinischen Fakultät Charité Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Bedeutung des COX-2 Polymorphismus beim
Ductusverschluss sehr unreifer Frühgeborener**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christina Helena Bode (geb. Mayerhofer)
aus Wien

Datum der Promotion: 04.03.2022

Vorwort

Teilergebnisse meiner Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht. Für eine detaillierte Anteilserklärung an den jeweiligen Arbeiten verweise ich auf die Anteilserklärung am Ende der Dissertation.

- 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 Bühler, P Koehne, 38. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, 2012, Abstract veröffentlicht in: Monatsschrift Kinderheilkunde, September 2012, Supplement 1, Seite 142.

- Vascular endothelial growth factor polymorphism rs2010963 status does not affect patent ductus arteriosus incidence or cyclooxygenase inhibitor treatment success in preterm infants.

Hannes Sallmon, Tünay Aydin, Stefanie Hort, Anja Kubinski, Christina Bode, Tamara Klippstein, Stefanie Endesfelder, Christoph Bühler, Petra Koehne, Cardiology in the Young, Volume 29, Issue 7, July 2019, pp. 893 – 897. Published online June 2020.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	X
Abstrakt Deutsch	XII
Abstract English	VII
1. Einleitung	1
1.1. Ductus arteriosus Botalli	1
1.1.1. Embryogenese des Ductus arteriosus	1
1.1.2. Der Ductus arteriosus im fetalen Kreislauf	2
1.1.3. Physiologischer postnataler Verschluss des Ductus arteriosus	4
1.2. Persistierender Ductus arteriosus (PDA)	5
1.2.1. Ursachen und Häufigkeit	5
1.2.2. Auswirkungen auf andere Organsysteme und Bedeutung bei FG	6
1.2.3. Diagnostik eines PDA.....	7
1.3. Therapie eines PDA	9
1.3.1. Medikamentöse Therapie	9
1.3.2. Operativer Verschluss	11
1.4. Cyclooxygenase	11
1.4.1. Regulation der Cyclooxygenase-2	13
1.4.2. Bedeutung der COX-2 für Frühgeborene	15
1.4.3. Polymorphismen der COX-2	15
1.5. Fragestellung	16
2. Methoden	18
2.1. Studienpopulation	18
2.2. Outcomeparameter und Folgeerkrankungen Frühgeborener	18
2.3. Durchführung der DNA-Analyse	21
2.4. DNA-Isolierung aus Filterpapierkarten	21
2.4.1. Präparation der DNA-Gewinnung aus Filterpapierkarten	21
2.4.2. Phenol-Chloroform-Extraktion (PCI) und alkoholische Fällung der DNA	21
2.5. Polymerase-Kettenreaktion	22
2.6. Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus	24
2.7. Agarose-Gel-Elektrophorese	24
2.8. Statistik und Datenauswertung	25
3. Materialien	26

3.1. DNA-Isolierung und PCI Extraktion	26
3.2. PCR	26
3.3. Verdau	27
3.4. Gel-Elektrophorese	27
3.5. Verbrauchsmaterialien	27
3.6. Geräte	28
3.7. Software	28
4. Ergebnisse	29
4.1. Studienpopulation	29
4.2. Klinisches Profil Gesamtpopulation	30
4.3. Klinische Profil Studienpopulation mit PDA	31
4.4. Vergleich klinische Parameter und Responderraten	32
4.4.1. Geburtsgewicht, Gestationsalter, Mehrlinge	32
4.4.2. Lungenreifeinduktion und Surfactant	33
4.5. Polymorphismen und COX-2 Untersuchung	34
4.5.1. Allelverteilung innerhalb der Studienpopulation	35
4.5.2. CRIB-Score	36
4.6. PDA Intervention und Therapie	37
4.6.1. Klinisches Profil Therapiedurchführung	37
4.6.2. COX2-Polymorphismen und Verschlusszeitpunkt eines nicht hsPDA	39
4.7. Stationärer Aufenthalt, Beatmungstage und Outcome	40
4.8. Co-Morbiditäten und COX-Polymorphismen	41
4.8.1. Respiratory Distress Syndrome, Bronchopulmonale Dysplasie	41
4.8.2. Intraventrikuläre Hämorrhagie, Periventrikuläre Leukomalazie	42
4.8.3. Retinopathia praematurorum, Nekrotisierende Enterokolitis	42
4.9. Mehrlinge und COX-Polymorphismen	44
4.10. Einfluss der Ethnizität	44
5. Diskussion	45
5.1. Stärken und Schwächen der Arbeit	55
6. Literaturverzeichnis	57
7. Eidesstattliche Versicherung	76
8. Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	77
9. Lebenslauf	79
10. Publikationsliste	79
11. Danksagung	82

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vergleich histologischer Aufbau der Aorta (links) und des DA (rechts) (7).....	2
Abbildung 2: DA in fortgeschrittenem Reifestadium mit Intimakissen. Abb. modifiziert nach (7).....	2
Abbildung 3: Der fetale Kreislauf. Abb. modifiziert nach (8).....	3
Abbildung 4: Einflussfaktoren auf den funktionellen Ductusverschluss. Abb. modifiziert nach (11).....	5
Abbildung 5: Struktur des COX-1 und COX-2 Gens. Die kursiv gedruckten Zahlen bezeichnen die in den Exons enthaltenen Nukleotide. Abb. modifiziert nach (118, 119).....	13
Abbildung 6: Stimuli der Arachidonsäure- und COX-Stoffwechselwege. Abb. modifiziert nach (95).....	14
Abbildung 7: Studienpopulation.....	30
Abbildung 8: Flussdiagramm zur Therapie des PDA innerhalb der Studienpopulation.	32
Abbildung 9: Auftrennung der PCR-Kontrollproben in Agarosegel nach Gelelektrophorese.....	34
Abbildung 10: Verteilung der COX-2 Polymorphismen in Bezug auf Lungenreifeinduktion und Surfactantgaben.....	36
Abbildung 11: Mutationsverteilung des Polymorphismus in Abhängigkeit von den COX-Hemmer-Zyklen.....	38

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	PCR- Ansatz.....	23
Tabelle 2:	Ablauf des PCR Programms.	23
Tabelle 3:	Ansatz für den Verdau.....	24
Tabelle 4:	Vergleich klinischer Parameter und Auftreten eines PDA.	31
Tabelle 5:	Vergleich klinischer Parameter der Responder und Non-Responder. ...	34
Tabelle 6:	Verteilung der COX-2 Polymorphismen in Bezug auf das Auftreten eines PDA.	35
Tabelle 7:	Mutationsverteilung des Polymorphismus in Bezug auf den Therapieverlauf der medikamentösen Therapie mit Indometacin oder Ibuprofen.	39
Tabelle 8:	Verteilung der COX-2 Polymorphismen in Bezug auf den Verschlusszeitpunkt des PDA.	40
Tabelle 9:	Verteilung der COX-2 Polymorphismen in Bezug auf verschiedene Outcome-Parameter.....	43

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
bp	Basenpaar
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
CO ₂	Kohlendioxid
COX	Cyclooxygenase
COX-2	Cyclooxygenase-2
DA	Ductus arteriosus
DASMC	Ductus arteriosus smooth muscle cells
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELBW	Extremely low birth weight
EPC	Eppendorfcup
FG	Frühgeborenes
FO	Foramen ovale
GA	Gestationsalter
HE	Heterozygot
HO	Homozygot
hsPDA	hämodynamisch signifikanter persistierender Ductus arteriosus

ICR	Interkostalraum
IVH	Intraventrikuläre Hämorrhagie
LPS	Lipopolysaccharide
n.s.	nicht signifikant
NEC	Nekrotisierende Enterokolitis
NO	Stickstoffmonoxid
NSAID	Nichtsteroidale Antiphlogistika
NT- proBNP	N-terminales Fragment des pro-BNP
O ₂	Sauerstoff
PCI	Phenolchloroformisoamylalkohol
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDA	Persistierender Ductus arteriosus
PEEP	Positiver endexpiratorischer Druck
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGI ₂	Prostacyclin
Primer F	Vorwärtsprimer
Primer R	Rückwärtsprimer
PVL	Periventrikuläre Leukomalazie
RDS	Atemnotsyndrom
RFLP	Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus
ROP	Frühgeborenenretinopathie
rpm	revolutions per minute
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus

SSW	Schwangerschaftswochen
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
VEGF	Endothelwachstumsfaktor
VLBW	Very low birth weight
WT	Wildtyp

Abstrakt Deutsch

Der Ductus arteriosus (DA) ist eine Gefäßverbindung zwischen Aorta und Truncus pulmonalis und sorgt pränatal für eine Umgehung des Lungenkreislaufs. Postnatal kommt es initial zu einem funktionellen Verschluss. Anschließend erfolgt über Wochen ein Umbau zum Ligamentum arteriosum. Ist der funktionelle Verschluss nach 72 Lebensstunden nicht eingetreten, spricht man von einem persistierenden Ductus arteriosus (PDA). Neben akuten Komplikationen kann ein PDA die Entstehung von Frühgeborenenenerkrankungen begünstigen. Üblicherweise wird ein hämodynamisch signifikanter PDA (hsPDA) medikamentös mit Cyclooxygenase (COX-) Hemmern therapiert. Bei Therapieversagen ist ein chirurgischer Verschluss des PDA möglich. Die Erfolgsrate der medikamentösen COX-Hemmer Therapie liegt bei VLBW-Frühgeborenen bei etwa 70%. Um zwischen Benefit einer Therapie und möglichen Nebenwirkungen zu differenzieren bedarf es einer kontinuierlichen Risiko-Nutzen Abwägung.

Die COX-2 hat eine zentrale Funktion beim Ductusverschluss und in der PDA-Therapie. Sie beeinflusst den intrauterinen, intrinsischen Tonus der Ductuswand, ist essenziell für den postnatalen DA-Verschluss und den medikamentösen Therapieerfolg. Wir haben die Rolle des COX-2 Polymorphismus 765G>C und seine Auswirkungen auf den Ductusverschluss untersucht. Ziel war es zu sehen, ob sein Vorliegen eine erhöhte Inzidenz eines PDA bewirkt, er die Erfolgsrate der medikamentösen COX-Hemmer Therapie oder die Wiedereröffnungsrate nach erfolgreicher medikamentöser PDA-Therapie beeinflusst und ob möglicherweise weitere Zusammenhänge zwischen dem COX-2 Polymorphismus und dem Auftreten von Frühgeborenenenerkrankungen bestehen.

Dazu haben wir Desoxyribonukleinsäure aus Neugeborenen-Screening-Filterkarten extrahiert. Hiernach wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) die DNA amplifiziert und ein möglicher Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) durch Restriktionsenzyme und Gelelektrophorese optisch dargestellt.

Unsere Studienpopulation umfasst 913 VLBW-Frühgeborene und beinhaltet 433 Patienten mit PDA, wovon dieser bei 258 Frühgeborenen hämodynamisch signifikant war. 63,6% der Patienten entsprachen dem Wildtyp, 32,5% der heterozygoten und 3,8% der homozygoten Mutation. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines hsPDA und dem Polymorphismus war nicht nachweisbar. Tendenziell

ließ sich der Wildtyp als positiv in Bezug auf den Therapieerfolg darstellen (Indometacin 73,4%; Ibuprofen 70,5%). Bei der Ibuprofen-Therapie war die Mutationsverteilung in Bezug auf das Reopening ähnlich, die Gesamtzahl der Patienten mit Reopening verglichen mit Indometacin aber geringer (Indometacin: 26,6%; Ibuprofen: 17,9%). Die VLBW-Frühgeborenen mit niedrigerem Geburtsgewicht (743g vs. 847g GG) wiesen etwas häufiger einen hsPDA auf. Ebenso kam es bei diesen Kindern zu einer leicht erhöhten Wiedereröffnungsrate. Im Zusammenhang mit RDS, BPD und IVH scheint es beim Wildtyp zu mildereren Verläufen dieser Erkrankungen zu kommen, bei der ROP und der NEC dürfte die heterozygote Mutation eine leicht protektive Funktion haben. Um diese Tendenzen zu erhärten, wären weitere Untersuchungen zu diesem Thema wünschenswert.

Abstract English

The ductus arteriosus (DA) is a vessel that connects the aorta to the pulmonary trunk. It prenatally circumvents the pulmonary circulation. Postnatally, it closes, becoming the ligamentum arteriosum over several weeks. If functional closure fails within 72 hours postnatally it is called a patent ductus arteriosus (PDA). A PDA gives rise to acute complications and is a risk factor in other diseases of prematurity. Conventionally Cyclooxygenase (COX-) inhibitors are the preferred pharmacological treatment, with the further option of surgical ligation. The success rate of pharmacological PDA therapy in VLBW infants is around 70%. Looking at the possible side-effects of these therapies, continuous consideration of the treatment options is given.

COX-2 plays a key role in the physiological closure of the DA and the pharmacological treatment of a PDA. It influences the intrauterine intrinsic tone of the ductal wall and is essential for postnatal physiological DA closure. We investigated the role of the COX-2 polymorphism 765G>C and its effects on ductal closure to see if the polymorphism increases the incidence of PDA, if there is a connection between COX-2 polymorphism and diseases of prematurity and if the polymorphism influences the reopening of pharmacologically treated PDAs.

This was experimentally investigated by extracting deoxyribonucleic acid from newborn screening filter cards. This DNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and a possible restriction fragment length polymorphism (RFLP) was visualized by restriction enzymes and gel-electrophoresis.

The study population consisted of 913 VLBW preterm infants. This included 433 patients with a PDA, of which it was hemodynamically significant in 258 patients. 63.6% of all the patients corresponded to the wild-type, 32.5% to the heterozygous and 3.8% to the homozygous mutation. A significant correlation between the occurrence of a hsPDA and the polymorphism was not identified. Pharmacological treatment was more frequently successful in the wild-type group (Indometacin 73,4%; Ibuprofen 70,5%). However, the wild-type showed an increased rate of ductal reopening post Ibuprofen therapy, but reopening occurred in fewer patients than after Indometacin therapy. (Indometacin: 26,6%; Ibuprofen: 17,9%). VLBW-infants with lower birth weight (743g vs. 847g GG) were slightly more likely to have a hsPDA and showed a slightly higher reopening rate. With respect to RDS, BPD and IVH, less severe diseases seem to

occur in the wild-type group. Looking at ROP and NEC, the heterozygous mutation is likely to have a slightly protective function. Further research would be desirable to confirm these trends.

1. Einleitung

1.1. Ductus arteriosus Botalli

Benannt ist der Ductus arteriosus Botalli nach Leonardo Botallo, einem italienischen Anatomen, der im 16. Jahrhundert den damals bereits bekannten Ductus arteriosus (DA) lediglich erneut erwähnt hat. Die erste Beschreibung des DA findet man bereits in den Schriften von Galen 131 A.D. Er beschreibt dabei die vorhandene Gefäßverbindung, ohne die weitere funktionelle Bedeutung zu erkennen (1). Die eigentliche Funktion wird erstmals 1628 von Harvey schriftlich erfasst (2). Die histologischen Besonderheiten des DA wurden von Rudolf Virchow erkannt und bieten heute noch die Grundlage vielfältiger Erforschung der Pathophysiologie und Funktion des DA (3).

1.1.1. Embryogenese des Ductus arteriosus

Der DA ist eine Gefäßverbindung im fetalen Kreislauf, die zwischen dem Truncus pulmonalis und dem absteigenden Teil des Aortenbogens (Aorta descendens) besteht. Embryologisch wird der DA aus der linken sechsten Pharyngealbogenarterie gebildet (Abbildung 1). Dieser Ast unterscheidet sich in der Histologie deutlich von den umliegenden rein elastischen großen Arterien, wie Aorta und Truncus pulmonalis (4).

Im DA finden sich eine dicke Tunica media und eine Lamina elastica interna, welche aus bis zu zwei Schichten bestehen kann, sowie eine sehr dünne Intima. Die Tunica media enthält längs- und spiralförmig angeordnete glatte Muskelzellen, wie sie sonst in rein elastischen Arterien nicht zu finden sind. Zudem ist der Gehalt an elastischen Fasern, die die Muskelzellen umgeben im Vergleich zu elastischen Arterien deutlich geringer (Abbildung 1). Ab dem zweiten Trimester der Fetalperiode bilden sich die elastischen Anteile der Lamina interna zurück und es kommt zu einer Proliferation muskulärer Intima-Kissen (5). Diese glatten Muskelzellen verengen das Ductuslumen zunehmend und dienen als Sauerstoffsensor. Zusätzlich bilden sich Endothelzellen für die Synthese vasoaktiver Substanzen (6).

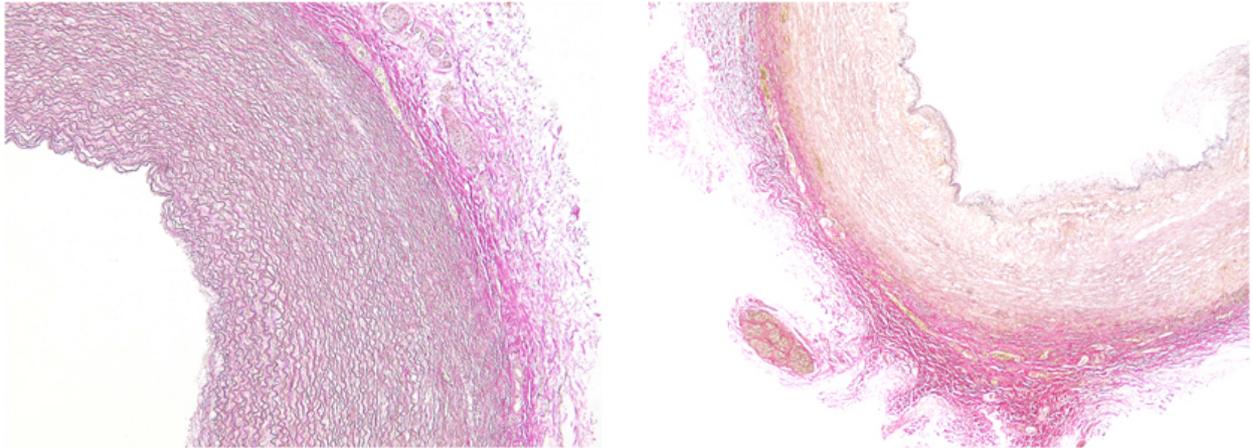


Abbildung 1: Vergleich histologischer Aufbau der Aorta (links) und des DA (rechts) (7).

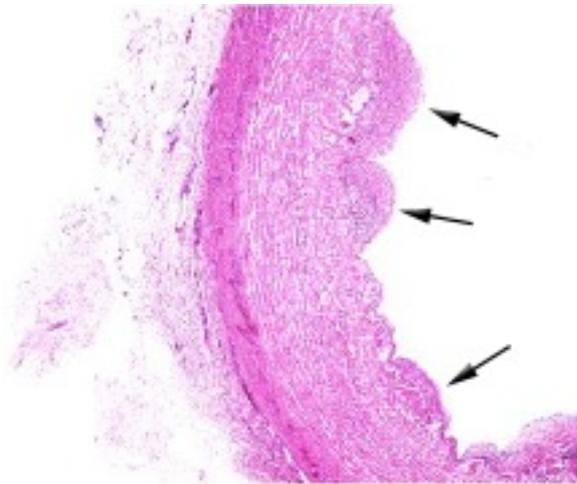


Abbildung 2: DA in fortgeschrittenem Reifestadium mit Intimakissen. Abb. modifiziert nach (7).

1.1.2. Der Ductus arteriosus im fetalen Kreislauf

Intrauterin wird der Fetus mit sauerstoffreichem Blut aus der Placenta versorgt, welches die untere Hohlvene unter Umgehung der Leber durch den Ductus venosus arantii erreicht. Von dort fließt das Blut zum rechten Vorhof weiter. Im rechten Herzen bestehen zwei, für die fetale Zirkulation wichtige Rechts-Links-Shunts. Diese sind das Foramen ovale (FO), welches eine Verbindung zwischen dem rechtem und linken Vorhof darstellt, und der DA. Etwa zwei Drittel des Herzzeitvolumens werden der Aorta direkt in Form von oxygeniertem Blut über das FO zugeführt. Dieses dient vor allem der Versorgung der zerebralen Gefäße und der oberen Extremitäten. Zudem erhält der rechte Vorhof auch das desoxygenierte und kohlenstoffhaltige Blut aus der Vena cava inferior und Vena cava superior. Im rechten Vorhof trifft dabei sauerstoffarmes auf

sauerstoffreiches Blut und fließt über den rechten Ventrikel und den Pulmonalarterienstamm in Richtung des DA. Da die fetale Lunge intrauterin nicht ventilert ist, sind die Lungenalveolen kontrahiert und der Lungenwiderstand ist deutlich erhöht. Lediglich 10% des Auswurfs des rechten Ventrikels passieren die noch nicht funktionsfähige Lunge. Der Rest des Herzzeitvolumens wird über den DA in die Aorta descendens weitergeleitet, wo es sich erneut mit dem sauerstoffreichen Blut der Aorta mischt. Dieses Mischblut versorgt die untere Körperhälfte, bis es über die Arteriae umbilicales in die Placenta geleitet wird, in der eine erneute Sauerstoffanreicherung stattfindet. Nur so ist eine zufriedenstellende Versorgung der fetalen Organe mit Sauerstoff und Nährstoffen gewährleistet.

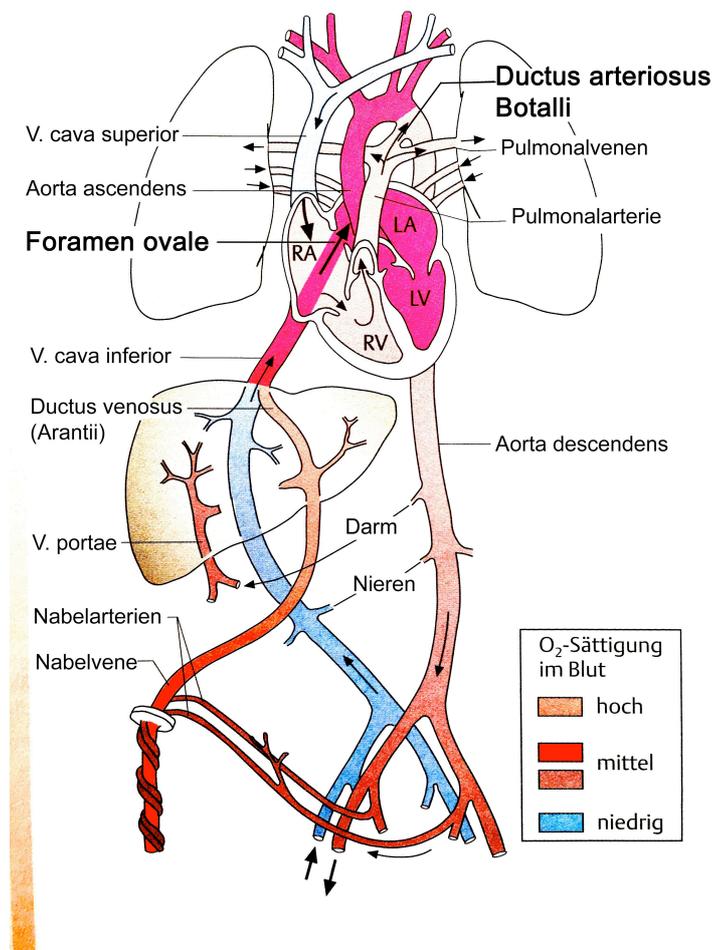


Abbildung 3: Der fetale Kreislauf. Abb. modifiziert nach (8).

1.1.3. Physiologischer postnataler Verschluss des Ductus arteriosus

Das postnatale Abnabeln eines Neugeborenen führt zu einer abrupten Unterbrechung des Plazentakreislaufs und somit der gesamten fetalen Zirkulation. Innerhalb weniger Sekunden steigt dadurch der Kohlendioxidpartialdruck auf bis zu $-80 \text{ cmH}_2\text{O}$ an. Dies wiederum ist der Hauptstimulus für den Atemantrieb des Neugeborenen. Durch die einsetzende Atmung entfaltet sich die Lunge und der pulmonale Widerstand fällt rasch ab, was eine erhöhte Durchblutung der Lunge ermöglicht. Zugleich erhöht sich der systemische Widerstand, was zu einer Abnahme des Rechts-Links-Shunts über den DA und das FO führt. Zusätzlich kommt es zu einer aktiven Konstriktion des DA (9). Ein weiterer Effekt des unterbrochenen Plazentakreislaufs ist der Abfall des Prostaglandin-(PG) und Stickstoffmonoxidspiegels (NO). Vor allem PGE₂ und PGI₂ werden pränatal von der Plazenta gebildet (10). Aufgrund der vermehrten Lungenperfusion steigt der Sauerstoffpartialdruck, wodurch eine höhere Expression vasokonstriktorischer Substanzen wie Endothelin-1 stattfindet. Dieser funktionelle Ductusverschluss erfolgt Innerhalb von 10-72 Stunden postnatal (11).

Darüber hinaus bewirkt der erhöhte Sauerstoffpartialdruck einen gesteigerten intrazellulären Kalziumeinstrom, der zu einer Kontraktion der glatten Muskelzellen in der Tunica media führt. In der weiteren Folge kommt es zu einer lokalen Hypoxie im Bereich der Ductuswand (12). Durch die ischämische Hypoxie erfolgt eine Ausschüttung von Wachstumsfaktoren. Insbesondere dem Transforming Growth Factor- β (TGF- β) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) werden eine wichtige Funktion beim Ductusverschluss zugeordnet (13). Diese Wachstumsfaktoren beschleunigen die Apoptose der glatten Muskelzellen und dadurch die Transformation des DA zum lumenfreien Ligamentum arteriosum. Der anatomische Verschluss des DA ist nach etwa zwei bis drei Wochen postnatal abgeschlossen (10, 14).

Neben den genannten Faktoren scheinen die Thrombozyten im Zusammenhang mit der Entstehung eines PDA eine wesentliche Rolle zu spielen. Während des Ductusverschlusses unterstützen sie den Vorgang in Form eines thrombotischen Verschlusses. In verschiedenen Studien konnte ein kausaler Zusammenhang zwischen niedrigen Thrombozytenzahlen und der Persistenz eines DA jedoch nicht hergestellt werden. Die Rolle von niedrigen Thrombozytenzahlen und deren Auswirkung auf den medikamentösen Therapieerfolg des PDA-Verschlusses mit COX-Hemmern wird weiter diskutiert (15-19).

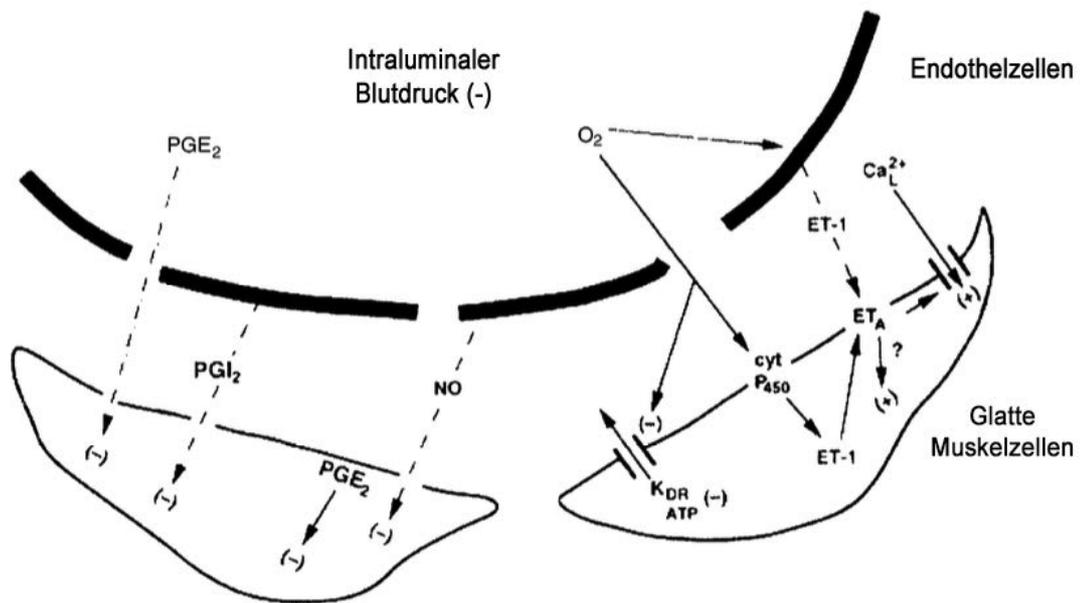


Abbildung 4: Einflussfaktoren auf den funktionellen Ductusverschluss. Abb. modifiziert nach (11).

PGE₂ – Prostaglandin E₂, PGI₂ – Prostaglandin I₂, NO – Stickstoffmonoxid, K_{DR} – spannungsaktivierte Kaliumkanäle, ATP – Adenosin Triphosphat, cyt P₄₅₀ - Cytochrom P450, ET-1 – Endothelin 1, ET_A – Endothelin A

1.2. Persistierender Ductus arteriosus (PDA)

1.2.1. Ursachen und Häufigkeit

Hat der funktionelle Verschluss des DA innerhalb von 72 Lebensstunden nicht stattgefunden, spricht man von einem persistierenden Ductus arteriosus (PDA). Im Vergleich zu Frühgeborenen kommt es bei Reifgeborenen selten zu einer Persistenz des DA (12). Nur bei etwa 0,06% aller reifen Neugeborenen wird PDA diagnostiziert. Die Häufigkeit eines PDA steigt deutlich mit dem Grad der Unreife. So kommt es bei 31% aller VLBW-Frühgeborenen zu einer Persistenz des DA und bei einem GG von unter 1000 g kann bei 50-70% der Patienten ein PDA diagnostiziert werden. Bei etwa 33% der Frühgeborenen unter 1000 g GG kommt es nach 3 Tagen zu einem Spontanverschluss (20). Bei VLBW-Frühgeborenen erfolgt dieser bei einer Mehrzahl der Fälle innerhalb des ersten Lebensjahres. Insgesamt ist der PDA der zweithäufigste angeborene Herzfehler (21).

Für die großen Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens eines DA zwischen Reif- und Frühgeborenen bestehen viele Ursachen (22). Ein wichtiger Punkt ist die verminderte Kontraktilität der DASMCM bei Frühgeborenen (23). Zudem bestehen eine niedrige Sensitivität auf die vasokonstriktorische Sauerstoffwirkung und eine stärkere Reaktion auf Prostaglandine und NO. Bei Frühgeborenen werden häufig erhöhte Prostaglandinspiegel gemessen. Ein geringerer Hypoxiegrad in der Ductuswand und ein verspäteter oder unvollständiger Verschluss des DA sind die Folge (24). Bei nur unzureichender Konstriktion wird außerdem die Funktion der NO-Synthetase erhöht, was wiederum zu einer gesteigerten NO-Produktion führt. Der unreife DA reagiert in all den aufgeführten Punkten deutlich sensibler auf eine unvollständige Konstriktion als der DA eines Reifgeborenen (25).

Der DA wird bei Reifgeborenen sowohl über Diffusion durch das Ductuslumen im avaskulären luminalen Bereich als auch über speziell gebildete Vasa vasorum in der äußeren Ductuswand versorgt. Im Rahmen der Konstriktion wird die Blutversorgung durch die Vasa vasorum unterbunden und die gesamte Wanddicke von 1-1,2 mm wird nicht mehr versorgt (14). Dies begünstigt die weiteren hypoxiebedingten Prozesse der Obliteration. Bei Frühgeborenen der 24. SSW beträgt die gesamte Wanddicke nur 200 µm. Die wenigen Vasa vasorum liegen in der Tunica adventitia. Die Diffusion durch den Blutfluss im Ductuslumen reicht aus, um die Ductuswand mit Sauerstoff zu versorgen (26). Eine komplett avaskuläre Zone kann daher nur durch vollständige Konstriktion der Ductuswand erreicht werden (27).

Nach unvollständigem anatomischen Ductusverschluss kommt es besonders bei Frühgeborenen häufig zu einer Wiedereröffnung des DA im Rahmen systemischer Infektionen. Dieses Phänomen lässt sich durch die hohe Sensitivität für Prostaglandine und erhöhte Serumspiegel proinflammatorischer Zytokine bei Infektionen erklären. Zudem ist ein gehäuftes Auftreten von BPD nach Wiedereröffnung eines PDA bei Frühgeborenen zu beobachten (28-31).

1.2.2. Auswirkungen auf andere Organsysteme und Bedeutung bei FG

Rein statistisch gesehen geht der hämodynamisch signifikante PDA (hsPDA) bei Frühgeborenen, einer Risikogruppe mit ohnehin erhöhter Mortalität, mit Folgeerkrankungen und einer daraus resultierenden erhöhten Mortalität einher. Kausale Zusammenhänge zwischen der hämodynamischen Relevanz und verschiedenen

Folgeerkrankungen konnten aufgezeigt werden, eine beweisende Datenlage gibt es hierfür jedoch nicht (32-35).

Physiologisch kommt es nach Sistieren des fetalen Kreislaufs zu einer Shuntumkehr. Ein häufiges Problem bei Frühgeborenen ist das sogenannte Respiratory Distress Syndrome (RDS), welches aufgrund eines Surfactant-Mangels mit einem erhöhten pulmonalen Widerstand einhergeht. Dies begünstigt einen bidirektionalen, manchmal auch einen Rechts-Links-Shunt über den PDA. Nach erfolgreicher Therapie des RDS kommt es durch den sinkenden Lungenwiderstand zu einer erneuten Druckumkehr und es ergibt sich ein Links-Rechts-Shunt über den PDA (36). Bei gesteigerter Perfusion wird der Lymphabfluss der Lunge kompensatorisch hochreguliert. Dies funktioniert jedoch nur wenige Tage. Im Rahmen längerfristiger Volumenbelastung kann es zu einem Lungenödem kommen, welches wiederum einen deutlich erschwerten Gasaustausch mit sich bringt (14, 37). Daraus resultiert eine längere und intensivere Beatmung mit hohen Spitzendrücken und höherem Sauerstoffbedarf. Auch die Entwöhnung von der Beatmung kann dadurch verzögert werden. Infolgedessen kann es zu irreversiblen Lungenschäden in Form einer Bronchopulmonalen Dysplasie (BPD) kommen (38, 39).

Die Auswirkungen des PDA stehen in direktem Zusammenhang mit dem Shuntvolumen. Sollte das Shuntvolumen 50% des linksventrikulären Auswurfs übersteigen, kann es zu einer Erniedrigung des systemischen Druckes kommen. Dieses Phänomen wird „ductal steal“ genannt und beschreibt eine Minderperfusion nachgeschalteter Gefäße und konsekutiv minderperfundierte Organe in der Diastole (40). So kann es bei schwankenden mittleren arteriellen Blutdrücken zu intraventrikulären Hämorrhagien (IHVs) und periventrikulärer Leukomalazie (PVL) kommen. Eine lokale Ischämie im Bereich der Mesenterialgefäße kann die Entstehung einer nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) begünstigen. Bei Minderperfusion der renalen Gefäße wird Oligo- oder sogar Anurie beobachtet (32, 34, 41-43).

1.2.3. Diagnostik eines PDA

Die hämodynamischen Auswirkungen eines PDA zeigen sich meist durch klinische Zeichen. Diese Symptome sind für den PDA spezifisch, jedoch nur wenig sensitiv. Zu diesen gehören ein kontinuierlich hörbares Maschinengeräusch über dem zweiten Interkostalraum (ICR) links parasternal, hochamplitudige und kräftige periphere Pulse

(Pulsus celer et altus), ein hyperaktives Präkordium am linken oberen Sternalrand sowie arterielle Hypotonie. Zusätzliche Symptome wie Tachykardie, Tachypnoe und eine ausbleibende Besserung der Beatmungssituation, beziehungsweise Unmöglichkeit der Entwöhnung von der Beatmung gelten als sensitive, wenn auch unspezifische Kriterien (44, 45). Besonders bei sehr unreifen Frühgeborenen sind diese klinischen Hinweise sehr unspezifisch. In einzelnen Fällen können die klinischen Symptome trotz echokardiographischem Nachweis eines PDA gänzlich fehlen. Man spricht dann von einem „silenten Ductus“ (46, 47). Mit dem Bestreben eine objektive Diagnostik zu gewährleisten, werden daher noch andere Untersuchungen miteinbezogen.

Ein wichtiger Teil der Diagnostik ist die Echokardiographie. Dabei werden verschiedene Parameter wie der Durchmesser des Ductus, das Verhältnis vom linken Vorhof zur Aortenwurzel (LA/Ao-Ratio), das Schlagvolumen des linken Ventrikels und die diastolische postduktale Flussrichtung in der Aorta descendens beurteilt. Auch der Fluss in der oberen Hohlvene und ein möglicher diastolischer Flussverlust in den mesenterialen, cerebralen oder renalen Arterien in B-Mode und Farbdopplertechnik werden begutachtet. Eine klare Festlegung der Normwerte und eine dementsprechend einheitliche Definition des hsPDA gibt es jedoch bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht (48-52).

Ein weiterer Bestandteil der PDA-Diagnostik ist die Röntgenaufnahme des Thorax. Dabei wäre eine vergrößerte Herzsilhouette mit prominentem linkem Vorhof und linkem Ventrikel und gegebenenfalls ein Lungenödem zu sehen, welche eine hämodynamische Relevanz unterstreichen würden (53).

Laborchemisch kann die Bestimmung des brain-type natriuretischen Peptids (BNP), vor allem die seines N-terminalen Fragments (NT-proBNP) im Serum Auskunft über die kardiale Volumenbelastung des rechten Herzens geben. Bei beiden Parametern konnte in Studien eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität auch bei Frühgeborenen nachgewiesen werden, sodass diese biochemischen Marker eine zunehmende Bedeutung als Verlaufparameter und bei der Einschätzung des Behandlungsbedarfs eines PDA gewinnen (54-57).

1.3. Therapie eines PDA

Präventiv wird versucht einer Persistenz des DA mit Hilfe von frühzeitiger Surfactantsubstitution zur Behandlung eines RDS, effektiver Behandlung von Infektionen, adaptierter Beatmungsformen mit verkürzter Inspirationszeit und erhöhtem PEEP und Flüssigkeitsrestriktion entgegenzusteuern (58). Bei 60-80% aller Frühgeborenen unter 28 SSW wird dennoch eine weitere Therapie des PDA im Verlauf notwendig (59).

1.3.1. Medikamentöse Therapie

Die medikamentöse Therapie des PDA wird seit den 1970er Jahren mit nicht-steroidalen Antiphlogistika, also nicht-selektiven Inhibitoren der Cyclooxygenase-1 (COX-1) und Cyclooxygenase-2 (COX-2), durchgeführt (60, 61). In einigen Studien wird die Verwendung von Paracetamol, einem vorwiegend selektiven COX-2 Hemmer, untersucht. Da die Prostaglandine einen wichtigen Anteil in der Aufrechterhaltung des PDA haben, liegt das Hauptaugenmerk der medikamentösen Therapie auf der Hemmung von COX-1 und COX-2, welche den Arachidonsäurestoffwechsel und folglich die Umwandlung in deren Derivate Prostaglandine und Leukotriene hemmen sollen.

Indometacin

In Deutschland wird Indometacin seit 1976 in Form eines off-label-Gebrauchs eingesetzt (60, 61). Bis in die 1990er Jahre war es das Medikament der ersten Wahl und in unterschiedlichen Dosierungsregimen intravenös im Einsatz. Die Wirksamkeit des Medikaments zum Ductusverschluss wurde in zahlreichen Studien belegt. Die Erfolgsrate einer Indometacintherapie liegt bei 70-90% (62, 63). Bei eskalierter Hochdosistherapie wird sogar eine Erfolgsrate von 98,5% beschrieben (64). Mit niedrigerem GA scheint jedoch die Wirksamkeit auf den PDA abzunehmen, sodass bei einem GA unter 26 SSW weniger als 60% der behandelten Patienten auf die Therapie ansprechen. Ein weiterer Faktor für eine erfolgreiche Therapie scheint der Behandlungsbeginn innerhalb der ersten zehn Lebenstage zu sein. Ein gehäuftes Therapieversagen bei späterem Beginn wurde beobachtet (65). Des Weiteren ist eine Wiedereröffnungsrate des PDA von etwa 20% zu beobachten. In diesem Fall kann ein erneuter Therapieversuch durchgeführt werden, welcher meist jedoch weniger wirksam ist (66). Eine konkrete Empfehlung bezüglich der Dosierung und Therapiedauer existiert nicht. Ungeachtet der hohen Wirksamkeit beinhaltet die Therapie mit Indometacin ein breites Spektrum an Nebenwirkungen aufgrund einer möglichen Minderdurchblutung

der mesenterialen, cerebralen und renalen Arterien (67). Im Gegensatz zu den früher verabreichten Bolusgaben scheinen kontinuierliche Gaben die mesenteriale, cerebrale und renale Perfusion nicht wesentlich zu reduzieren. Die Wirkung auf den PDA-Verschluss ist dabei jedoch noch nicht endgültig geklärt (68, 69).

Ibuprofen

Seit 1995 wird die Verwendung von intravenösem Ibuprofen zur Therapie des PDA untersucht (70). Aufgrund seines geringeren Nebenwirkungsprofils und der offiziellen Zulassung bei Frühgeborenen unter 34 SSW seit 2004 wird es seither vorwiegend verwendet. Mehrfache Studien haben eine vergleichbare Effizienz wie bei der Behandlung mit Indometacin aufgezeigt (71, 72). Die Therapiedauer ist mit 72 Stunden festgelegt. Auch hierbei kann ein zweiter Therapiezyklus versucht werden, der jedoch mit niedrigeren Erfolgsraten einhergeht (73). Bei intensivierter Hochdosistherapie (Üblicherweise: 10 – 5 – 5 mg/kg KG i.v, Studiendosis: 20 – 10 – 10 mg/kg KG i.v.) wurde ein Therapieerfolg von 86% beobachtet. Trotz erhöhter Dosierungen kam es zu keinem vermehrten Auftreten von Nebenwirkungen (74). Ibuprofen beeinflusst die arterielle Perfusion der Organe deutlich weniger als Indometacin und hat im Bereich der cerebralen Durchblutung sogar einen protektiven Effekt in Bezug auf das Auftreten von intracerebralen Blutungen (67). Ein im Gegensatz zu Indometacin geringeres Risiko für das Entstehen einer NEC und ein seltenerer Anstieg des Serum-Kreatinins konnten in mehreren Studien beobachtet werden (75). Eine prophylaktische Therapie unter 24 Lebensstunden soll bei erhöhtem Risiko für das Auftreten einer pulmonalen Hypertension nicht erfolgen (76, 77).

Seit wenigen Jahren erfolgt außerdem die orale Gabe von Ibuprofen zum Ductusverschluss. Bisher zeigt sich eine höhere Verschlussrate bei einem gleichbleibenden bis geringeren Anteil gastrointestinaler Nebenwirkungen (78-80). Aktuell liegt noch keine offizielle Zulassung zur Therapie vor.

Paracetamol

Klinische Verwendung findet die Therapie mit Paracetamol meist im off-label-Gebrauch versuchsweise nach Therapieversagen der First-Line Präparate Ibuprofen oder Indometacin. Das Nebenwirkungsspektrum von Paracetamol ist deutlich geringer. Eine Verbesserung der echokardiographischen Parameter konnte beobachtet und die Rate an operativen Ligaturen um etwa 50% verringert werden. Die Studienlage zur klinischen

Anwendung ist noch nicht eindeutig. Die Wirksamkeit von Paracetamol beim PDA-Verschluss wird jedoch zunehmend als vergleichbar zu Ibuprofen oder Indometacin beschrieben (81-85). Der Wirkmechanismus ist dabei noch nicht abschließend geklärt. Die schwach hemmende Wirkung auf COX-3, ein Isoenzym, welches als eine Splice-Variante der COX-1 beschrieben wird, scheint die Wirkspektren von Paracetamol nicht eindeutig zu erklären (86).

1.3.2. Operativer Verschluss

Die interventionelle Ductusligatur fand bereits viele Jahre vor der erstmaligen Durchführung einer medikamentösen Therapie statt (60). Der operative Eingriff wird mittlerweile nur noch als Therapie der zweiten Wahl bei Versagen der medikamentösen Therapie oder bei absoluten Kontraindikationen gegenüber dem Einsatz von Ibuprofen oder Indometacin durchgeführt. Neben allgemeinen Operationsrisiken spielen vor allem die Parese des Nervus laryngeus recurrens, eine linksseitige Parese des Nervus phrenicus, Pneumothoraces, Thoraxdeformitäten, Chylothoraces sowie das gehäufte Auftreten der Frühgeborenenretinopathie oder BPD eine Rolle (87). Längerfristig wurde in aktuellen Studien ein schlechteres entwicklungsneurologisches Outcome von ehemals ductusligierten Frühgeborenen im Alter von 18 Monaten beschrieben (88). Die möglicherweise komplikationsärmere Durchführung mittels video-assistierter Thorakoskopie wird zum aktuellen Zeitpunkt noch untersucht und findet vor allem bei größeren Frühgeborenen vereinzelt Anwendung (89).

1.4. Cyclooxygenase

Seit der Entdeckung der Acetylsalicylsäure (ASS) im Jahr 1897 werden Aspirin und „Aspirin-like-drugs“ als Analgetika, Antipyretika und Antiphlogistika eingesetzt (90, 91). 1971 wurde die Hemmung der Prostaglandinbiosynthese durch NSAIDs von Vane beschrieben. 1976 konnte erstmals das Enzym Cyclooxygenase-1 aus der Bläschendrüse eines Bullen isoliert werden, wenig später auch von Schafen. Erst 1989 wurde die Isoform der Cyclooxygenase-2 entdeckt (92-95).

Cyclooxygenasen katalysieren die ersten beiden Schritte der Prostaglandinsynthese. Sie sind verantwortlich für die Konversion der Arachidonsäure über Prostaglandin G_2 zu Prostaglandin H_2 (PGH_2) (96-99). PGH_2 dient als Substrat für fünf Prostaglandinsynthasen, die daraus die biologisch aktiven Prostanoiden Prostaglandin

D₂ (PGD₂), E₂ (PGE₂), F_{2α} (PGF_{2α}), I₂ (PGI₂) und Thromboxan A₂ (TXA₂) bilden (100). Diese können als auto- oder parakrine Botenstoffe an G-Protein gekoppelte Prostaglandinrezeptoren binden (101, 102). Die Subform des EP₄-Rezeptors ist fast ausschließlich im DA zu finden. Die Familie der Cyclooxygenasen besteht aus zwei Isoformen, COX-1 und COX-2. Beide Isoformen werden in allen Vertebraten gefunden und stimmen in 70-95% der Aminosäuren überein. Die Cyclooxygenasen bestehen aus 600 Aminosäuren und haben eine ähnliche Primärstruktur. Nach dem Signalpeptid enthält der N-Terminus des Proteins ein epidermales Wachstumsfaktor-Modul (EGF) mit konservierten Disulfidbrücken, welche als Dimerisierungsbereiche agieren. Des Weiteren gibt es eine Serie von 4 amphipatischen Helices, welche das Protein an einer Stelle in der Membran verankern. Beide Cyclooxygenasen befinden sich üblicherweise auf der luminalen Membranseite des endoplasmatischen Retikulums. COX-2 wird ebenfalls in der perinukleären Hülle gefunden. In Einzelfällen konnten sie außerdem in Fettzellen, Mitochondrien, im Zellkern und vesikulären Strukturen nachgewiesen werden (103). Zudem wird von COX-1b berichtet, einer Spleißvariante von COX-1, welcher jedoch keine funktionsfähige Translation beim Menschen zugeschrieben wird (104). Eine weitere Variante der Cyclooxygenasen ist COX-3 (105). Sie wird als Unterform von COX-1 betrachtet. Der einzige Unterschied zur COX-1 liegt in einem beibehaltenen Intron bei der COX-3. Diese Form ist besonders im Zusammenhang mit dem Wirkmechanismus von Paracetamol von Bedeutung.

Cyclooxygenase-1

COX-1 ist ein konstitutiv exprimiertes Enzym und kommt in fast allen Gewebearten vor. Hauptsächlich kann es im Gastrointestinaltrakt, in den Nieren und Thrombozyten nachgewiesen werden (92, 106). Durch die protektiven Prostaglandine ist das Enzym mitverantwortlich für die Homöostase in diesen Organen und eine regelrechte Blutgerinnung (107). Aufgrund dieser Funktionen ist COX-1 jedoch auch hauptverantwortlich für die häufigsten Nebenwirkungen von NSAIDs (108). Lokalisiert ist das COX-1 Gen auf Chromosom 9q32-q33.3. Die Kodierungsregion besteht aus elf Exons und zehn Introns, welche 22 kbp (Kilo-Basenpaare) umfassen (95).

Cyclooxygenase-2

COX-2 spielt eine Schlüsselrolle bei Entzündungen und ist besonders in akut oder chronisch entzündlichem oder vorgeschädigtem Gewebe induzierbar, auch wenn eine niedrige Konzentration in anderen Gewebearten unter normalen Bedingungen

vorhanden sein kann. Besonders in Gehirn, Nieren, Pankreas, Uterus, Ovarien und Makrophagen konnte eine solche „Grundkonzentration“ dargestellt werden (102). Sie wird durch Zytokine, Lipopolysaccharide, Wachstumsfaktoren und mechanische Reize induziert und produziert Prostaglandine, welche Entzündungs- und Schmerzreaktionen verstärken und aufrecht erhalten (92, 108). Im Gegensatz zu COX-1 umfasst die genomische Struktur von COX-2 nur 8,3 kbp, was auf eine geringere Größe der Introns zurückzuführen ist. Die genaue Struktur der beiden COX-Varianten ist in Abbildung 5 dargestellt. Das COX-2 Gen liegt auf Chromosom 1q25.2-q25.3 (95, 109). Auch im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer (109-112) sowie bei verschiedenen Karzinomen und Metastasierungskaskaden (z.B. Kolorektales-, Bronchial-, Mamma- und Prostatakarzinom) tritt COX-2 verstärkt auf (113-117).

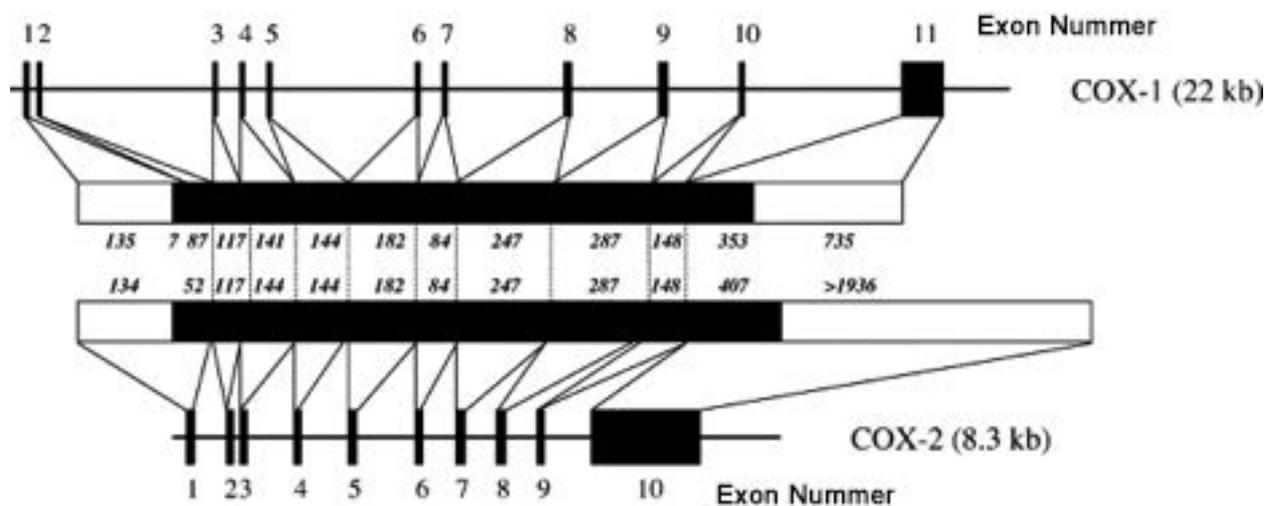


Abbildung 5: Struktur des COX-1 und COX-2 Gens. Die kursiv gedruckten Zahlen bezeichnen die in den Exons enthaltenen Nukleotide. Abb. modifiziert nach (118, 119).

1.4.1. Regulation der Cyclooxygenase-2

Die Expression von COX-2 unterliegt einer aktiven Induktion durch andere Botenstoffe, Entzündungsmediatoren und Onkogene, wie in Abbildung 6 dargestellt. Einige wichtige Vertreter sind Lipopolysaccharide, Interleukin-1, Tumornekrosefaktor- α , epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), synaptische Aktivität, transformierender Wachstumsfaktor- α

(TGF- α), humanes Choriongonadotropin (HCG), Interferon- γ (IF- γ), Thrombozyten aktivierender Faktor (120), Retinsäuren und Endothelin (95, 97, 121).

Glukokortikoide wie Dexamethason können die Expression der COX-2 selektiv inhibieren, ohne COX-1 dabei zu beeinflussen (92, 122). Des Weiteren wurde eine Wechselbeziehung zwischen NO und COX beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass Peroxynitrit, ein aus NO und O₂ gebildetes Oxidans, mit der Cyclooxygenase reagiert und dadurch die Prostaglandinsynthese aktiviert. Bei niedrigerer Peroxynitritkonzentration konnte eine verminderte Prostaglandinsynthese nachgewiesen werden, sodass ein reduzierter gefäßmodulierender Effekt erzielt wurde (123, 124). Ebenso konnte ein Feedback-Mechanismus zwischen NO und COX gezeigt werden (125, 126). Bei einer Deletion der Cyclooxygenase, unabhängig von der Isoform, kam es zu einer Hochregulation der NO-Synthase (127).

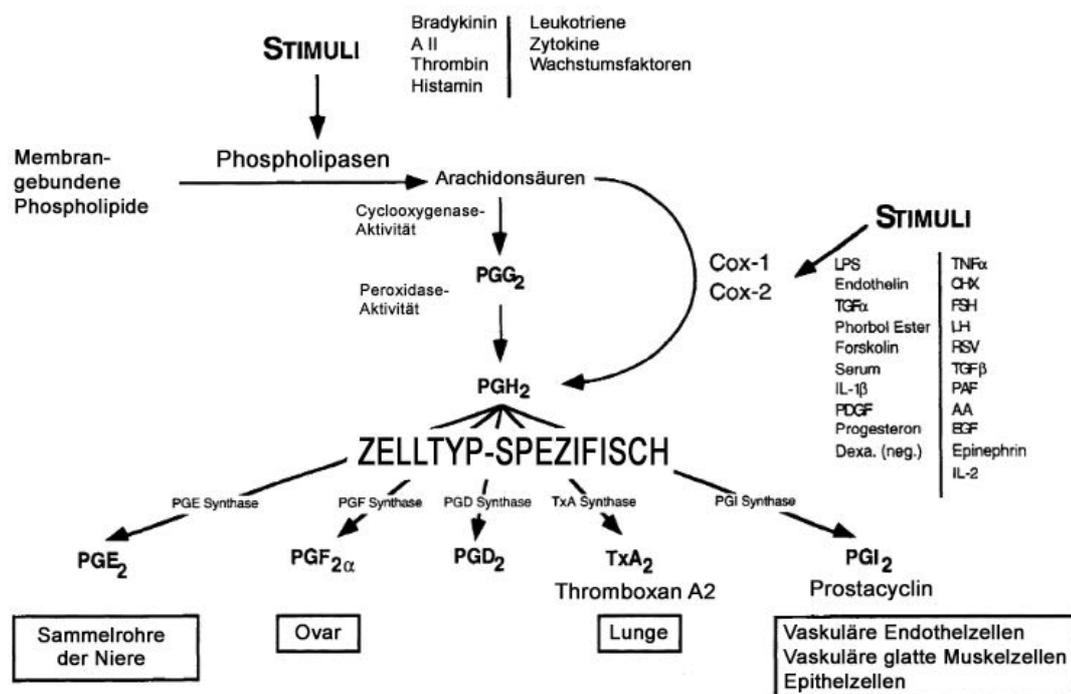


Abbildung 6: Stimuli der Arachidonsäure- und COX-Stoffwechselwege. Abb. modifiziert nach (95).

A II – Angiotensin II, LPS – Lipopolysaccharide, TGF α – transformierender Wachstumsfaktor α , TGF β – transformierender Wachstumsfaktor β , IL-1 β – Interleukin 1 β , PDGF – Wachstumsfaktor aus Thrombozyten („Platelet-derived growth factor), Dexamethason, TNF α – Tumornekrosefaktor- α , CHX – Cycloheximid, FSH – Follikelstimulierendes Hormon, LH – Luteinisierendes Hormon, RSV – Rous-Sarkom-Virus, PAF- Plättchenaktivierender Faktor, AA – Arachidonsäure, EGF – epidermaler Wachstumsfaktor, IL-2 – Interleukin-2, PG – Prostaglandin, TX – Thromboxan

1.4.2. Bedeutung der COX-2 für Frühgeborene

Intrauterin hat der Ductus Arteriosus (DA) einen intrinsischen Tonus, der vorwiegend über die Vasodilatation durch NO und Prostaglandine bedingt wird. In mehreren Studien konnten in allen Ductusregionen Frühgeborener mit einem Gestationsalter (GA) von weniger als 38 Schwangerschaftswochen (SSW) sowohl COX-1 als auch COX-2 nachgewiesen werden, wobei COX-2 deutlich geringer vorhanden war (108, 128). In der Expression des EP₄-Rezeptors, welcher mit PGE₂ interagiert, konnte ein leichter Anstieg im Fortschreiten der Fetalperiode gezeigt werden (129). Postnatal kommt es zu einem Anstieg der COX-2 durch erhöhten Sauerstoffpartialdruck (130). Bei reifgeborenen Mäusen wurde drei Stunden postnatal eine signifikante Induktion der COX-2 Expression beobachtet. Auch bei reifgeborenen Ferkeln konnte ein 7-fach erhöhtes COX-2 Level gemessen werden (131). Frühgeborene Mäuse hatten dagegen eine deutlich geringere COX-2 Expression, was die Wahrscheinlichkeit eines PDA erhöht (21).

Einen weiteren wichtigen Stellenwert hat die COX-2 beim verspäteten Ductusverschluss im Rahmen von Infektionen. Die Wiedereröffnung eines bereits verschlossenen PDA wird ebenso mit schweren Infektionen in Zusammenhang gebracht (31, 132). Mehrere Studien haben eine signifikante Verbindung zwischen Chorionamnionitis und PDA hergestellt (133, 134). Es konnte jedoch in einer aktuellen Studie histologisch kein direkter Zusammenhang zwischen einer Erhöhung der Lipopolysaccharide (LPS) und einer Erhöhung der COX-2 beim Ductusverschluss gezeigt werden. Unter der Applikation von LPS kam es vielmehr zu einem Anstieg von TNF- α und der NO-Synthase, vor allem bei Frühgeborenen (135).

In retinalen Müller- und Endothelzellen wurde eine Erhöhung der COX-2 Aktivität und somit der PGE₂ durch NO dargestellt (136). Der folgende Hypoxie-induzierte Anstieg von VEGF führt zu einer Steigerung der retinalen Angiogenese und spielt somit eine wichtige Rolle in der Entstehung der Retinopathia praematurorum (ROP) (137-139).

1.4.3. Polymorphismen der COX-2

Der 765G>C Polymorphismus ist einer von vielen Polymorphismen im Gen der Cyclooxygenase-2. Es handelt sich um einen Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP), der sich in der Promoterregion der COX-2 befindet und stellt einen Austausch der

Basen Cytosin durch Guanin an der Position 765 dar. Er beeinflusst dadurch die Funktionalität des Gens (140).

Der 765G>C Polymorphismus wurde wiederholt im Zusammenhang mit unterschiedlichen Malignomen untersucht. Er scheint unter anderem eine protektive Wirkung auf die Entwicklung von Morbus Alzheimer und Morbus Crohn im Bereich der kaukasischen Bevölkerung zu haben (141, 142). Für Allelträger scheint der Polymorphismus das Risiko für Tumore im gastrointestinalen Bereich vor allem bei der asiatischen Bevölkerung zu erhöhen. Bei Bronchialkarzinomen wird er ebenfalls als Risikofaktor beschrieben. Ein endgültiger Zusammenhang wird jedoch weiter diskutiert (143-145).

1.5. Fragestellung

Bei VLBW-Frühgeborenen (<1500 g GG) kommt es in etwa 50 % der Fälle zu einer Persistenz des Ductus arteriosus. Bei hämodynamischer Relevanz und dem erhöhten Risiko der möglicherweise daraus resultierenden Frühgeborenenenerkrankungen wie NEC, IVH, ROP, PVL und BPD wird versucht, den PDA mittels medikamentöser Therapie durch COX-2 Inhibitoren zu verschließen. Auch wenn ein kausaler Zusammenhang zwischen einem PDA und eben genannten Folgeerkrankungen nicht bewiesen werden konnte, versucht man aufgrund der möglichen Korrelation mit einer adäquaten Ductustherapie das längerfristige Outcome der VLBW-Frühgeborenen zu verbessern.

Leider ist die Erfolgsrate der medikamentösen COX-Hemmer Therapie nicht immer befriedigend und liegt bei VLBW-Frühgeborenen bei bis zu 70% und bei den noch unreiferen ELBW-Frühgeborenen nur um die 60% (146-148). Daher ist die Verbesserung der zur Verfügung stehenden Therapieoptionen von großem Interesse. Ein möglicher Baustein zur Therapieoptimierung ist das bessere Verständnis der Funktion der Cyclooxygenase-2, die eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie des PDA zu spielen scheint. So beeinflusst die COX-2 den intrauterinen, intrinsischen Tonus der Ductuswand, ist mit-ausschlaggebend für den postnatalen Verschluss und bestimmt die medikamentöse Therapie des PDA mit COX-2 Inhibitoren. Auch ein Zusammenhang zwischen verspätetem Ductusverschluss oder Wiedereröffnung bei

schweren Infektionen ist möglich. Welche Auswirkungen eine genomische Veränderung der COX-2 auf die Inzidenz und den Therapieerfolg eines PDA hat ist bisher unklar.

Daher soll in dieser Dissertation der Einfluss des COX-2 Polymorphismus 765G>C auf den medikamentösen Ductustherapieerfolg bei VLBW-Frühgeborenen untersucht werden. Dazu wurde bei 913 VLBW-Kindern eine Genanalyse durchgeführt, mit der folgende Fragen beantwortet werden sollen:

- Beeinflusst der COX-2 Polymorphismus die Inzidenz eines PDA bei VLBW-Frühgeborenen?
- Beeinflusst der COX-2 Polymorphismus den Therapieerfolg?
- Hat der COX-2 Polymorphismus Einfluss auf die Wiedereröffnungsrate des PDA?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem COX-2 Polymorphismus und anderen Frühgeborenenenerkrankungen?

2. Methoden

2.1. Studienpopulation

In die Studie miteingeschlossen sind 1053 VLBW-Kinder, welche an der Charité zwischen 1995 und 2008 geboren wurden. Die Auswahl dieser Patientengruppe beinhaltet sowohl Kinder mit als auch ohne PDA. Bei all diesen Patienten wurde am zweiten Lebenstag im Rahmen des Neugeborenen-Screenings Kapillarblut aus der Ferse oder venöses Blut bei einer Laborkontrolle abgenommen, auf eine Guthrie-Filterkarte getropft und im Einverständnis mit den Eltern für Forschungszwecke asserviert. Das notwendige Einverständnis der Ethikkommission der Charité (Reg. No. EA2/051/09) wurde erbracht. Die klinische Datensammlung entstand aus archivierten Patientenakten. Eine daraus erstellte digitale Datei blieb bis zum Ende der Auswertung unzugänglich, sodass eine verblindete Bearbeitung der Proben gewährleistet werden konnte. Insbesondere bei Patienten aus früheren Jahrgängen waren die klinischen Daten oder Blutproben teilweise nicht mehr vollständig und auch retrospektiv nicht mehr zu ergänzen, sodass die endgültige Anzahl der auswertbaren Patienten lediglich 913 Fälle umfasst. Von diesem Patientenkollektiv hatten 433 einen PDA, der medikamentös mittels COX-Hemmer Therapie (n = 229) oder per primärer (n = 29) oder sekundärer (n = 72) Ligatur interventionell therapiert werden musste. Bei 175 Patienten war der PDA nicht hämodynamisch signifikant und dementsprechend keine Therapie erforderlich (siehe hierzu Abbildung 7 zur Studienpopulation im Ergebnisteil, Seite 30).

2.2. Outcomeparameter und Folgeerkrankungen Frühgeborener

Um die bei unserer Studienpopulation verfolgte Therapiestrategie zur Ductusbehandlung und die Inzidenz typischer Frühgeborenenenerkrankungen im Zusammenhang mit dem COX-2 Polymorphismus beschreiben zu können, haben wir uns verschiedener, bestehender Definitionen, Untersuchungstechniken und Therapieschemata bedient.

PDA-Diagnostik, -Intervention und Therapie

Die Diagnose eines hsPDA wurde mittels Echokardiographie gestellt. Einen standardisierten Untersuchungszeitpunkt oder -abläufe gab es bei den in die Studie eingeschlossenen VLBW Patienten nicht. Bei ELBW-Patienten oder Patienten mit

einem Gestationsalter von 28 SSW oder jünger wurde regelhaft am 5.-7. Lebenstag eine Echokardiographie durchgeführt. Der Zeitpunkt der Erstdiagnose eines PDA ist daher unterschiedlich, weil nicht alle Patienten in einem genormten Rhythmus echokardiographischen Kontrollen unterzogen wurden. Auch vor Entlassung in die Häuslichkeit wurde nicht bei allen Patienten eine sonographische Kontrolle des PDA durchgeführt. Um die hämodynamische Relevanz eines PDA zu ermitteln wurden sowohl echokardiographische Parameter (LA/Ao Ratio $\geq 1,4$; Ductusdurchmesser $\geq 1,5$ mm), als auch ein erhöhter Resistance Index im Ultraschall der craniellen Gefäße (RI $\geq 0,85$) und die Beatmungspflichtigkeit, beziehungsweise eine ausbleibende Besserung der respiratorischen Situation miteinbezogen. Nach Diagnosestellung eines hsPDA erfolgte primär ein medikamentöser Therapieversuch mit einem COX-Hemmer. Sobald Kontraindikationen (beeinträchtigte Nierenfunktion mit Oligo- oder Anurie, erhöhtes Serumkreatinin, NEC, Thrombopenie mit einer Thrombozytenzahl $\leq 50.000/\text{nl}$, Sepsis, frische Blutung in Gehirn, Lungen oder Darm, rechts/links-Shunt über den PDA, pulmonale Hypertonie) gegen die medikamentöse Therapie vorlagen, wurde auf eine primäre chirurgische Ligatur zurückgegriffen. Bis 2004 wurde am Virchow Klinikum der Charité, Universitätsmedizin Berlin, nur Indometacin zum Ductusverschluss verwendet. Im Rahmen neuer Forschungsergebnisse, vor allem zur Beeinträchtigung der cerebralen Perfusion und Nierenfunktion, wurde dann die Therapie auf Ibuprofen umgestellt. Aktuell kommt Indometacin in der Neonatologie der Charité nur noch zur Prophylaxe von intraventrikulären oder pulmonalen Hämorrhagien bei Frühgeborenen mit bestimmten Risikofaktoren < 32 SSW zum Einsatz.

Die Durchführung der medikamentösen Therapie ist bei beiden Medikamenten unterschiedlich. Indometacin wird intravenös über einen Zeitraum von 5 Tagen gegeben. Die Initialdosis beträgt 0,2 mg/kg KG für 3 Gaben im Abstand von 12 Stunden, als Erhalt werden über 3 weitere Tage einmal täglich 0,1 mg/kg KG verabreicht. Ein Therapiezyklus mit Ibuprofen dauert dagegen lediglich 3 Tage. Die intravenöse Dosis beträgt 10 mg/kg KG am ersten Tag, als Erhaltungsdosis dann jeweils 5 mg/kg KG für die zwei weiteren Tage.

CRIB-Score

Der Clinical Risk Index for Babies (CRIB-Score) soll durch die Berücksichtigung verschiedener Parameter eine Vorhersage über die zu erwartende Morbidität und Mortalität eines Frühgeborenen < 32 SSW ermöglichen. Miteinbezogen werden dabei

das Geburtsgewicht, das Gestationsalter, angeborene Fehlbildungen, der maximale Basenexzess sowie die minimal mögliche, beziehungsweise maximal notwendige inspiratorische Sauerstofffraktion innerhalb der ersten 12 Lebensstunden. Bei einem Wert von <5 ist von einem niedrigen Risiko, bei Werten zwischen 6-10 von einem mittleren Risiko und bei einem Wert >10 von einem hohen Risiko für ein Überleben mit bleibender Beeinträchtigung oder dem Versterben auszugehen (149, 150).

Respiratory Distress Syndrome

Das Respiratory Distress Syndrome oder auch Atemnotsyndrom des Frühgeborenen wird sowohl klinisch als auch radiologisch diagnostiziert und in 4 Stadien unterteilt. Diese Einteilung orientiert sich primär an der radiologischen Darstellung des Lungenparenchyms im Röntgen-Thorax. Grad I beschreibt die geringste und Grad IV die schwerste Ausprägung (151, 152).

Bronchopulmonale Dysplasie

Die bronchopulmonale Dysplasie (BPD) wurde entsprechend der Klassifikation nach Jobe eingeteilt (153). Diese unterscheidet zwischen milder, moderater und schwerer Ausprägung.

Intraventrikuläre Hämorrhagie

Die Einteilung der intraventrikulären Hämorrhagie bezieht sich auf die Stadieneinteilung nach Lou Ann Papile, in welcher anhand der sonographischen Diagnose die Ausprägung der Blutung von subependymal bis zur Ventrikeldurchbruchblutung mit Blutung ins Hirnparenchym beschrieben und in Grad I bis Grad IV differenziert wird (154).

Retinopathia praematurorum

Die Retinopathia praematurorum wird in Stadium 0 bis Stadium 5 unterteilt, wobei eine ROP 0 einen Normalbefund zeigt, während eine ROP 5 eine vollständige Netzhautablösung beschreibt (155, 156).

Nekrotisierende Enterokolitis

Die nekrotisierende Enterokolitis wird nach Bell et al. (157) in 3 Stadien unterteilt und reicht von Stadium 1 mit distendiertem Abdomen über Stadium 2a mit pneumatosis intestinalis, 2b mit beeinträchtigten Vitalfunktionen bis zu Stadium 3b mit Perforation des Darmes

2.3. Durchführung der DNA-Analyse

Die Untersuchung der vorliegenden Patientenproben erfolgte nach Extraktion der DNA aus dem Vollblut der asservierten Guthrie-Filterpapierkarten durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP). Anschließend wurden die Ergebnisse mittels Agarose-Gel-Elektrophorese sichtbar gemacht. Der Fokus in dieser Untersuchung lag auf dem COX-2 765G>C Polymorphismus.

Je nach Ergebnis erfolgte die Bewertung der Proben nach Wildtyp (116) (116), heterozygot (HE) und homozygot (HO). Nach kurzer Etablierungsphase konnten die einzelnen Untersuchungsschritte rasch umgesetzt werden. Eine Optimierung der Versuchsbedingungen war nicht notwendig. In den folgenden Absätzen werden die einzelnen Versuchsschritte genauer erörtert.

2.4. DNA-Isolierung aus Filterpapierkarten

2.4.1. Präparation der DNA-Gewinnung aus Filterpapierkarten

Zur Gewinnung der benötigten DNA wurden jeweils ein bis zwei kreisförmige Areale des getrockneten Blutes mit steriler Pinzette und sterilem Skalpell aus den Guthrie-Filterpapierkarten geschnitten und in ein steriles 50 ml Falcon-Röhrchen gelegt. Dort konnte die Inkubation nach Hinzugabe von 2 ml Puffer A, 200 µl Proteinkinase K-Lösung und 200 µl 10 % SDS bei 55°C über Nacht stattfinden.

2.4.2. Phenol-Chloroform-Extraktion (PCI) und alkoholische Fällung der DNA

Nach vorangegangener Inkubation wurden die Filterpapierausschnitte mit einer sterilen Pinzette aus den Falcon-Röhrchen gezogen und dabei die Rest-Lösung ausgedrückt. Der verbliebene Inhalt wurde für zehn Minuten bei 3000 rpm (revolutions per minute) zentrifugiert und 600 µl des dadurch entstandenen Überstandes auf verschiedene 1,5 ml Eppendorfcups (EPC) verteilt. Nach Zugabe von 1 Volumen Phenol (gleiche Menge in µl entsprechend der Menge des abpipettierten Überstandes) erfolgte eine Durchmischung und Zentrifugation der Lösung bei 15000 rpm für zehn Minuten. Anschließend wurde der Überstand erneut abpipettiert, in frische 1,5 ml EPCs überführt und nach Hinzufügen von jeweils 1 Volumen Phenolchloroformisoamylalkohol (PCI 25:24:1) für zehn Minuten bei 15000 rpm zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand in frische 1,5 ml EPCs pipettiert, mit Isoamylalkohol (24:1) ergänzt und für zehn Minuten

bei 15000 rpm zentrifugiert. Abermals wurde der Überstand in neue 1,5 ml EPCs übertragen und dort mit 1 Volumen Isopropanolol, 1/10 Volumen 3mol/L Natriumacetat (pH 5,2) und 1 µl Glycogen (1 µg/µl) ergänzt. Diese Vermengung wurde über Nacht bei -20°C inkubiert.

Nach vorsichtigem Abpipettieren des Überstandes verblieb ein kleines weißes Pellet im EPC. Zur alkoholischen Fällung der DNA wurde dieses Pellet dreimalig mit Ethanol gewaschen. Dies erfolgte, indem dem abpipettierten Überstand jeweils 500 µl Ethanol zugefügt wurden und das entstandene Gemisch für fünf Minuten bei 15000 rpm zentrifugiert wurde. Die verbliebenen Pellets in den EPCs wurden für ein bis zwei Stunden im Thermoblock bei 37°C getrocknet. Anschließend wurde aus den getrockneten Pellets nach Hinzugabe von je 30 µl TE-Puffer erneut eine Suspension hergestellt. Abhängig von der vorherigen Größe der Pellets entstanden daraus unterschiedliche Volumina von 20-80 µl.

Um bei unterschiedlichen Volumina dennoch konstante DNA-Konzentrationen zu erhalten, erfolgte eine massenspektrometrische Bestimmung der DNA-Konzentrationen (in ng) und eine Messung des Reinheitsgrades der Proben mittels Nano-Drop Analyse durch ein Spektrophotometer, wozu jeweils 1,5 µl der DNA-Lösung verwendet wurden.

2.5. Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR dient der Amplifikation kleinster, gezielter DNA-Sequenzen und benötigt neben der Ursprungs-DNA auch zwei Primer, eine thermostabile DNA-Polymerase, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP's), MgCl₂ und Puffer. Die PCR ist eine Kettenreaktion, welche üblicherweise in bis zu 40 Zyklen wiederholt wird. Bei einer Verdopplung der Ausgangsmenge pro Zyklus ist eine exponentielle Vervielfachung der Ursprungs-DNA auf bis zu 2⁴⁰ zu erreichen. In diesem Versuch wurden Primer eingesetzt, die den Polymorphismus enthaltenden Bereich der DNA-Sequenz potentiell einschließen.

Die ersten Schritte der PCR müssen unter kontinuierlicher Kühlung auf Eis erfolgen, um einen vorzeitigen Reaktionsstart durch die thermosensible DreamTaq DNA-Polymerase zu verhindern. Zunächst erfolgt die Herstellung eines PCR-Ansatzes, dessen Zusammensetzung aus der folgenden Tabelle entnommen werden kann:

Tabelle 1: PCR- Ansatz.

Produkt	Menge
2XFastG2 Ready Mix	10 µl
Cox-2 Forward (10 µM) Primer	1 µl
Cox-2 Reverse (10 µM) Primer	1 µl
DNA Template (25 ng)	x
ddH ₂ O	Auf 20 µl

Aus diesem PCR-Ansatz wurde ein Mastermix erstellt und die notwendige Menge der DNA-Lösung errechnet, um eine DNA-Konzentration von 25 ng und, ergänzt durch Wasser, ein Volumen von insgesamt 20 µl zu erreichen. Die DNA-Amplifikation selbst findet in einem Mastercycler statt. Die Reaktionen sind in drei Schritte unterteilt, wobei der zweite Schritt in 40 Zyklen wiederholt wird (siehe Tabelle 2).

Zunächst kommt es zu einer Denaturierung der Wasserstoffbrückenverbindungen der DNA-Doppelhelix bei 95°C über drei Minuten, wodurch die DNA gespalten wird und DNA-Einzelstränge entstehen. Nach einer kurzen Wiederholung der Denaturierung kommt es zum Annealing bei 60°C. Durch den Temperaturabfall ist hierbei eine Anlagerung der Vorwärts- und Rückwärtsprimer an die DNA-Einzelstränge möglich, sodass der zu amplifizierende Bereich markiert ist. Im dritten Schritt, der Elongation, werden die Primer durch die DNA-Polymerase am 3'-OH Ende mit dNTP's bei 70-72°C verlängert und die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden aufgefüllt.

Tabelle 2: Ablauf des PCR Programms.

PCR-Reaktion	Temperatur	Zeit	Zyklus
1. Denaturation	95 °C	3 Min.	1
2. Denaturation	95 °C	15 Sek.	40
Annealing	60°C	15 Sek.	
Elongation	72°C	15 Sek.	
3. Elongation terminal	72°C	10 Min.	1

2.6. Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

Der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) dient dem Nachweis von Polymorphismen mittels Restriktionsenzymen, welche eine DNA-Sequenz von vier bis acht Nukleotiden erkennen und ausschneiden. Diese Schnittstellen sind durch Primer markiert. Diese von der Norm abweichenden DNA-Fragmentlängen ergeben dann ein verändertes Bandenmuster bei der Gelelektrophorese. Die von uns eingesetzten Restriktionsenzyme erfassen die DNA-Sequenz, in der sich der gesuchte Polymorphismus befindet. Beim Wildtyp kann dabei die Sequenz vollständig erkannt werden. Ist an besagter Stelle jedoch ein Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP), so wird die Sequenz durch das Restriktionsenzym nicht mehr identifiziert und kann dementsprechend nicht mehr gespalten werden.

Zur Durchführung des RFLP wurden die PCR-Proben auf Eis gelagert und ein neuer Mastermix aus ddH₂O, 10X Puffer R2 und Enzym erstellt (siehe Tabelle 3). Nach dem Überführen der Lösung in 0,2 ml Versuchsgefäße und Zentrifugation konnte der Verdau im Mastercycler erfolgen. Dieser fand über einen Zeitraum von 16 Stunden bei 37°C statt. Im Anschluss daran kam es bei 65°C über 20 Minuten zur Enzymaktivierung. Die nachfolgende Lagerung konnte wieder bei 4°C erfolgen.

Tabelle 3: Ansatz für den Verdau.

Produkt	Menge
PCR Produkt	25 µl
ddH ₂ O	3 µl
10X Puffer R2	3 µl
BsH12361 (BstUI/BstFNI)	1 µl

2.7. Agarose-Gel-Elektrophorese

Bei der Agarose-Gel-Elektrophorese werden geladene Teilchen nach ihrer Ladung und Größe aufgetrennt. Die der DNA anhaftenden Phosphatreste führen zu einer negativen Ladung, weshalb sie im elektrischen Feld als Polyanion wandern. Die Banden können dabei nach spezifischer Größe aufgetrennt werden.

Zur Durchführung der Elektrophorese wurde ein 3% Agarosegel aus 100 ml TAE Puffer, 3g Agarose und 3 µl Ethidiumbromid hergestellt. Nach dem Abkühlen des Agarose-Gels wurden je 10 µl der Verdauungsprodukte in die Taschen des Gelkissens pipettiert. Diese sind zusätzlich mit TAE-Puffer gefüllt und als Referenz wurde ein 50bp Marker als Molekulargewichtsmarker in eine Tasche pipettiert. Daraufhin erfolgte die Auftrennung bei 70V über eine Gesamtdauer von 1,5 Stunden. Nachfolgend konnten die Gelplatten unter UV-Licht begutachtet werden.

Durch die fluoreszierende Eigenschaft von Ethidiumbromid, welches sich zwischen den DNA-Basen anlagert, sind diese unter UV-Licht sichtbar. Durch ein UV-Dokumentationsgerät konnten die sichtbaren DNA-Banden abfotografiert und digital gespeichert werden.

2.8. Statistik und Datenauswertung

Nach Erhalt der Laborergebnisse wurden diese mittels Probennummern mit den klinischen Daten der Patienten zusammengeführt. Bei der statistischen Auswertung der Daten erhielten wir Unterstützung vom Statistiker Herrn Boris Metze.

Als Software für die Datenauswertung verwendeten wir Microsoft Excel (Version 14.2.0), Microsoft Word (Version 14.2.0) und SPSS (Version 24, IBM). Die Analyse der erhaltenen Daten erfolgte nach empirischer Statistik. Zur Auswertung der quantitativen Variablen verwendeten wir den Mann-Whitney-U-Test und bei mehr als zwei Gruppen den Kruskal-Wallis-Test. Die qualitativen Daten wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests als prozentuale und absolute Werte berechnet. Bei einer kleinen Fallzahl ($n < 5$) wurde der exakte Fisher-Test genutzt. Zur Berechnung der Odds-Ratio und des 95% Konfidenzintervalls wurde die Mantel-Haenszel-Methode angewendet. Ein p-Wert $< 0,05$ wird als statistisch signifikant bewertet, die Berechnung erfolgte bis auf die dritte Dezimale. Zur Darstellung der Ergebnisse berechneten wir Minimum, Maximum und Median und veranschaulichten die Daten in Form von Diagrammen und Tabellen.

3. Materialien

3.1. DNA-Isolierung und PCI Extraktion

Puffer A (pH 7,5)	0,1M NaCl; 0,05 mM Tris; 5 mM EDTA
Proteinkinase K (> 30 U/mg)	Promega, Mannheim
SDS	Fermentas, York, UK
Phenol	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat (3M; pH 5,2)	Fermentas, York, UK
Isopropanolol	Roth, Karlsruhe
Glykogen (1 µg/µl)	Fermentas, York, UK
TE-Puffer (pH 8,0)	10 mM Tris-HCl; pH 7,4 und 1 mM EDTA
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenylchloroformisoamylalkohol	Fermentas, York, UK

3.2. PCR

2XFastG2 Ready Mix	Fermentas, York, UK
COX-2 Forward-Primer (ATT CTG GCC ATC GCC GCT TC-3')	BioTez, Berlin
COX-2 Reverse-Primer (CTC CTT GTT TCT TGG AAA GAG ACG-3')	BioTez, Berlin
ddH ₂ O (doppelt destilliertes Wasser)	Braun, Melsungen

dNTP Mix (2 mM) Fermentas, York, UK

DreamTaq DNA-Polymerase Fermentas, York, UK

3.3. Verdau

10X Puffer R2 Fermentas, York, UK

ddH₂O (doppelt destilliertes Wasser) Braun, Melsungen

BsH1236I (BstUI/BstFNI) Fermentas, York, UK

3.4. Gel-Elektrophorese

50 bp DNA Ladder Fermentas York, UK

Agarose Fermentas, York, UK

Ethidiumbromid Merck, Darmstadt

50 x TAE-Elektrophorese Puffer 40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA;
Fermentas, York, UK

ddH₂O (doppelt destilliertes Wasser) Braun, Melsungen

SDS (Natriumdodecylsulfat) 10% Sigma-Aldrich, Steinheim

Ethanol 70% Merck, Darmstadt

3.5. Verbrauchsmaterialien

EPC-Reaktionsgefäße Eppendorf, Hamburg

Pipetten und Pipettenspitzen Eppendorf, Hamburg

Falconröhrchen Falcon BD, Heidelberg

PCR-Röhrchen Bio-Rad, München

3.6. Geräte

Mastercycler, ep gradient S

PTC-100 Programmable Thermal

Controller

Eppendorf, Hamburg

Zentrifuge, Biofuge fresco

Heraeus, Osterode

Zentrifuge, Megafuge 1.0 R

Heraeus, Osterode

Minishaker MS1

IKA, Wilmington, USA

Thermomixer Comfort

Eppendorf, Hamburg

Stromversorgungsgerät EPS 2A200

Hoefler, Holliston, USA

Mikrowelle

Panasonic, Hamburg

Video Graphic Printer UP-890 CE

Sony, Köln

Gene Flash-UV Gerät

Syngene, Cambridge, UK

Wide Mini-Sub Cell GT

Bio-Rad, München

Spektrophotometer, ND-1000

Kisker-Biotech, Steinfurt

Controller PTC-100

MJ Research Inc., Waltham, USA

Schüttler MTS2

IKA, Wilmington, USA

Centrifuge 5410

Eppendorf, Hamburg

3.7. Software

Microsoft Office Version 14.2.0

Microsoft, Redmond, Washington, USA

Microsoft Excel Version 14.2.0

Microsoft, Redmond, Washington, USA

IBM SPSS Version 24

IBM Analytics, SPSS inc., New York USA

4. Ergebnisse

4.1. Studienpopulation

Die gesamte untersuchte Population, bei der klinische Daten und DNA-Proben asserviert wurden, umfasst 1053 VLBW-Frühgeborene, die im Zeitraum von Januar 1995 bis Dezember 2008 am Campus Virchow Klinikum der Charité Berlin geboren wurden. Da bereits mehrere andere Studien durchgeführt wurden, war teilweise nur noch eine geringe Menge an Probenmaterial vorhanden. Infolgedessen konnte vereinzelt kein PCR-Nachweis des zu untersuchenden COX-Polymorphismus mehr erfolgen. Eine geringe Anzahl (n=140, entsprechend 13,3%) der durchgeführten PCR-Untersuchungen waren somit ohne Ergebnis und die Herstellung zu einem klinischen Zusammenhang dementsprechend nicht möglich. Die hier beschriebene Studienpopulation umfasst daher die klinischen Daten und PCR-Ergebnisse von 913 Patienten.

Von 913 Kindern wiesen 480 (52,6%) keinen PDA auf. Bei insgesamt 433 (47,4%) VLBW-Frühgeborenen wurde ein PDA nachgewiesen. Davon hatten 258 (28,3%) Frühgeborene einen hämodynamisch signifikanten PDA. 29 (6,7%) Patienten erhielten eine primäre chirurgische Ligatur. Bei 229 (52,9%) Patienten wurde eine medikamentöse Therapie mit COX-Hemmern durchgeführt und bei 72 (31,4%) dieser Patienten erfolgte bei Therapieversagen anschließend eine sekundäre Ligatur. Bei 175 (40,4%) Patienten war der PDA nicht hämodynamisch signifikant und wurde dementsprechend nicht therapiert (siehe Abbildung 7).

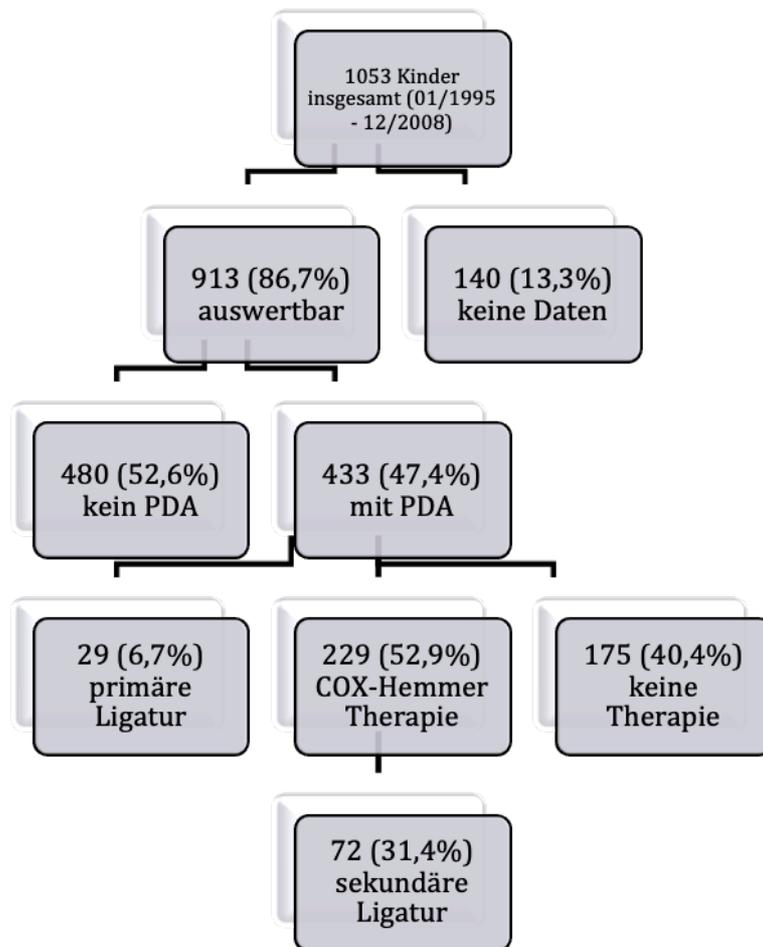


Abbildung 7: Studienpopulation.

4.2. Klinisches Profil Gesamtpopulation

Tabelle 4 gibt einen Überblick zu den klinischen Basisdaten der gesamten Studienpopulation. Ein PDA war bei 433 VLBW-FG (47,4%) nachweisbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Patienten mit PDA deutlich unreifer waren (mittleres Gestationsalter 26,7 SSW vs. 30,0 SSW), das Geburtsgewicht signifikant niedriger war (895g vs. 1240g) und sie häufiger dem männlichen Geschlecht (52,4%) angehörten als Patienten ohne PDA (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Vergleich klinischer Parameter und Auftreten eines PDA. Die Daten sind in absoluten Zahlen, als Median (min; max) oder in Prozent (%) angegeben.

Klinische Parameter	PDA (n= 433)	Kein PDA (n= 480)	Gesamt (n= 913)
GG, g	895 (430; 1495)	1240 (495; 1495)	1066 (430; 1495)
GA, SSW	26,7 (22,9; 34,7)	30,0 (24,0; 37,4)	28,6 (22,9; 37,4)
Geschlecht, ♀	206 (55,8)	260 (44,2)	466 (51,0)
Geschlecht, ♂	227 (50,8)	220 (49,2)	447 (49,0)
CRIB-Score	5 (0; 17)	1 (0; 15)	4 (0; 17)

4.3. Klinische Profil Studienpopulation mit PDA

Von der Gesamtzahl an 433 VLBW-Frühgeborenen mit PDA erhielten 229 Patienten aufgrund eines hämodynamisch relevanten Ductus eine medikamentöse COX-Hemmer Therapie. Davon wurden 111 (48,5%) Frühgeborene mit Ibuprofen behandelt. Eine sekundäre chirurgische Ligatur war bei 33 (29,7%) Patienten nach erfolgloser medikamentöser Behandlung notwendig. Das entspricht einer Responderrate von 70,3% bei Ibuprofen. Die COX-Hemmer Therapie mit Indometacin erfolgte bei 118 (51,5%) Patienten, wovon bei 39 (33,1%) eine sekundäre chirurgische Ligatur notwendig war (siehe Abbildung 8). Es ist daher nach einer medikamentösen Therapie mit Indometacin von einem Therapieerfolg von 66,9% auszugehen. Der Therapieerfolg wurde entweder als ein vollständiger Verschluss des Ductus arteriosus definiert oder aber als eine Verkleinerung des Durchmessers, sodass nach der medikamentösen Therapie keine weitere hämodynamische Relevanz des Ductus mehr bestand. Die genauen Definitionen der Outcomeparameter und Folgeerkrankungen Frühgeborener sind dem Abschnitt 2.2. im Methodenteil zu entnehmen.

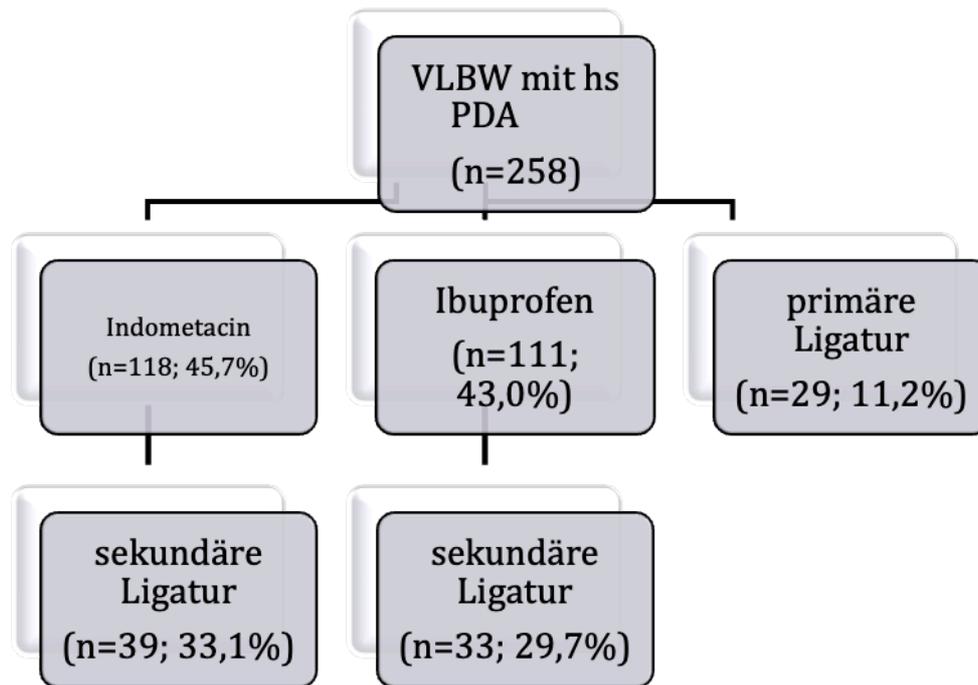


Abbildung 8: Flussdiagramm zur Therapie des PDA innerhalb der Studienpopulation.

4.4. Vergleich klinische Parameter und Responderraten

4.4.1. Geburtsgewicht, Gestationsalter, Mehrlinge

Nicht nur die Therapie an sich, sondern auch besondere Merkmale der klinischen Rahmenbedingungen der untersuchten Patientenpopulation beeinflussen den Therapieerfolg. Es ist zu beobachten, dass bei Patienten mit einem mittleren GG von 743g kein Erfolg der COX-Hemmer-Therapie zu verzeichnen war. Bei Patienten mit einem mittleren GG von 847g war dagegen die Therapie erfolgreich. Ein Median von 104g Gewichts Differenz in Bezug auf das Geburtsgewicht scheint den Therapieerfolg demnach maßgeblich zu beeinflussen. Dem mittleren Gestationsalter von 25,2 SSW bei nicht erfolgreicher Therapie und 26,0 SSW bei erfolgreicher Therapie entspricht auch die Beobachtung eines häufigeren Auftretens eines PDA bei VLBW-FG mit niedrigerem Gestationsalter. Es ist also festzustellen, dass bei schwereren (Median GG 847g vs. 743g) und älteren (Median SSW: 26,0 vs. 25,2) VLBW-FG häufiger ein Therapieerfolg zu verzeichnen ist.

Betrachtet man das Vorliegen von Mehrlingsgeburten in Bezug auf den Therapieerfolg, so ist dabei kein signifikanter Unterschied zwischen Einlings-, Zwillings- und

Drillingsgeburten darstellbar (siehe Tabelle 5). Im Rahmen unserer Datenerfassung kamen nur einmalig Vierlinge vor, die Responderrate ist dementsprechend nicht repräsentativ auswertbar.

4.4.2. Lungenreifeinduktion und Surfactant

Um das respiratorische Outcome eines VLBW-FG zu verbessern, stehen im klinischen Setting mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Wir haben dazu die pränatale Gabe der Lungenreifeinduktion mit Betamethason (in unserem Fall „Celestan“) sowie die postnatale Surfactantapplikation in Bezug auf die Allelverteilung untersucht und die Anzahl der Beatmungstage ausgewertet.

Celestan ist ein synthetisches Glucokortikoid, welches zur Induktion der Lungenreife bei drohender Frühgeburtslichkeit zwischen dem Ende der 24. und dem Ende der 34. SSW verabreicht wird. Leitliniengerecht werden der Schwangeren 2 x 12 mg innerhalb von 24 Stunden intramuskulär verabreicht. Ein Wirkungseintritt ist nach 24-48 Stunden zu erwarten, wobei der größte Effekt bei Kindern, die innerhalb von sieben Tagen nach zweimaliger Gabe geboren werden, zu beobachten ist. Es fanden sich bei 855 Patienten Angaben zur pränatalen Verabreichung von Celestan. 527 (57,7%) Schwangere hatten vor der Entbindung zwei Gaben erhalten, 106 (11,6%) Frauen eine Gabe und 214 (23,4%) erhielten keine Lungenreifeinduktion. In wenigen Ausnahmefällen (8) mussten die Gaben bis zu fünfmal wiederholt werden. Stellt man die Häufigkeit der Celestangaben in Relation zum Therapieerfolg, so lässt sich aufzeigen, dass es nahezu keinen Unterschied im Therapieerfolg zwischen keiner und einer einzelnen Celestangabe gibt (kein Celestan: 16,5%; 1 Celestangabe: 16,3%). Eine deutliche Verbesserung des späteren COX-Hemmer Therapieerfolges ist bei denjenigen Frühgeborenen mit zwei Celestangaben und somit vollständiger Lungenreifeinduktion zu verzeichnen (67,5%).

Als postnatale RDS-Therapie gibt es die Möglichkeit der intratrachealen Surfactant-Applikation. Üblicherweise wird einmalig Surfactant appliziert. Kommt es dabei nicht zu dem gewünschten Erfolg, so können die Gaben wiederholt werden. Innerhalb unserer Studienpopulation erhielten 514 (56,3%) VLBW-FG keinen Surfactant, 224 (24,5%) erhielten eine einmalige Gabe und 104 (11,4%) VLBW-FG zwei Gaben. In nur wenigen Fällen (48; 5,3%) war eine dritte Gabe notwendig. Bei insgesamt 11 (1,2%) Kindern sind bis zu fünf Gaben erfolgt.

Tabelle 5: Vergleich klinischer Parameter der Responder und Non-Responder. Die Daten sind als absolute Zahlen (n), Prozent (%) oder als Median (min; max) dargestellt.

Parameter	Responder (n= 156)	Non-Responder (n= 73)
GG, g	847 (442; 1490)	743 (465; 1290)
GA, SSW	26,0 (23,0; 34,7)	25,2 (23,4; 35,1)
Mehrlinge, n (%)	60 (35,3)	32 (34,0)
Surfactant-Gabe, n (%)	108 (62,1)	66 (37,9)
Geschlecht, ♀	66 (64,1)	37 (35,9)
Geschlecht, ♂	90 (71,4)	36 (28,6)
CRIB-Score	5 (0; 17)	5 (0; 16)

4.5. Polymorphismen und COX-2 Untersuchung

Nach der PCR erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte nach dem Prinzip des RFLP in 3% Agarosegel. Die folgende Abbildung zeigt unsere Ergebnisse unter UV-Licht. Die erste Geltasche enthält dabei die 50 bp DNA-Ladder, um eine Relation zu den DNA-Größen der Kontrollproben darstellen zu können. In Tasche 2-4 sind sequenzierte Kontrollproben als heterozygote Mutation, homozygote Mutation und Wildtyp dargestellt.

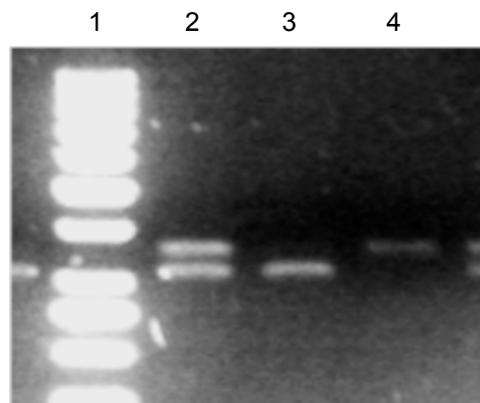


Abbildung 9: Auftrennung der PCR-Kontrollproben in Agarosegel nach Gelelektrophorese. Tasche 1 = 50 bp DNA-Ladder, 2 = heterozygote Mutation, 3 = homozygote Mutation, 4 = Wildtyp.

4.5.1. Allelverteilung innerhalb der Studienpopulation

Innerhalb der untersuchten Gesamtpopulation zeigt sich eine Allelfrequenz von 36,3%, wovon 32,5% von einer heterozygoten und 3,8% von einer homozygoten Mutation betroffen sind. Ein PDA konnte bei 433 VLBW-Frühgeborenen nachgewiesen werden. Die Gesamtrate hämodynamisch nicht signifikanter und dementsprechend unbehandelter PDAs belief sich auf insgesamt 175 Patienten, entsprechend einem Prozentsatz von 40,4% in Bezug auf das gesamte Auftreten eines PDA. Behandlungsbedarf lag bei 258 VLBW-Frühgeborenen (59,6%) vor. Die homozygote Mutationsrate ist mit 35 Patienten geringer ausgefallen. In Bezug auf die Allelverteilung der Studienpopulation ergibt sich dabei kein signifikanter Unterschied zwischen den Frühgeborenen mit oder ohne PDA. Die genaue Verteilung ist der unten angeführten Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Verteilung der COX-2 Polymorphismen in Bezug auf das Auftreten eines PDA. Die Daten sind als absolute Zahlen (n) und in Prozent (%) dargestellt.

Auftreten PDA	COX-2 Polymorphismus			
	WT, n (%)	HE, n (%)	HO, n (%)	Studienpopulation
ohne PDA	292 (60,8)	170 (35,4)	18 (3,6)	480
mit PDA	289 (66,7)	127 (29,3)	17 (3,9)	433
Studienpopulation	581 (63,6)	297 (32,5)	35 (3,8)	913

Das Geschlecht war innerhalb der Studienpopulation relativ gleich verteilt. Von 913 Patienten waren 466 (51,0%) weiblich und 447 (49,0%) männlich. Auch in der Mutationsverteilungen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf das Geschlecht. So entsprachen bei Wildtyp 293 (62,9%) weiblichen und 288 (64,4%) männlichen VLBW-FG. In der heterozygoten Allelverteilung waren 153 (32,8%) weibliche und 144 (32,2%) männliche VLBW-FG, während bei der homozygoten Mutation 20 (4,3%) Frühgeborene weiblich und 15 (3,4%) männlich waren.

Betrachtet man des Weiteren die vollständige Lungenreifeinduktion mit Betamethason und einmalige Surfactantgaben in Bezug auf die COX-2 Polymorphismenverteilung, so lässt sich auch hier kein signifikanter Zusammenhang darstellen. Es fällt jedoch auf,

dass die Mutationsrate bei der zweifachen Surfactantgabe mit 67,3% WT, 4,8% homozygoter Mutation und nur 27,9% heterozygoter Mutation etwas anders verteilt ist. Bei Patienten, die dreimal oder häufiger Surfactant erhielten, entsprach die Allelverteilung weitestgehend jener der gesamten Studienpopulation (siehe Abbildung 10).

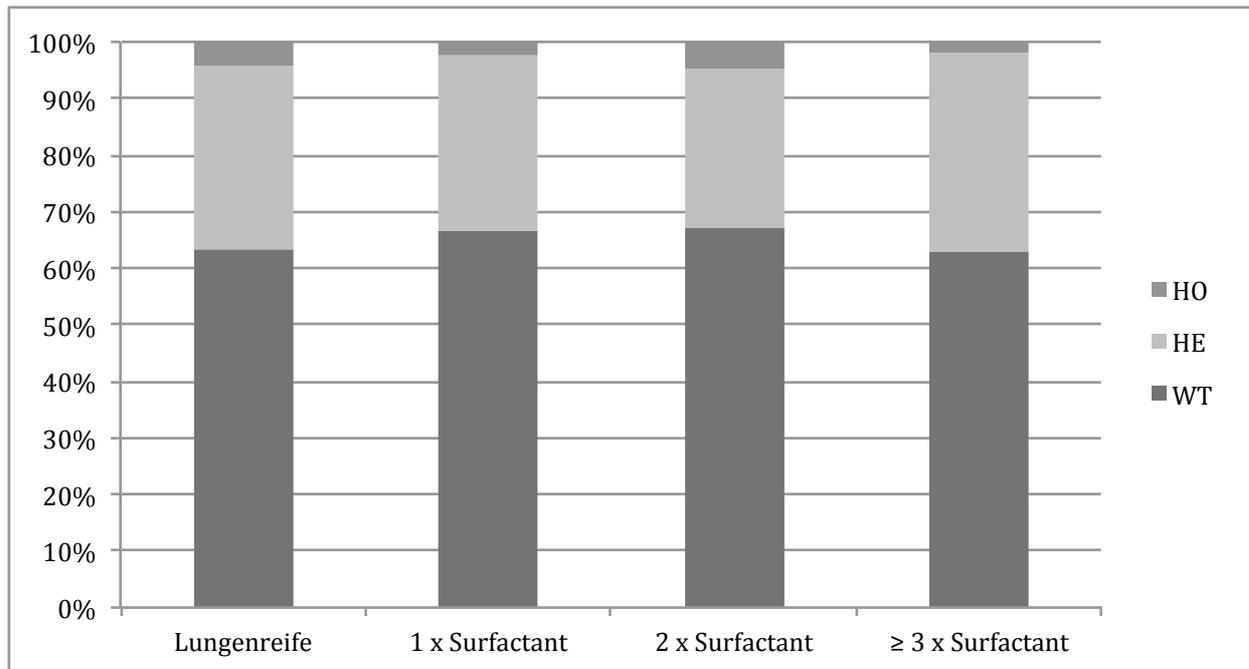


Abbildung 10: Verteilung der COX-2 Polymorphismen in Bezug auf Lungenreifeinduktion und Surfactantgaben. Vollständige Lungenreife n= 535; Einmalige Surfactantgabe n= 224; Zweifache Surfactantgaben n= 104; drei und mehr Surfactantgaben n= 59.

4.5.2. CRIB-Score

Der mittlere CRIB-Score in unserer Studienpopulation betrug 4, der minimale 0 und der maximale 17 Punkte. Ein signifikanter Unterschied der Allelfrequenzen ließ sich dabei nicht ermitteln. Auch in Bezug auf die Responderrate war kein signifikanter Unterschied beim Median des CRIB-Scores zu ermitteln. Auffällig war jedoch zu sehen, dass ein höherer CRIB-Score deutlich das Risiko für einen PDA erhöht (Median: Patienten mit PDA 5; Patienten ohne PDA 1).

4.6. PDA Intervention und Therapie

4.6.1. *Klinisches Profil Therapiedurchführung*

Bei der medikamentösen Therapie mit COX-2 Hemmern waren die beiden Allelfrequenzen identisch verteilt. So wiesen 28,8% der mit Indometacin und ebenfalls 28,8% der mit Ibuprofen therapierten VLBW-Frühgeborenen eine heterozygote Mutation für den 765G>C Polymorphismus auf. Bei zwei Patienten (1,7%) in der Indometacin- und fünf Patienten (4,5%) in der Ibuprofengruppe ließ sich eine homozygote Mutation nachweisen. Dem Wildtyp entsprachen 69,5% der mit Indometacin therapierten Frühgeborenen und 66,7% der mit Ibuprofen behandelten Patienten.

Eine primäre Ligatur wurde bei 29 Patienten durchgeführt. Ein Zusammenhang mit der Allelverteilung lässt sich dabei nicht darstellen. Im Durchschnitt fand eine Ligatur am 17. Lebenstag der Patienten statt.

Die Patientengruppe, bei der im Anschluss an eine erfolglose medikamentöse COX-Hemmer Behandlung eine sekundäre chirurgische Ligatur erforderlich war, lässt sich in Indometacin- oder Ibuprofen-Non-Responder unterscheiden. Die genaue Allelverteilung in der jeweiligen Non-Responder-Gruppe kann der Tabelle 7 entnommen werden. Es zeigt sich dabei bei beiden Medikamenten ein höherer Bedarf an sekundären Ligaturen bei Trägern der heterozygoten Allelverteilung.

In beiden Gruppen war eine sekundäre Ligatur mit 33,1% (Indometacin) und 29,7% (Ibuprofen) ähnlich häufig notwendig. Im Durchschnitt waren, unabhängig vom COX-Hemmer, 1,41 Zyklen notwendig, um einen Therapieerfolg zu erzielen. Betrachtet man die Mutationsverteilung im Hinblick auf die Zyklenzahl, so sieht man 153 Patienten (67,7%) mit einem Therapiezyklus gefolgt von 65 (28,8%) Patienten mit zwei Therapiezyklen eine Mutationsverteilung, die ähnlich derjenigen der Gesamtpopulation ist. Eine Verschiebung zu Gunsten des Wildtyps ist bei drei Zyklen zu beobachten. Dabei sind 85,7% WT und nur bei 14,2% lässt sich eine heterozygote Mutation verzeichnen. Allerdings betrifft dies insgesamt lediglich sieben Patienten.

Betrachtet man die gemeinsame Responderrate beider COX-Hemmer (68,1%) in Bezug auf die Mutationsverteilung, so tragen 70,5% der Responder den Wildtyp und 26,9% die heterozygote Mutation. Bei Therapieerfolg im ersten Zyklus zeigt sich eine leichte Verschiebung zugunsten des Wildtyps (siehe Abbildung 11).

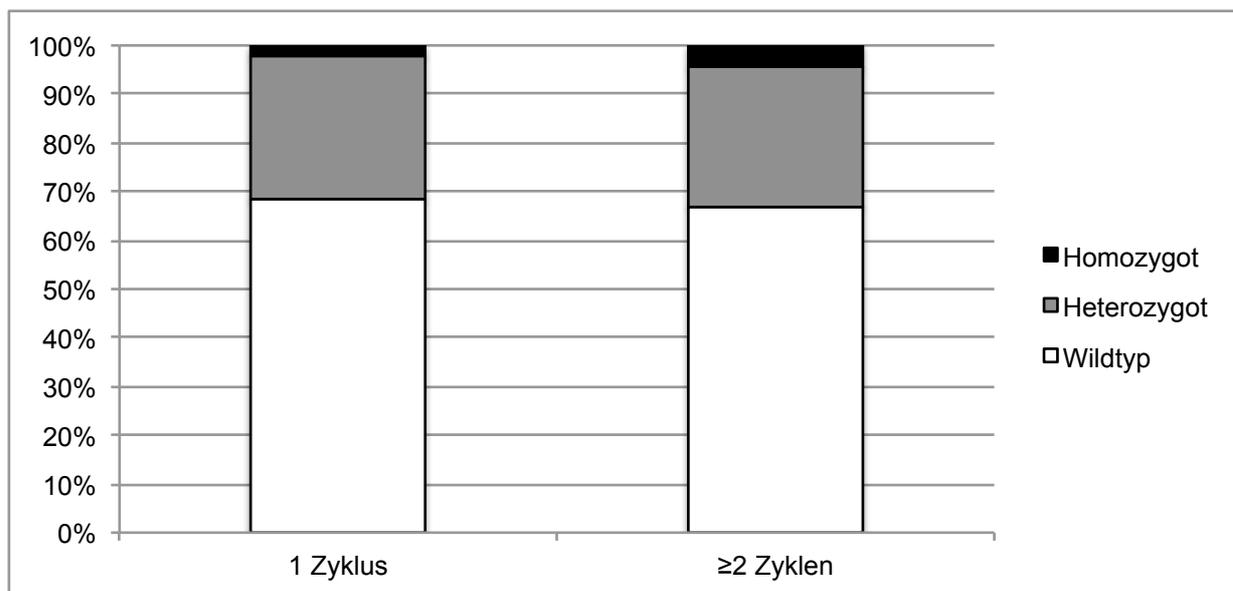


Abbildung 11: Mutationsverteilung des Polymorphismus in Abhängigkeit von den COX-Hemmer-Zyklen.

Auch nach initial erfolgreichem medikamentösem Verschluss kann es durch eine Infektion oder Sepsis zu einer Wiedereröffnung des PDA kommen. Daten dazu sind von 238 VLBW-FG vorhanden. Bei insgesamt 36 Patienten (15,1%) kam es nach erfolgreicher medikamentöser Therapie mit Ibuprofen oder Indometacin zu einer erneuten Wiedereröffnung des PDA. Verglichen mit Indometacin kam es bei der Therapie mit Ibuprofen seltener zu einem Re-Opening des PDA (Ibuprofen: 13,0%, Indometacin: 17,1%). Das Therapieergebnis in der Indometacingruppe scheint von der Allelverteilung nicht beeinflusst zu sein. Dagegen zeigte sich nach der Ibuprofengabe eine gehäufte Wiedereröffnungsrate von 73,3% beim Wildtyp und nur 20,0% Wiedereröffnung bei der heterozygoten Mutation. Im Vergleich zur Mutationsrate der Gesamtpopulation war nach Ibuprofengabe eine Wiedereröffnungsrate von 6,7% bei homozygoter Mutation zu sehen. Diese bezog sich allerdings nur auf einen einzelnen Patienten (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Mutationsverteilung des Polymorphismus in Bezug auf den Therapieverlauf der medikamentösen Therapie mit Indometacin oder Ibuprofen. Die Daten sind als absolute Zahlen (n) und in Prozent (%) dargestellt.

	Indometacin			Ibuprofen		
	Responder	Reopening	Non-Responder	Responder	Reopening	Non-Responder
WT n, (%)	58 (73,4)	13 (61,9)	24 (61,5)	55 (70,5)	11 (73,3)	19 (57,6)
HE n, (%)	19 (24,1)	8 (38,1)	15 (38,5)	20 (25,6)	3 (20,0)	12 (36,4)
HO n, (%)	2 (2,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (3,8)	1 (6,7)	2 (6,1)

4.6.2. COX2-Polymorphismen und Verschlusszeitpunkt eines nicht hsPDA

Des Weiteren wurde der Zeitpunkt des PDA-Verschlusses im Zusammenhang mit der Verteilung der COX2-Polymorphismen untersucht. Dazu wurde unterteilt in PDA-Verschluss vor dem oder am 7. Lebenstag, PDA-Verschluss nach dem 7. Lebenstag, oder nicht hsPDA bei Entlassung.

Der größte Anteil des Verschlusszeitpunktes bewegte sich mit 482 (52,8%) Patienten im Bereich bis inklusive des 7. Lebenstages. Bei 130 Patienten (14,2%) kam es nach dem 7. Lebenstag noch zu einem spontanen Verschluss, während 75 Patienten (8,2%) mit einem nicht hsPDA nach Hause entlassen wurden. Hinsichtlich des Verschlusszeitpunktes entspricht die Mutationsverteilung weitestgehend derer der Gesamtpopulation. Lediglich innerhalb der größten Gruppe mit PDA-Verschluss bis zum 7. Lebenstag sind mit insgesamt knapp 36% mehr heterozygote Mutationen aufgefallen, während 5,3% der Patienten mit nicht hsPDA bei Entlassung in die Häuslichkeit minimal häufiger eine homozygote Mutation aufwiesen (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Verteilung der COX-2 Polymorphismen in Bezug auf den Verschlusszeitpunkt des PDA. Die Daten sind als absolute Zahlen (n) und in Prozent (%) dargestellt.

Verschlusszeitpunkt	COX-2 Polymorphismus			Gesamt
	WT, n (%)	HE, n (%)	HO, n (%)	
<7 Tage	293 (60)	171 (35,5)	18 (3,7)	482
≥ 7 Tage	88 (67,7)	36 (27,7)	6 (4,6)	130
PDA bei Entlassung	50 (66,7)	21 (28,0)	4 (5,3)	75
Verschluss nach Therapie	150 (66,4)	69 (30,5)	7 (3,1)	226
Gesamt	581	297	35	913

4.7. Stationärer Aufenthalt, Beatmungstage und Outcome

Tabelle 9 liefert eine übersichtliche Darstellung der Polymorphismusverteilung hinsichtlich verschiedener Outcome-Parameter und Co-Morbiditäten. Da ein Großteil der Folgeerkrankungen bei VLBW-FG typischerweise erst später im Verlauf des Krankenhausaufenthaltes auftritt, beziehen sich die meisten Daten auf überlebende Kinder. In einzelnen Fällen wie beispielsweise bei der IVH oder NEC können die Folgeerkrankungen ursächlich für das Versterben der Patienten sein. Eine Dokumentation der Todesursachen war in unseren Patientenakten nicht vorhanden und eine weitere Differenzierung demzufolge leider nicht möglich. Die Dauer des stationären Aufenthaltes war mit einem Median von 61 Tagen nahezu gleich auf den Wildtyp und die Polymorphismen verteilt. Die längste maximale Aufenthaltsdauer von 363 Tagen fand sich im Bereich der Patienten mit Wildtyp. Die kürzeste Aufenthaltsdauer von zehn Tagen war bei Patienten mit heterozygoter Mutation zu sehen. Bei dieser war auch der Median der Verweildauer mit 58 Tagen etwas kürzer im Vergleich zur restlichen Studienpopulation. Patienten mit homozygoter Allelverteilung wiesen mit 144 Tagen maximaler stationärer Verweildauer, neben der kürzesten mit 20 Tagen, jedoch auch die längste kurze stationäre Aufenthaltszeit auf. Es ist dabei jedoch die Allelverteilung in

Bezug auf die gesamte Studienpopulation mit nur sehr wenigen VLBW-Patienten mit homozygoter Mutation zu berücksichtigen.

Des Weiteren wurden die Beatmungstage der Patienten analysiert. Insgesamt wurden 643 Patienten maschinell beatmet. Auffällig ist dabei, dass sich die maximale Beatmungsdauer bei Patienten mit Wildtyp mit 185 Tagen deutlich länger darstellt als bei Patienten mit homozygoter Allelverteilung mit 110 Tagen.

Betrachtet man das allgemeine Outcome der Patienten, so sind insgesamt 86,5% nach Hause entlassen und 9,2% in eine andere Klinik verlegt worden. 4,3% der Patienten sind im Krankenhaus verstorben. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Outcome und der Allelverteilung besteht nicht.

4.8. Co-Morbiditäten und COX-Polymorphismen

Im Rahmen der Studie wurde ebenfalls das Auftreten von Co-Morbiditäten, d.h. typischen FG-Erkrankungen im Bezug zur Häufigkeitsverteilung bei den Polymorphismen, erfasst. Teil der Auswertung waren RDS (= Respiratory Distress Syndrome), BPD (= bronchopulmonale Dysplasie), IVH (= intraventrikuläre Hämorrhagie), ROP (= Retinopathia praematurorum), NEC (= nekrotisierende Enterokolitis) und PVL (= periventrikuläre Leukomalazie).

4.8.1. Respiratory Distress Syndrome, Bronchopulmonale Dysplasie

Von 895 vorhandenen Patientendaten war bei mehr als der Hälfte aller Patienten (n=523, 58,4%) eine Form des Respiratory Distress Syndrome (RDS) nachweisbar. Davon waren mit 200 VLBW-FG (38,2%) die meisten von einem RDS Grad II betroffen, gefolgt von 150 Patienten (28,7%) mit RDS Grad III und 136 Patienten (26,0%) mit einem erstgradigen RDS. Insgesamt war die Allelverteilung innerhalb der RDS-Ausprägungen derer in der Gesamtpopulation relativ ähnlich. Eher mildere Verläufe mit RDS Grad I waren mit 68,4% etwas häufiger bei Patienten mit dem Wildtyp zu beobachten.

Bei 69,6% der untersuchten Patienten war keine bronchopulmonale Dysplasie (BPD) nachweisbar. 145 Patienten (16,8%) hatten eine BPD in milder Ausprägung, gefolgt von 94 Patienten (10,9%) mit moderater BPD und 24 Patienten (2,8%) mit schwerwiegender BPD. Bei nicht vorhandener BPD und BPD mit milder bis moderater Ausprägung waren

der Gesamtpopulation entsprechende Allelverteilungen zu beobachten. Im Bereich der schwerwiegenden BPD fiel mit 20,8% eine deutlich geringere Rate an Trägern einer heterozygoten Mutation und mit 12,5% eine hohe Rate an Trägern einer homozygoten Mutation auf.

4.8.2. Intraventrikuläre Hämorrhagie, Periventrikuläre Leukomalazie

Bei 84,5% der Patienten war keine intraventrikuläre Hämorrhagie (IVH) nachweisbar. Innerhalb der erkrankten 140 Patienten (15,6%) unterschied sich die Aufteilung wie folgt: Grad I 50 Patienten (35,7%), Grad II 41 Patienten (29,3%), Grad III 16 Patienten (11,4%), Grad IV 31 Patienten (22,1%). Bei zwei Patienten (1,4%) war eine nicht weiter differenzierte intrazerebrale Blutung beschrieben. Bei den Patienten ohne IVH entsprach die Mutationsverteilung jener der Gesamtpopulation. Innerhalb der I., II. und IV.-gradigen IVH ist jedoch eine Umverteilung der Mutationsrate zu beobachten. Bei IVH Grad I sieht man einen mit 72,0% höheren Anteil an Patienten mit Wildtyp, die heterozygote Mutation ist nur mit 24,0% vertreten. Bei der IVH Grad III ist diese Tendenz noch etwas ausgeprägter. Im Bereich der IV-gradigen IVH zeigt sich eine eher gegenläufige Verteilungsrate mit 54,8% Wildtyp und 41,9% heterozygoter Mutation.

Beim Nachweis einer periventrikulären Leukomalazie (PVL) fand keine Unterteilung nach Schweregrad statt. Insgesamt handelt es sich bei der PVL um eine seltene Folgeerkrankung bei Frühgeborenen und so hatten 95,5% der VLBW-FG unserer Patientenpopulation keine PVL. Bei 36 Patienten (4,5%) war eine PVL nachweisbar. Es bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer PVL und der Allelverteilungsrate.

4.8.3. Retinopathia praematurorum, Nekrotisierende Enterokolitis

In unserer Studienpopulation konnten Augenarztbefunde von 779 VLBW-FG bezüglich einer Retinopathia praematurorum (ROP) ausgewertet werden. Davon hatten 84,6% einen unauffälligen Befund. Eine ROP 1 war bei 36 Patienten (30%) nachweisbar, eine ROP 2 bei 53 Patienten (44,2%), eine ROP 3 bei 28 Patienten (23,3%), eine ROP 4 bei einem Patienten (0,8%) und lediglich bei zwei Patienten (1,7%) eine ROP 5. Im Bereich der ROP 0, 3, 4 und 5 entsprach die Allelverteilung derer der gesamten Studienpopulation. Bei den Patienten mit ROP 2 entsprachen nur 55,6% dem Wildtyp, während bei 41,7% eine heterozygote Mutation nachweisbar war. 69,8% der Patienten

mit ROP 2 waren dem Wildtyp zugeordnet, nur 24,5% der heterozygoten Allelverteilung und ganze 5,7% der homozygoten Mutation.

Bei 893 Patienten waren Daten zur nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) dokumentiert. Davon hatten 89,9% keine NEC. Bei den erkrankten Patienten waren 19 (21,1%) von einer NEC Stadium 1, 27 (30,0%) von einer NEC Stadium 2a, 15 (16,7%) von einer NEC Stadium 2b und 29 (32,2%) von einer NEC Stadium 3 betroffen. Bei den nicht erkrankten Patienten zeigten sich keine Abweichungen in der Allelverteilung im Vergleich zur Gesamtpopulation. Bei den Patienten mit Stadium 1 und 2b fiel eine erhöhte Anzahl an Patienten mit Wildtyp (Stadium 1: 73,7%, Stadium 2b: 73,3%) und eine geringere Anzahl an Patienten mit heterozygoter Mutation (Stadium 1: 21,1%, Stadium 2b: 13,3%) auf. In Relation dazu stieg die Rate homozygoter Mutationen von 5,26% im Stadium 1 auf 13,3% im Stadium 2b.

Tabelle 9: Verteilung der COX-2 Polymorphismen in Bezug auf verschiedene Outcome-Parameter. Die Daten beziehen sich zum größten Teil auf überlebende VLBW-Frühgeborene. Die Zahlen sind absolut (n), in Prozent (%) oder als Median (min; max.) dargestellt.

Outcome-Parameter	COX-2 Polymorphismus			
	WT, n (%)	HE, n (%)	HO, n (%)	Studienpopulation
Verweildauer (Tage)	62 (11; 363)	58 (10; 209)	61 (20; 144)	61 (10; 363)
Beatmung (Tage)	10 (0; 185)	9 (0; 156)	12 (0; 110)	10 (0; 185)
BPD, n (%)	171 (65,0)	82 (31,2)	10 (3,8)	263
CRIB-Score	4 (0; 15)	3 (0; 17)	4 (0; 15)	4 (0; 17)
IVH, n (%)	93 (66,4)	42 (30,0)	5 (3,6)	140
NEC, n (%)	60 (66,7)	25 (27,8)	5 (5,6)	90
PVL, n (%)	24 (66,7)	11 (30,6)	1 (2,8)	36
RDS, n (%)	336 (64,2)	167 (31,9)	20 (3,8)	523
ROP, n (%)	76 (63,3)	39 (32,5)	5 (4,2)	120

4.9. Mehrlinge und COX-Polymorphismen

Mehrlingsschwangerschaften sind bekanntermaßen vermehrt mit einer Frühgeburtlichkeit assoziiert. Dementsprechend war ein vermehrtes Vorkommen von Mehrlingen im Vergleich zu reifen Neugeborenen zu erwarten. Von 913 Patienten gab es 614 Einlinge (67,3%), gefolgt von 215 Zwillingen (23,6%), 74 Drillingen (8,1%) und 8 Vierlingen (0,9%). Bei den Einlings- und Zwillingsgeburten kam der Wildtyp (63,2% Einlinge, 61,4% Zwillinge) häufiger vor als im Bereich der Drillingsgeburten (53%). Die heterozygote Mutation lag bei Einlings- und Zwillingsgeburten bei 33,7% (Einlinge) und 33,0% (Zwillinge). Bei 23,0% der Drillingsgeburten war eine heterozygote Mutation nachweisbar. Die acht Vierlingsgeschwister entsprechen jeweils dem Wildtyp. Ein signifikanter Zusammenhang war zwischen keiner der Variablen darstellbar.

4.10. Einfluss der Ethnizität

Zusammengefasst ließen sich 38 unterschiedliche Ethnizitäten im Bereich der gesamten Studienpopulation beobachten. Bei 266 von 913 untersuchten Patienten waren keine Angaben zur Ethnizität in den Patientenakten zu finden. Die übrige Studienpopulation ist mit dem größten Anteil von 323 Patienten deutscher Herkunft, gefolgt von 64 Patienten türkischer Herkunft. Aus arabischen Ländern (Algerien, Ägypten, Iran, Libanon, Syrien) stammten insgesamt 18 Patienten der Studie. Die häufigste Ethnizität waren dabei elf Patienten aus dem Libanon. Im Bereich der Mutationsverteilungen ist, auch unter Berücksichtigung der Ethnizität, kein signifikanter Unterschied zu erkennen. So setzt sich beispielsweise die Patientengruppe mit deutscher Herkunft aus 227 Patienten vom Wildtyp sowie 86 Patienten mit heterozygoter und zehn Patienten mit homozygoter Mutation zusammen.

5. Diskussion

Bei VLBW-Frühgeborenen (<1500 g GG) kommt es in etwa 50 % und bei ELBW-FG in 70% der Fälle (158) zu einer Persistenz des Ductus arteriosus. Somit stellt der PDA weiterhin eine der größten Herausforderungen in der Behandlung und erfolgreichen Therapie von sehr unreifen Frühgeborenen dar. Auch wenn eine Korrelation zwischen einem PDA und Frühgeborenenenerkrankungen wie IVH, ROP und BPD weiter diskutiert wird, versucht man aufgrund eines möglichen kausalen Zusammenhangs das Outcome von VLBW-FG mit einer adäquaten Ductustherapie zu verbessern. Um ein erhöhtes Risiko an Komplikationen, die ein operativer Verschluss des PDA vor allem bei ELBW-Frühgeborenen mit sich bringt zu vermeiden, wird versucht die Therapie möglichst nebenwirkungsarm mittels COX-2 Inhibitoren medikamentös durchzuführen. In Folge der bestehenden Unreife ist eine COX-Hemmer Therapie bei VLBW-Frühgeborenen jedoch nur in etwa 70% der Fälle und bei ELBW-Frühgeborenen sogar lediglich in 60% der Fälle erfolgreich (146-148). Insbesondere die medikamentöse Therapie wird in Abhängigkeit von den jeweiligen Klinikstandards weiterhin unterschiedlich angewendet. In den letzten Jahren wird zudem immer mehr in Frage gestellt, ob die Therapie eines PDA überhaupt notwendig ist und die Prognose von VLBW-FG wirklich direkt verbessert (159-161). Interessant sind dabei Studien, die eine hohe Spontanverschlussrate des PDA zeigen (162, 163). Zudem geht man mittlerweile vermehrt auf die Wiedereröffnungsraten und folglich teilweise stärkeren unerwünschten Therapienebenwirkungen ein, die bis zum erfolgreichen Verschluss nach der Therapie mit mehreren Zyklen der COX-Hemmer auftreten (28-30, 164).

Die COX-2 spielt eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie des PDA. Sie beeinflusst den intrauterinen intrinsischen Tonus der Ductuswand, ist essentiell notwendig für den postnatalen Ductusverschluss und ausschlaggebend für die Therapie des PDA mit COX-2 Inhibitoren. Auch bei einer Wiedereröffnung eines bereits verschlossenen PDA, vor allem im Rahmen von Infektionen, spielt die COX-2 eine Schlüsselrolle.

Inwiefern genomische Veränderungen der COX-2 einen Einfluss vor allem auf die Inzidenz eines hsPDA und die Erfolgsrate der medikamentösen Therapie mit COX-Hemmern haben, ist bisher nicht geklärt. Daher wollten wir anhand unserer Studie beobachten, ob es im Rahmen des COX-2 765G>C Polymorphismus zu einem gehäuften Auftreten eines hsPDAs kommt, einen möglicherweise bestehenden

Zusammenhang zwischen dem COX-2 765G>C Polymorphismus und anderen Frühgeborenenenerkrankungen betrachten und untersuchen, ob der Polymorphismus auf die Wiedereröffnungsrate des PDA Einfluss nimmt.

Im Rahmen unserer Studie konnten wir die nach optimierter Durchführung erfolgte PCR-Analyse des COX-2 765G>C Polymorphismus an einer großen Patientenkohorte von 913 VLBW-Frühgeborenen in Kombination mit den umfangreichen klinischen Daten dieser Patienten verwenden, um unserer Fragestellung nachzugehen und mögliche Zusammenhänge herzustellen.

In unserem Fall zeigte sich eine Inzidenz eines PDA bei VLBW-FG von 47,4% (n=433). Dies lässt sich mit der aktuellen Datenlage vereinbaren. Auch konnten beispielsweise Benitz et al. in einer Übersichtsarbeit zeigen, dass die Inzidenz eines PDA mit geringerem Gestationsalter und abnehmendem Geburtsgewicht steigt (9). Hagadorn et al. haben in einer retrospektiven Studie mit einem Patientenkollektiv von 13853 VLBW-FG einen klaren Zusammenhang zwischen Unreife und Inzidenz eines PDA bewiesen (165). Ergänzend zur Unreife haben kranke Frühgeborene, und Frühgeborene mit höherem CRIB-Score auch ein höheres Risiko einen PDA zu entwickeln. Dies scheint unter anderem auf die erhöhte Prostaglandin- und NO-Sensitivität von VLBW-Frühgeborenen zurückzuführen zu sein (24, 166). Wir konnten mit unserer Studienpopulation bestätigen, dass Patienten mit abnehmendem Gestationsalter (Median GA: mit PDA 26,7 SSW vs. ohne PDA 30,0 SSW) und niedrigerem Geburtsgewicht (Median GG: mit PDA 895g vs. ohne PDA 1240g) deutlich häufiger einen PDA hatten. Ebenso zeigte sich in unserem Patientenkollektiv ein höherer CRIB-Score bei Patienten mit PDA (Median CRIB: mit PDA 5 vs. ohne PDA: 1).

Von der Gesamtzahl an Patienten mit PDA wiesen 59,6% eine hämodynamische Relevanz, und somit einen chirurgischen oder medikamentösen Therapiebedarf auf. Bezogen auf unsere Gesamtpopulation ergibt das 28,3% der VLBW-FG mit hsPDA (n=258), was im Vergleich zu anderen Studien etwas weniger ist (165, 167). Betrachtet man die Patienten mit PDA, so konnten wir aufzeigen, dass der größte Anteil der Spontanverschlüsse bis zum 7. Lebenstag stattfindet. Auch diese Angabe ist mit der aktuellen Datenlage vereinbar und unterstreicht die vermehrt gestellte Frage, ob eine chirurgische oder konservativ-medikamentöse Therapie eines PDA besonders bei FG mit höherem GA und GG überhaupt heutzutage noch sinnvoll ist (168).

Zum medikamentösen PDA-Verschluss wurden zum Zeitpunkt der Datenerhebung in unserer Population die COX-Hemmer Indometacin und Ibuprofen verwendet. Von einer Therapie mit Indometacin ist man mittlerweile infolge des hohen Spektrums an unerwünschten Nebenwirkungen wieder abgekommen. In der Literatur wird eine vergleichbare Wirksamkeit beider Medikamente beschrieben (148, 169). In unserer Studienpopulation unterschied sich die Wirksamkeit der beiden Medikamente nur minimal, nicht signifikant. 48,5% der Patienten wurden mit Ibuprofen und 51,5% mit Indometacin therapiert. Wurden VLBW-FG mit Ibuprofen behandelt, so war eine Erfolgsrate von 70,3% zu verzeichnen. Bei Patienten, die mit Indometacin behandelt wurden, war sie mit 66,9% etwas geringer.

In unseren Ergebnissen zeigte sich bei der Gesamtpopulation eine Allelfrequenz von 36,3%, wobei 32,5% auf eine heterozygote und 3,8% auf eine homozygote Mutation entfallen. Verglichen mit der Gesamtpopulation ist die Allelverteilung im Bereich der Studienpopulation mit PDA in Bezug auf die homozygote Mutation mit 3,6% nahezu gleich. Betrachtet man die heterozygote Mutationsrate, so ist sie mit 35,4% etwas häufiger bei den VLBW-FG mit PDA vertreten. Dies wiederum ist gleichbedeutend mit einer niedrigeren Rate an Wildtyp bei diesen Kindern (Studienpopulation mit PDA 60,8% vs. Gesamtpopulation 63,7%). Bei den VLBW-FG ohne PDA ist wiederum zu beobachten, dass eine niedrigere heterozygote Mutationsrate mit 29,3% und anteilig eine größere Patientengruppe von 66,7%, die den Wildtyp trägt, vertreten ist. Die homozygote Allelverteilung ist dabei mit 3,9% nahezu identisch. Innerhalb der Studienpopulation konnten wir die Allelfrequenzen bei VLBW-FG mit hsPDA weiter differenzieren. Es zeigt sich eine seltener vorkommende heterozygote Mutation mit 29,1%, eine etwas geringere homozygote Mutation mit 3,1% und ein Anstieg derjenigen Patienten mit Wildtyp auf sogar 67,8%. So stellt sich die Frage, warum diese Allelfrequenzen im Bereich der Studienpopulation der VLBW-FG mit PDA, sowie auch bei VLBW-FG mit hsPDA in die gleiche Richtung verschoben sind. Möglicherweise stellt die heterozygote Mutation einen protektiven Faktor für das Auftreten eines PDA dar, einen signifikanten Zusammenhang gibt es jedoch nicht. Ein Vergleich mit ähnlicher Literatur ist leider nicht möglich, da zu diesem Thema bisher keine veröffentlichten Studien existieren.

In Bezug auf die Geschlechtsverteilung ließ sich kein signifikanter Zusammenhang bezüglich der Häufigkeitsverteilung der Polymorphismen darstellen.

Der Ductusverschluss ist ein multifaktorielles Ereignis und unterliegt sowohl prä- als auch postnatal verschiedenen Mechanismen, welche von genetischen Komponenten beeinflusst werden. Bisher existiert neben unserer keine weitere Studie, die den Einfluss von COX-2 Polymorphismen auf den Ductusverschluss an einer so großen Kohorte von VLBW-Frühgeborenen untersucht hat. In der Literatur wird eine genetische Prädisposition in Bezug auf den PDA viel diskutiert. Demnach ist der von uns untersuchte COX-2 Polymorphismus allem Anschein nach nicht der einzige genetische Polymorphismus, der auf das Auftreten und den Verschlussvorgang des PDA Einfluss nimmt. So könnte beispielsweise auch beim Vorliegen von VEGF-Rezeptor- und CYP-Polymorphismen von einer möglichen Auswirkung auf den Ductusverschluss auszugehen sein (170, 171).

Dagle et al. haben zum Beispiel 1013 ELBW-Frühgeborene auf insgesamt 1634 single nucleotide Polymorphismen (SNPs) hin untersucht und konnten mehrere Genvarianten darstellen, die im Zusammenhang mit dem Auftreten eines PDA stehen. So wurde beispielsweise ein signifikanter Zusammenhang zwischen SNPs des endothelialen PAS-Domänen enthaltenden Protein 1 (EPAS1), auch bekannt als Hypoxie-induzierbarer Faktor 2-alpha, erkannt. Des Weiteren konnte eine Genvariante im PTGIS-Gen, welches die Prostacyclinsynthase kodiert, in einen signifikanten Zusammenhang mit dem Auftreten eines PDA gebracht werden (22).

Auch Lewis et al. beschreiben verschiedene genetische Risikofaktoren, wie die Häufung eines PDA unter Geschwistern, ganz besonders aber ein gehäuftes Vorkommen unter monozygoten Zwillingen (172). Mani et al. gehen in ihrer Untersuchung an 358 Frühgeborenen zudem auf die familiäre Häufung und Konsanguinität der Eltern ein (173). Yamaguchi et al. konnten in einer retrospektiven Zwillingsstudie an 445 VLBW-FG ein familiär gehäuftes Auftreten des PDA nachweisen (174).

Obwohl die Einflüsse verschiedener genetischer Polymorphismen auf das Vorhandensein eines PDA und den Ductusverschluss unumstritten sein dürften, so ist dabei nicht zu vergessen, dass die Unreife eines VLBW-FG an sich zweifellos einen weiteren sehr wichtigen Einflussfaktor beim Verschluss des Ductus arteriosus darstellt

und eine klare Unterscheidung beziehungsweise Gewichtung jener beiden Faktoren kaum möglich ist.

Die Cyclooxygenase-2 ist ein essentielles Enzym in den ersten beiden Schritten der Prostaglandinsynthese. Sie konvertiert die Arachidonsäure über Prostaglandin G₂ zu Prostaglandin H₂, welches als Substrat für die daraus entstehenden aktiven Prostanoiden steht. So spielt die COX-2 eine zentrale Rolle bei entzündlichen Vorgängen und ist vor allem in akut oder chronisch entzündlichem sowie vorgeschädigtem Gewebe induzierbar. Hohe Grundkonzentrationen der COX-2 konnten vor allem in Nieren, Pankreas, Uterus, Ovarien und Makrophagen nachgewiesen werden. Bei Neugeborenen unter 38 SSW konnten COX-1 und COX-2 in allen Ductusregionen nachgewiesen werden. COX-2 war dabei in geringerer Ausprägung vorhanden (108, 128). Postnatal wurde eine deutliche Induktion der COX-2 durch erhöhten Sauerstoffpartialdruck beobachtet. Trivedi et al. zeigten aber auch, dass bei frühgeborenen Mäusen eine deutlich geringere COX-2 Induktion stattfand, was ein erhöhtes Risiko für einen PDA mit sich bringt (21).

Wissenschaftlich belegt ist zudem ein vermehrtes Auftreten der COX-2 bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson, und bei kolorektalem, Bronchial-, Mamma- und Prostatakarzinom. Eine selektive Regulation der COX-2 kann beispielsweise durch Glukokortikoide erfolgen (175). Die Induktion der COX-2 Expression erfolgt durch Zytokine, Lipopolysaccharide, Wachstumsfaktoren und mechanische Reize.

Eine weitere, für Frühgeborene wichtige Rolle der COX-2 liegt in der Interaktion zwischen COX-2 und NO. Peroxynitrit, ein aus NO und O₂ gebildetes Oxidans, reagiert mit der Cyclooxygenase und kann dadurch die Prostaglandinsynthese aktivieren. Eine niedrige Konzentration verhindert die Prostaglandinsynthese, sodass ein reduzierter gefäßmodulierender Effekt erzielt werden kann. Dies scheint auf einem Feedback-Mechanismus zwischen NO und COX zu beruhen, wodurch eine Deletion der COX zu einer Hochregulation der NO-Synthese führt (126, 135). Es ist auch beschrieben, dass die COX-2 einen essentiellen Stellenwert beim verspäteten PDA-Verschluss und bei der Wiedereröffnung des PDA im Rahmen von schweren Infektionen hat (28).

Wie bereits beschrieben, entsprechen Patienten mit hsPDA, in Bezug auf die Mutationsrate der Gesamtpopulation, häufiger dem Wildtyp und dafür seltener der

heterozygoten oder homozygoten Mutation. Der Verschlusszeitpunkt scheint durch die Allelfrequenzen aber nicht eindeutig beeinflusst zu werden. Zwar zeigt sich eine Abnahme der heterozygoten Allelverteilung bei einem PDA-Verschluss nach dem 7. Lebensstag, jedoch gleicht sich diese weitestgehend zu Gunsten der homozygoten Mutation aus. Das Maximum an homozygoten Mutationen ist bei VLBW-FG mit PDA bei der Entlassung zu beobachten. Dieser Anteil der Studienpopulation ist mit insgesamt nur vier Patienten jedoch so gering, dass die Signifikanz dieser Feststellung aufgrund der geringen Gruppengröße nicht gegeben ist. Im Umkehrschluss liegt die Vermutung nahe, dass sich eine heterozygote Allelverteilung positiv auf einen früheren PDA-Verschluss auswirkt. Dies lässt sich anhand der Allelverteilung, die in dieser Gruppe wieder nur der Allelfrequenz der Gesamtpopulation entspricht, nicht erhärten.

In der Behandlung eines hämodynamisch signifikanten PDA stellt die medikamentöse Therapie mit COX-Hemmern die Therapie der Wahl dar, wird aber in verschiedenen Studien widersprüchlich behandelt. Nach wie vor werden Kinder mit hsPDA medikamentös primär mit Ibuprofen oder Indometacin behandelt. Unterschiede in den Therapieleitlinien bestehen dabei nicht nur klinik- sondern auch länderübergreifend (84, 176, 177). In dieser Arbeit wurden 88,8% der VLBW-FG mit hsPDA einer medikamentösen Therapie mit COX-Hemmern unterzogen. Es standen dabei Ibuprofen und Indometacin zur Verfügung. In unserer Klinik wurde bis 2004 vorrangig Indometacin verwendet. Danach fand aufgrund des Profils an unerwünschten Nebenwirkungen ein Wechsel auf ein Therapieregime mit Ibuprofen statt. Innerhalb unserer Studienpopulation sind beide Medikamente in ihrer Anwendung nahezu gleich häufig vertreten. 118 VLBW-Frühgeborene unserer Studie wurden mit Indometacin und 111 mit Ibuprofen therapiert.

Die von uns beobachteten Erfolgsraten beider Medikamente sind mit den Ergebnissen aktueller Studien zu vergleichen. Während Ibuprofen eine Responder-Rate von 70,3% aufwies, war eine medikamentöse Therapie mit Indometacin bei 66,9% unserer VLBW-FG erfolgreich. Einen signifikanten Unterschied im Behandlungserfolg zwischen den beiden Medikamenten konnten wir in unserer Studienpopulation von VLBW-FG nicht aufzeigen. Diese Zahlen decken sich auch weitestgehend mit aktuellen Arbeiten, die eine Non-Responderrate von etwa 30% bei beiden COX-Hemmern beschreiben (62, 75). Die leicht erhöhte Rate an Non-Respondern nach Indometacin-Therapie ist dabei möglicherweise auf die hohe Anzahl an extremely low birth-weight FG (ELBW-FG)

innerhalb der Studienpopulation zurückzuführen. Eine in Abhängigkeit vom Geburtsgewicht sinkende Responderrate ist dabei für beide COX-Hemmer gleichermaßen bekannt (75).

In Bezug auf die Responderraten und die Allelverteilung der unterschiedlichen Therapieformen ließ sich sowohl bei Ibuprofen als auch bei Indometacin eine Verschiebung in Richtung der heterozygoten und homozygoten Polymorphismen bei notwendiger sekundärer Ligatur beobachten. Bei VLBW-FG mit Wildtyp war ein bleibender Therapieerfolg mit 42,4% bei Ibuprofen-Therapie etwas häufiger verglichen mit nur 38,5% bei der Indometacin-Therapie. Unabhängig von der medikamentösen Therapie betrachtet ist die Responderrate beim Wildtyp (Indometacin 73,4%; Ibuprofen 70,5%) deutlich höher als bei der heterozygoten Mutation (Indometacin 24,1%; Ibuprofen 25,6%). Auch wenn man lediglich die Allelverteilung von ELBW-FG in Bezug zum Therapieerfolg betrachtet, so zeigt sich auch in dieser Gruppe die niedrigere Rate an heterozygoten Mutationen. Die Verteilung in Bezug auf die jeweilige medikamentöse Therapie ist dabei nahezu identisch (ELBW Indometacin und Ibuprofen: 72,7% Wildtyp; 22,7% heterozygot; 4,5% homozygot). Als ursächlich hierfür wäre eine Loss-of-Function-Mutation beim COX-Polymorphismus, welche die Kontraktilität des Ductusgewebes reduziert, in Betracht zu ziehen. Von einem vollständigen Funktionsverlust durch diese Mutation ist nicht auszugehen, da bei der heterozygoten Mutation ebenfalls ein Ansprechen auf die Therapie vorhanden ist (Indometacin 24,1%; Ibuprofen 25,6%). Ein kleiner Unterschied des Therapieerfolges zeigte sich bei Betrachtung des Re-Openings, also der Wiedereröffnungsraten nach erfolgreicher medikamentöser Therapie, welche nach Ibuprofengabe mit 13,0% im Gegensatz zu 17,1% nach Indometacin etwas geringer ausfiel. Die Allelverteilung in der betrachteten Gruppe des Re-Openings nach Indometacintherapie entsprach derjenigen der Gesamtpopulation, während nach Ibuprofengabe eine Häufung der Wiedereröffnung beim Wildtyp zu beobachten war. Folglich ist im Bereich der heterozygoten Mutation eine geringere Wiedereröffnungsrate zu sehen. Es stellt sich die Frage, ob die heterozygote Mutation möglicherweise eine protektive Wirkung auf den Therapieerfolg nach Ibuprofen hat und falls ja, wodurch diese bedingt sein könnte.

Bei 67,7% aller VLBW-FG, die eine medikamentöse Therapie erhielten, war der erste Therapiezyklus erfolgreich. Ein zweiter Therapiezyklus war bei weiteren 28,8% notwendig. Bei der Anzahl der Therapiezyklen entspricht die Allelverteilung

weitestgehend der Gesamtpopulation und es waren keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Mutationsverteilung zu beobachten. Es gab jedoch eine kleine Kohorte mit sieben VLBW-FG, bei denen ein dritter Zyklus der COX-Hemmer zum medikamentösen Ductusverschluss notwendig war. In dieser Gruppe zeigte sich eine signifikant höhere Rate an Patienten mit Wildtyp (n= 7; 85,7%) und nur eine sehr geringe heterozygote Allelverteilung mit 14,2% (n= 1). Homozygote Mutationen kommen dabei gar nicht vor.

Wir konnten das bekannte Phänomen verzeichnen, dass ein niedrigeres Geburtsgewicht (Median GG: 743g vs. 847g) zu geringeren Responderraten und erhöhtem Vorkommen an Wiedereröffnung nach erfolgter Therapie führt. Dies deckt sich auch mit der Untersuchung von Halil et. al, in der als Risikofaktor für vermehrtes Vorkommen von Therapiezyklen und Re-Opening besonders ein geringeres Geburtsgewicht als Risikofaktor beschrieben wird (28). In Bezug auf das Gestationsalter war in unserer Studie keine signifikante Differenz darstellbar (Median GA: 25,2 SSW Non-Responder vs. 26,0 SSW Responder). Auch wenn eine Tendenz in Richtung Therapieversagen bei niedrigerem GA sichtbar wird, so konnten wir die bisher beschriebenen höheren Responderraten bei einem GA über 26 SSW in unserer Studie nicht eindeutig belegen. Was jedoch bei unserer Studienpopulation klar hervorgeht, ist die Assoziation eines höheren CRIB-Scores, welcher ja Geburtsgewicht und Gestationsalter in die Berechnung miteinbezieht, mit einer höheren Rate an Non-Respondern (Median Responder 5 vs. Median Non-Responder 7).

Die chirurgische Ligatur des Ductus arteriosus ist in der Regel die Therapie der zweiten Wahl nach erfolglosen medikamentösen Therapieversuchen. Bestehen allerdings Kontraindikationen, die gegen eine Therapie mit COX-Hemmern sprechen, so kann eine operative Ligatur auch als primäres Therapieverfahren durchgeführt werden. Als Kontraindikationen wurden eine beeinträchtigte Nierenfunktion mit Oligo-/Anurie, erhöhtes Serumkreatinin (> 1,5 mg/dl), eine bestehende NEC, Thrombopenie (< 50000/nl), Sepsis, frische Blutung in Gehirn, Lunge oder Darm, R-L Shunt über den Ductus oder PHT gewertet. In unserer Studie wurde eine primäre Ligatur bei 11,2% der Patienten mit hsPDA durchgeführt. Eine sekundäre Ligatur war bei 31,4% (n= 72) aller zuvor mit COX-Inhibitoren behandelten VLBW-FG notwendig. Im Durchschnitt fand eine sekundäre Ligatur am 17. Lebenstag der Patienten statt. In einer aktuellen Meta-

Analyse von Yan et al. wurde der optimale Zeitpunkt für eine chirurgische Ligatur untersucht. Das Alter in Lebenstagen an dem eine chirurgische Ligatur stattfand, deckt sich dabei mit unserer Untersuchung. Auch wurde gezeigt, dass ein früher chirurgischer Verschluss (im Mittel < 21 Lebenstage) ein besseres respiratorisches Outcome und einen verbesserten Ernährungsstatus für VLBW-FG mit sich bringt (178). Betrachtet man die Polymorphismenverteilung in Bezug auf den Bedarf an operativen Ligaturen, so lässt sich beobachten, dass bei Patienten mit heterozygoter Mutation häufiger sekundäre Ligaturen notwendig waren (59,7% Wildtyp; 37,5% heterozygot; 2,8% homozygot). Hierbei wäre erneut eine Loss-of-Function-Mutation zu diskutieren. Li et al. konnten beispielsweise Mutationen im PRDM6-Gen erkennen und einen eindeutigen Zusammenhang zwischen einem Funktionsverlust dieses Gens und dem Auftreten eines PDA herstellen (179). PRDM6 ist speziell für die vaskulären glatten Muskelzellen und die Kontraktilität des Ductusgewebes zuständig. Ein ähnlicher Zusammenhang wäre auch in unserer Studienpopulation vorstellbar.

In der von uns untersuchten Kohorte wurde zudem der spontane Verschlusszeitpunkt eines nicht hämodynamisch signifikanten PDA analysiert. Bei 52,8% der Patienten kam es innerhalb der ersten sieben Lebenstage zu einem Spontanverschluss des Ductus. Insgesamt 8,2% (n= 75) der VLBW-FG wurden mit einem PDA in die Häuslichkeit entlassen. Weitere Informationen zu Follow-up Untersuchungen zu einem späteren Verschlusszeitpunkt lagen uns dabei nicht vor. Semberova et al. konnten eine vergleichbare Rate an frühen Spontanverschlüssen darstellen. Sie beobachteten die spontane Verschlussrate jedoch sogar über einen weitaus längeren Zeitpunkt bis nach der Entlassung in die Häuslichkeit. Unter Einbeziehung von GA und Gewicht war dabei eine signifikant höhere spontane Verschlussrate bei einem GA >28+0 SWW und einem Gewicht von >1250g zu beobachten (162). Betrachtet man in unserer Studienpopulation die Polymorphismenverteilung, so kann man einen Trend zu einem früheren Verschlusszeitpunkt bei Patienten mit heterozygoter Mutation und einen späteren Verschlusszeitpunkt bei Patienten mit homozygoter Mutation erkennen. Dieses Verteilungsmuster steht im Gegensatz zu unserer Beobachtung, dass bei VLBW-FG mit heterozygoter Mutation des COX-2 Polymorphismus häufiger eine sekundäre Ligatur nach Versagen der medikamentösen COX-Hemmer-Therapie erforderlich war. Einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Verschlusszeitpunkt und der Mutationsverteilung konnten wir jedoch nicht darstellen.

Inwiefern das Bestehen eines hsPDA bei VLBW- und vermutlich noch stärker bei ELBW-Frühgeborenen die Entstehung typischer, das Outcome maßgeblich bestimmender Folgeerkrankungen tatsächlich beeinflusst, unterliegt der steten Diskussion. So konnten unterschiedliche Arbeiten zweifelsohne einen signifikanten Zusammenhang zwischen einem PDA und dem Auftreten einer ROP beschreiben (180, 181), während andere Studien vor allem niedriges Geburtsgewicht, niedriges Gestationsalter, wiederholte Bluttransfusionen, Sauerstofftherapie und das Auftreten einer IVH als Hauptrisikofaktoren darstellen konnten (182-187). In Bezug auf die NEC beschrieben Kessler et al. den PDA als Risikofaktor für eine höhere Mortalität im Rahmen der NEC (32). Kort et al. wiederum stellen einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem PDA und der NEC, sowie der BPD, der ROP und einer erhöhten Mortalitätsrate in Frage und sehen den PDA eher nur als isolierten Risikofaktor für die IVH an (33). Mehrere Studien konnten einen Zusammenhang zwischen einer höheren Mortalitätsrate bei Patienten mit NEC und PDA feststellen (32, 34). Dollberg et al. sehen den PDA zwar als Risikofaktor für die Entstehung einer NEC, können dabei aber keinen Zusammenhang mit höherer Mortalität, auch nicht in Bezug auf die Therapie mit Indometacin, feststellen (188).

Ein viel diskutiertes Thema in der Literatur ist der Zusammenhang zwischen genetischen Polymorphismen und typischen Frühgeborenenenerkrankungen wie RDS, BPD, IVH, PVL oder ROP. Wir konnten darstellen, dass es bei höhergradigem RDS zu einer Verschiebung der Allelfrequenzen kommt. Ist es bei minimaler Ausprägung vorrangig der Wildtyp, sieht man, dass bei RDS Grad II eine gehäufte homozygote Mutation und bei RDS Grad IV eine deutlich höhere heterozygote Mutation vorhanden ist. Im Zusammenhang mit der BPD konnte in dieser Studie zudem eine deutliche Verschiebung der Allelfrequenzen beobachtet werden. Bei schwerwiegender Ausprägung (BPD Grad 3) ist vor allem eine homozygote Mutation vermehrt darstellbar und die heterozygote Mutation deutlich geringer vertreten. Inwiefern es sich bei dieser Beobachtung um relevante Ergebnisse handelt, lässt sich aufgrund der geringen Fallzahl (n= 24 mit schwerwiegender BPD, davon n= 3 mit homozygoter Mutation) nicht eindeutig beurteilen.

In Bezug auf die IVH konnten wir erkennen, dass der Wildtyp bis zur IVH Grad III deutlich häufiger vertreten war; hier waren es sogar 75,0%, während nur 18,8% der

heterozygoten Allelverteilung entsprachen. Einzig bei der IVH Grad IV zeigte sich eine genau gegenläufige Tendenz mit vermehrtem Vorkommen heterozygoter Mutation auf Kosten des Wildtyps. Auf den ersten Blick scheint der Wildtyp möglicherweise als protektiver Faktor bei der IVH zu gelten. Es stellt sich aber die Frage, warum bei schwerer Ausprägung die Verteilung genau gegenläufig war. Insgesamt waren 31 Patienten (22,5%), bei denen eine IVH nachweisbar war, von einer IVH Grad IV betroffen. Betrachtet man die retinopathia praematurorum, so schien wiederum die heterozygote Allelverteilung mit einer mildereren Ausprägung im Zusammenhang zu stehen. In retinalen Müller- und Endothelzellen wurde eine Erhöhung der COX-2 Aktivität und somit der PGE₂ durch NO dargestellt. Der durch die Hypoxie induzierte Anstieg des VEGF führt zu einer Steigerung der retinalen Angiogenese und ist somit Schlüsselfaktor in der Entstehung der ROP. Beharry et al. konnten in diesem Zusammenhang die präventive Wirkung von COX-2 Hemmern auf die Entwicklung der ROP darstellen. Ein eindeutiger Benefit, vor allem aufgrund des Nebenwirkungsprofils der medikamentösen Therapie, konnte aber noch nicht bewiesen werden (189, 190). Für die nekrotisierende Enterokolitis (NEC) zeigte die Auswertung ebenfalls einen möglicherweise protektiven Faktor bei Vorliegen der heterozygoten Mutation.

Zusammenfassend lässt sich aus unserer Studie schlussfolgern, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem 765G>C Polymorphismus der COX-2 und dem medikamentösen Therapieerfolg mit COX-Hemmern bei VLBW-FG mit hsPDA besteht.

5.1. Stärken und Schwächen der Arbeit

Eine klare Stärke der Arbeit ist sicher die große Studienkohorte und umfangreiche klinische Datenbank. Wir konnten so aus einem großen Spektrum an Informationen wählen und mögliche Zusammenhänge untersuchen. Da es sich jedoch um eine retrospektive Datenanalyse handelt, ließen sich verschiedene Informationen nicht mehr rekonstruieren. Auch nach erneuter Durchsicht, der aus dem Archiv bestellten Akten, konnten nicht alle fehlenden Informationen ergänzt werden. Obwohl es bei den VLBW-FG Richtwerte zur kardiologischen Diagnostik gibt, wurden die Echokardiographien nicht bei allen Studienkindern an exakt den gleichen Lebensstagen durchgeführt. So lässt sich zwar in die Gruppen Verschluss des PDA bis zum oder nach dem 7. Lebensstag und PDA bei Entlassung nach Hause unterteilen, eine weitere

Differenzierung, die für die Handlungsleitfäden von Bedeutung sein könnte, ist jedoch leider nicht möglich. Auch eine Follow-up Untersuchung derjenigen Patienten, die mit PDA entlassen wurden, ist nicht Inhalt dieser Studie. Diese könnte aber für die Abwägung zur Sinnhaftigkeit einer PDA-Therapie entscheidende Informationen liefern. Positiv zu bewerten ist, dass infolge der engen Zusammenarbeit mit der hausinternen Abteilung für Kinderkardiologie hohe Qualitätsstandards bei der Untersuchung, Therapieindikation und Wahl der Therapieoption des hsPDA kontinuierlich gewährleistet werden konnten.

Ein weiteres Problem und limitierender Faktor für die PCR-Untersuchungen war die Menge des zur Verfügung stehenden Probenmaterials der Patienten. Nachdem bereits mehrere Studien damit durchgeführt wurden, stand nur noch wenig oder zum Teil gar kein genetisches Patientenmaterial mehr zur Verfügung, sodass leider nicht von allen Patienten aus der klinischen Datenbank ein PCR-Ergebnis ausgewertet werden konnte und sich die eigentliche Studienkohorte von 1053 Patienten auf 913 Patienten reduzierte.

Als besonders vorteilhaft zu bewerten ist die Zusammenstellung einer so großen Patientenkohorte aus einer einzelnen Einrichtung. So bestanden bei allen Patienten einheitliche Parameter zur Definition und Therapieindikation eines hsPDA. Auch das Behandlungsregime war, bis auf den Wechsel von Indometacin zu Ibuprofen als verwendeten COX-Hemmer, in der gesamten Studienpopulation gleich.

Wünschenswert wäre eine Dokumentation der unerwünschten Nebenwirkungen der COX-Hemmer-Therapie gewesen. Insbesondere wäre es interessant gewesen zu untersuchen, ob es zwischen der Häufigkeitsverteilung der COX-2 Polymorphismen und dem Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen der Therapie möglicherweise einen Zusammenhang gibt.

Ebenso wäre es interessant gewesen, den Zusammenhang zwischen der Wiedereröffnung eines PDA im Rahmen einer Sepsis im Zusammenspiel mit den COX-2 Polymorphismen zu untersuchen. Leider war auch hierzu keine Dokumentation der klinischen Patientendaten vorhanden.

6. Literaturverzeichnis

1. Galenus. Opera omnia IV. 131 a.D.
2. French RK. The thorax in history. 6. Circulation of the blood. Thorax. 1978;33(6):714-27.
3. Gräper L. Die anatomischen Verhältnisse kurz nach Geburt. III. Ductus Botalli. Z Anat Entwicklungsgesch. 1921;61:312-29.
4. Colbert MC, Kirby ML, Robbins J. Endogenous retinoic acid signaling colocalizes with advanced expression of the adult smooth muscle myosin heavy chain isoform during development of the ductus arteriosus. Circulation research. 1996;78(5):790-8.
5. Schneider DJ, Moore JW. Patent ductus arteriosus. Circulation. 2006;114(17):1873-82.
6. Clyman RI. Developmental responses to oxygen, arachidonic acid, and indomethacin in the fetal lamb ductus arteriosus in vitro. Prostaglandins and medicine. 1978;1(2):167-74.
7. Madea B, Schyma C, Albaloochi Y, Doberentz E. Patent ductus arteriosus as rare cause of sudden death. Rechtsmedizin. 2015;25(3):232-6.
8. Sitzmann FC. Pädiatrie. MLP Duale Reihe. 2007(3. Auflage):338.
9. Benitz WE. Patent Ductus Arteriosus in Preterm Infants. Pediatrics. 2016;137(1).
10. Hamrick SE, Hansmann G. Patent ductus arteriosus of the preterm infant. Pediatrics. 2010;125(5):1020-30.
11. Hermes-DeSantis ER, Clyman RI. Patent ductus arteriosus: pathophysiology and management. Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association. 2006;26 Suppl 1:S14-8; discussion S22-3.
12. Clyman RI. Ibuprofen and patent ductus arteriosus. The New England journal of medicine. 2000;343(10):728-30.
13. Kajino H, Chen YQ, Seidner SR, Waleh N, Mauray F, Roman C, Chemtob S, Koch CJ, Clyman RI. Factors that increase the contractile tone of the ductus arteriosus also regulate its anatomic remodeling. American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology. 2001;281(1):R291-301.
14. Clyman RI. Mechanisms regulating the ductus arteriosus. Biology of the neonate. 2006;89(4):330-5.

15. Olukman O, Ozdemir R, Karadeniz C, Calkavur S, Mese T, Vergin C. Is there a relationship between platelet parameters and patency of ductus arteriosus in preterm infants? *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*. 2017;28(1):8-13.
16. Murphy DP, Lee HC, Payton KS, Powers RJ. Platelet count and associated morbidities in VLBW infants with pharmacologically treated patent ductus arteriosus. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*. 2016;29(13):2045-8.
17. Simon SR, van Zogchel L, Bas-Suarez MP, Cavallaro G, Clyman RI, Villamor E. Platelet Counts and Patent Ductus Arteriosus in Preterm Infants: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neonatology*. 2015;108(2):143-51.
18. Sallmon H, Weber SC, Dirks J, Schiffer T, Klippstein T, Stein A, Felderhoff-Müser U, Metze B, Hansmann G, Bühner C, Cremer M, Koehne P. Association between Platelet Counts before and during Pharmacological Therapy for Patent Ductus Arteriosus and Treatment Failure in Preterm Infants. *Front Pediatr*. 2018;6:41-.
19. Waleh N, Seidner S, McCurnin D, Giavedoni L, Hodara V, Goelz S, Liu BM, Roman C, Clyman RI. Anatomic closure of the premature patent ductus arteriosus: The role of CD14+/CD163+ mononuclear cells and VEGF in neointimal mound formation. *Pediatric research*. 2011;70(4):332-8.
20. The Vermont-Oxford Trials Network: Very Low Birth Weight Outcomes for 1990. *Pediatrics*. 1993;91(3):540.
21. Trivedi DB, Sugimoto Y, Loftin CD. Attenuated cyclooxygenase-2 expression contributes to patent ductus arteriosus in preterm mice. *Pediatric research*. 2006;60(6):669-74.
22. Dagle JM, Ryckman KK, Spracklen CN, Momany AM, Cotten CM, Levy J, Page GP, Bell EF, Carlo WA, Shankaran S, Goldberg RN, Ehrenkranz RA, Tyson JE, Stoll BJ, Murray JC. Genetic variants associated with patent ductus arteriosus in extremely preterm infants. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association*. 2019;39(3):401-8.
23. Parikh P, Bai H, Swartz MF, Alfieris GM, Dean DA. Identification of differentially regulated genes in human patent ductus arteriosus. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2016;241(18):2112-8.

24. Hundscheid T, van den Broek M, van der Lee R, de Boode WP. Understanding the pathobiology in patent ductus arteriosus in prematurity-beyond prostaglandins and oxygen. *Pediatric research*. 2019;86(1):28-38.
25. Reese J, O'Mara PW, Poole SD, Brown N, Tolentino C, Eckman DM, Aschner JL. Regulation of the fetal mouse ductus arteriosus is dependent on interaction of nitric oxide and COX enzymes in the ductal wall. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2009;88(3-4):89-96.
26. Kajino H, Goldberg S, Roman C, Liu BM, Mauray F, Chen YQ, Takahashi Y, Koch CJ, Clyman RI. Vasa vasorum hypoperfusion is responsible for medial hypoxia and anatomic remodeling in the newborn lamb ductus arteriosus. *Pediatric research*. 2002;51(2):228-35.
27. Clyman RI, Chan CY, Mauray F, Chen YQ, Cox W, Seidner SR, Lord EM, Weiss H, Waleh N, Evans SM, Koch CJ. Permanent anatomic closure of the ductus arteriosus in newborn baboons: the roles of postnatal constriction, hypoxia, and gestation. *Pediatric research*. 1999;45(1):19-29.
28. Halil H, Buyuktiryaki M, Atay FY, Oncel MY, Uras N. Reopening of the ductus arteriosus in preterm infants; Clinical aspects and subsequent consequences. *Journal of neonatal-perinatal medicine*. 2018;11(3):273-9.
29. Quinn D, Cooper B, Clyman RI. Factors associated with permanent closure of the ductus arteriosus: a role for prolonged indomethacin therapy. *Pediatrics*. 2002;110(1 Pt 1):e10.
30. Uchiyama A, Nagasawa H, Yamamoto Y, Tatebayashi K, Suzuki H, Yamada K, Arai M, Kohno Y. Clinical aspects of very-low-birthweight infants showing reopening of ductus arteriosus. *Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society*. 2011;53(3):322-7.
31. Pistulli E, Hamiti A, Buba S, Hoxha A, Kelmendi N, Vyshka G. The Association between Patent Ductus Arteriosus and Perinatal Infection in A Group of Low Birth Weight Preterm Infants. *Iranian journal of pediatrics*. 2014;24(1):42-8.
32. Kessler U, Schulte F, Cholewa D, Nelle M, Schaefer SC, Klimek PM, Berger S. Outcome in neonates with necrotizing enterocolitis and patent ductus arteriosus. *World journal of pediatrics : WJP*. 2016;12(1):55-9.
33. Kort EJ. Patent Ductus Arteriosus in the Preterm Infant: An Update on Morbidity and Mortality. *Current pediatric reviews*. 2016;12(2):98-105.

34. Grosfeld JL, Chaet M, Molinari F, Engle W, Engum SA, West KW, Rescorla FJ, Scherer LR, 3rd. Increased risk of necrotizing enterocolitis in premature infants with patent ductus arteriosus treated with indomethacin. *Ann Surg*. 1996;224(3):350-7.
35. Thibeault DW, Emmanouilides GC, Dodge ME, Lachman RS. Early functional closure of the ductus arteriosus associated with decreased severity of respiratory distress syndrome in preterm infants. *American journal of diseases of children (1960)*. 1977;131(7):741-5.
36. Amorim MM, Santos LC, Faúndes A. Corticosteroid therapy for prevention of respiratory distress syndrome in severe preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1999;180(5):1283-8.
37. Alpan G, Scheerer R, Bland R, Clyman R. Patent ductus arteriosus increases lung fluid filtration in preterm lambs. *Pediatric research*. 1991;30(6):616-21.
38. Willis KA, Weems MF. Hemodynamically significant patent ductus arteriosus and the development of bronchopulmonary dysplasia. *Congenital heart disease*. 2019;14(1):27-32.
39. Thébaud B, Goss KN, Laughon M, Whitsett JA, Abman SH, Steinhorn RH, Aschner JL, Davis PG, McGrath-Morrow SA, Soll RF, Jobe AH. Bronchopulmonary dysplasia. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):78-.
40. Sehgal A, Tran H, Carse E. Doppler manifestations of ductal steal: role in decision making. *European journal of pediatrics*. 2011;170(6):795-8.
41. Osborn DA, Evans N, Kluckow M. Hemodynamic and Antecedent Risk Factors of Early and Late Periventricular/Intraventricular Hemorrhage in Premature Infants. *Pediatrics*. 2003;112(1):33.
42. Khanafer-Larocque I, Soraisham A, Stritzke A, Al Awad E, Thomas S, Murthy P, Kamaluddeen M, Scott JN, Mohammad K. Intraventricular Hemorrhage: Risk Factors and Association With Patent Ductus Arteriosus Treatment in Extremely Preterm Neonates. *Front Pediatr*. 2019;7:408-.
43. Hammerman C. Patent ductus arteriosus. Clinical relevance of prostaglandins and prostaglandin inhibitors in PDA pathophysiology and treatment. *Clinics in perinatology*. 1995;22(2):457-79.
44. Vettukattil JJ. Pathophysiology of Patent Ductus Arteriosus in the Preterm Infant. *Current pediatric reviews*. 2016;12(2):120-2.

45. Crystal MA, Yacouby S, Petit CJ. Ischemic changes associated with a large patent arterial duct in small infants. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*. 2014;83(1):95-8.
46. Hammerman C, Strates E, Valaitis S. The silent ductus: its precursors and its aftermath. *Pediatr Cardiol*. 1986;7(3):121-7.
47. McGrath RL, McGuinness GA, Way GL, Wolfe RR, Nora JJ, Simmons MA. The silent ductus arteriosus. *The Journal of pediatrics*. 1978;93(1):110-3.
48. Arlettaz R. Echocardiographic Evaluation of Patent Ductus Arteriosus in Preterm Infants. *Front Pediatr*. 2017;5:147-.
49. Kluckow M, Evans N. Ductal shunting, high pulmonary blood flow, and pulmonary hemorrhage. *The Journal of pediatrics*. 2000;137(1):68-72.
50. Mellander M, Larsson LE, Ekström-Jodal B, Sabel KG. Prediction of symptomatic patent ductus arteriosus in preterm infants using Doppler and M-mode echocardiography. *Acta paediatrica Scandinavica*. 1987;76(4):553-9.
51. Evans N. Diagnosis of the Preterm Patent Ductus Arteriosus: Clinical Signs, Biomarkers, or Ultrasound? *Seminars in perinatology*. 2012;36(2):114-22.
52. Su BH, Watanabe T, Shimizu M, Yanagisawa M. Echocardiographic assessment of patent ductus arteriosus shunt flow pattern in premature infants. *Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition*. 1997;77(1):F36-40.
53. 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. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*. 1995;149(10):1136-41.
54. Czernik C, Lemmer J, Metze B, Koehne PS, Mueller C, Obladen M. B-type natriuretic peptide to predict ductus intervention in infants <28 weeks. *Pediatric research*. 2008;64(3):286-90.
55. Weisz DE, McNamara PJ, El-Khuffash A. Cardiac biomarkers and haemodynamically significant patent ductus arteriosus in preterm infants. *Early human development*. 2017;105:41-7.
56. Jamei Khosroshahi A, Molaei A, Samadi M, Eskandartash E. The correlation between serum level of brain natriuretic peptide and amount of left to right shunt. *Journal of cardiovascular and thoracic research*. 2019;11(1):68-71.
57. Lu KS, Guo XL, Lv JF, Huang SL, Yang CH, Zou ZH, Chen ZJ, Lai CH, Yang BY. [Value of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide as a predictive marker of

symptomatic patent ductus arteriosus in preterm infants]. Zhongguo dang dai er ke za zhi = Chinese journal of contemporary pediatrics. 2015;17(11):1160-4.

58. Prescott S, Keim-Malpass J. Patent Ductus Arteriosus in the Preterm Infant: Diagnostic and Treatment Options. *Advances in neonatal care : official journal of the National Association of Neonatal Nurses*. 2017;17(1):10-8.

59. Vanhaesebrouck S, Zonnenberg I, Vandervoort P, Bruneel E, Van Hoestenbergh M-R, Theyskens C. Conservative treatment for patent ductus arteriosus in the preterm. *Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition*. 2007;92(4):F244-F7.

60. Friedman WF, Hirschklau MJ, Printz MP, Pitlick PT, Kirkpatrick SE. Pharmacologic closure of patent ductus arteriosus in the premature infant. *The New England journal of medicine*. 1976;295(10):526-9.

61. Heymann MA, Rudolph AM, Silverman NH. Closure of the ductus arteriosus in premature infants by inhibition of prostaglandin synthesis. *The New England journal of medicine*. 1976;295(10):530-3.

62. Pacifici GM. Clinical pharmacology of ibuprofen and indomethacin in preterm infants with patent ductus arteriosus. *Current pediatric reviews*. 2014;10(3):216-37.

63. Gulack BC, Laughon MM, Clark RH, Sankar MN, Hornik CP, Smith PB. Comparative effectiveness and safety of indomethacin versus ibuprofen for the treatment of patent ductus arteriosus. *Early human development*. 2015;91(12):725-9.

64. Sperandio M, Beedgen B, Feneberg R, Huppertz C, Brüssau J, Pöschl J, Linderkamp O. Effectiveness and side effects of an escalating, stepwise approach to indomethacin treatment for symptomatic patent ductus arteriosus in premature infants below 33 weeks of gestation. *Pediatrics*. 2005;116(6):1361-6.

65. Weiss H, Cooper B, Brook M, Schlueter M, Clyman R. Factors determining reopening of the ductus arteriosus after successful clinical closure with indomethacin. *The Journal of pediatrics*. 1995;127(3):466-71.

66. Van Overmeire B, Chemtob S. The pharmacologic closure of the patent ductus arteriosus. *Seminars in fetal & neonatal medicine*. 2005;10(2):177-84.

67. 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. *The Journal of pediatrics*. 1999;135(6):733-8.

68. Christmann V, Liem KD, Semmekrot BA, van de Bor M. Changes in cerebral, renal and mesenteric blood flow velocity during continuous and bolus infusion of indomethacin. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*. 2002;91(4):440-6.
69. Hammerman C, Glaser J, Schimmel MS, Ferber B, Kaplan M, Eidelman AI. Continuous versus multiple rapid infusions of indomethacin: effects on cerebral blood flow velocity. *Pediatrics*. 1995;95(2):244-8.
70. Patel J, Marks KA, Roberts I, Azzopardi D, Edwards AD. Ibuprofen treatment of patent ductus arteriosus. *Lancet (London, England)*. 1995;346(8969):255.
71. Ferguson JM. Pharmacotherapy for patent ductus arteriosus closure. *Congenital heart disease*. 2019;14(1):52-6.
72. Thomas RL, Parker GC, Van Overmeire B, Aranda JV. A meta-analysis of ibuprofen versus indomethacin for closure of patent ductus arteriosus. *European journal of pediatrics*. 2005;164(3):135-40.
73. Pees C, Walch E, Obladen M, Koehne P. Echocardiography predicts closure of patent ductus arteriosus in response to ibuprofen in infants less than 28 week gestational age. *Early human development*. 2010;86(8):503-8.
74. Dani C, Vangi V, Bertini G, Pratesi S, Lori I, Favelli F, Ciuti R, Bandinelli A, Martano C, Murru P, Messner H, Schena F, Mosca F. High-dose ibuprofen for patent ductus arteriosus in extremely preterm infants: a randomized controlled study. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2012;91(4):590-6.
75. Ohlsson A, Walia R, Shah SS. Ibuprofen for the treatment of patent ductus arteriosus in preterm or low birth weight (or both) infants. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2018;9:Cd003481.
76. Kim SY, Shin SH, Kim HS, Jung YH, Kim EK, Choi JH. Pulmonary Arterial Hypertension after Ibuprofen Treatment for Patent Ductus Arteriosus in Very Low Birth Weight Infants. *The Journal of pediatrics*. 2016;179:49-53.e1.
77. Gournay V, Savagner C, Thiriez G, Kuster A, Rozé JC. Pulmonary hypertension after ibuprofen prophylaxis in very preterm infants. *Lancet (London, England)*. 2002;359(9316):1486-8.
78. Oncel MY, Erdeve O. Oral medications regarding their safety and efficacy in the management of patent ductus arteriosus. *World journal of clinical pediatrics*. 2016;5(1):75-81.

79. Sallmon H, Koehne P, Hansmann G. Recent Advances in the Treatment of Preterm Newborn Infants with Patent Ductus Arteriosus. *Clinics in perinatology*. 2016;43(1):113-29.
80. Pourarian S, Takmil F, Cheriki S, Amoozgar H. The Effect of Oral High-dose Ibuprofen on Patent Ductus Arteriosus Closure in Preterm Infants. *American journal of perinatology*. 2015;32(12):1158-63.
81. Weisz DE, Martins FF, Nield LE, El-Khuffash A, Jain A, McNamara PJ. Acetaminophen to avoid surgical ligation in extremely low gestational age neonates with persistent hemodynamically significant patent ductus arteriosus. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association*. 2016.
82. Terrin G, Conte F, Oncel MY, Scipione A, McNamara PJ, Simons S, Sinha R, Erdeve O, Tekgunduz KS, Dogan M, Kessel I, Hammerman C, Nadir E, Yurttutan S, Jasani B, Alan S, Manguso F, De Curtis M. Paracetamol for the treatment of patent ductus arteriosus in preterm neonates: a systematic review and meta-analysis. *Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition*. 2016;101(2):F127-36.
83. Memisoglu A, Alp Unkar Z, Cetiner N, Akalin F, Ozdemir H, Bilgen HS, Ozek E. Ductal closure with intravenous paracetamol: a new approach to patent ductus arteriosus treatment. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*. 2016;29(6):987-90.
84. El-Mashad AE-R, El-Mahdy H, El Amrousy D, Elgendy M. Comparative study of the efficacy and safety of paracetamol, ibuprofen, and indomethacin in closure of patent ductus arteriosus in preterm neonates. *European journal of pediatrics*. 2017;176(2):233-40.
85. Huang X, Wang F, Wang K. Paracetamol versus ibuprofen for the treatment of patent ductus arteriosus in preterm neonates: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*. 2018;31(16):2216-22.
86. Schwab JM, Schluesener HJ, Laufer S. COX-3: just another COX or the solitary elusive target of paracetamol? *The Lancet*. 2003;361(9362):981-2.

87. Gersony WM, Peckham GJ, Ellison RC, Miettinen OS, Nadas AS. Effects of indomethacin in premature infants with patent ductus arteriosus: results of a national collaborative study. *The Journal of pediatrics*. 1983;102(6):895-906.
88. Kabra NS, Schmidt B, Roberts RS, Doyle LW, Papile 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. *The Journal of pediatrics*. 2007;150(3):229-34, 34.e1.
89. Villa E, Vanden Eynden F, Le Bret E, Folliguet T, Laborde F. Paediatric video-assisted thoracoscopic clipping of patent ductus arteriosus: experience in more than 700 cases. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2004;25(3):387-93.
90. Shi S, Klotz U. Clinical use and pharmacological properties of selective COX-2 inhibitors. *Eur J Clin Pharmacol*. 2008;64.
91. Vane JR, Flower RJ, Botting RM. History of aspirin and its mechanism of action. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1990;21(12 Suppl):Iv12-23.
92. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91.
93. Taketo MM. Cyclooxygenase-2 Inhibitors in Tumorigenesis (Part I). *Journal of the National Cancer Institute*. 1998;90(20):1529-36.
94. Simmons DL, Levy DB, Yannoni Y, Erikson RL. Identification of a phorbol ester-repressible v-src-inducible gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(4):1178-82.
95. Williams CS, & DuBois, R.N. Prostaglandin endoperoxide synthase: Why two isoforms? *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1996;270 (3 33-3).
96. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annual review of biochemistry*. 2000;69:145-82.
97. Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Raz A, Needleman P. The induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *The Journal of biological chemistry*. 1990;265(28):16737-40.
98. Hawkey CJ. COX-2 chronology. *Gut*. 2005;54(11):1509-14.

99. Rouzer CA, Marnett LJ. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *Journal of Lipid Research*. 2009;50(Suppl):S29-S34.
100. Warner TD, Mitchell JA. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004;18(7):790-804.
101. Tietz O, Sharma SK, Kaur J, Way J, Marshall A, Wuest M. Synthesis of three ¹⁸F-labelled cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors based on a pyrimidine scaffold. *Org Biomol Chem*. 2013;11.
102. Laube M, Kniess T, Pietzsch J. Radiolabelled COX-2 inhibitors for non-invasive visualization of COX-2 expression and activity—a critical update. *Molecules*. 2013;18.
103. Chandrasekharan N, Simmons DL. The cyclooxygenases. *Genome Biology*. 2004;5(9):1-7.
104. Reinauer C, Censarek P, Kaber G, Weber AA, Steger G, Klamp T, Schror K. Expression and translation of the COX-1b gene in human cells--no evidence of generation of COX-1b protein. *Biological chemistry*. 2013;394(6):753-60.
105. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(21):13926-31.
106. Kargman S, Charleson S, Cartwright M, Frank J, Riendeau D, Mancini J, Evans J, O'Neill G. Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology*. 1996;111(2):445-54.
107. Cheng I, Liu X, Plummer SJ, Krumroy LM, Casey G, Witte JS. COX2 genetic variation, NSAIDs, and advanced prostate cancer risk. *British journal of cancer*. 2007;97(4):557-61.
108. Basaran A, Gyimadu A, Güçer Ş, Deren Ö. Cyclooxygenase immunohistochemical staining in the human ductus arteriosus after 24 weeks of gestational age. *Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2012;32(2):120-3.
109. Dai Y, Wu Y, Li Y. Genetic association of cyclooxygenase-2 gene polymorphisms with Parkinson's disease susceptibility in Chinese Han population. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2015;8(10):13495-9.
110. Teismann P, Tieu K, Choi DK, Wu DC, Naini A, Hunot S, Vila M, Jackson-Lewis V, Przedborski S. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease

neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(9):5473-8.

111. Pochard C, Leclair-Visonneau L, Coron E, Neunlist M, Rolli-Derkinderen M, Derkinderen P. Cyclooxygenase 2 is upregulated in the gastrointestinal tract in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2018;33(3):493-4.

112. Su J, Wen S, Zhu J, Liu R, Yang J. Meta-analysis of cyclooxygenase-2 (COX-2) 765G>C polymorphism and Alzheimer's disease. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*. 2016;31:4-9.

113. Ceylan Y, Lekili M, Muezzinoglu T, Nese N, Isisag A. Predictive value of cyclooxygenase-2 over expression for identifying prostate cancer from benign prostatic hyperplasia in prostate biopsy specimens. *Minerva urologica e nefrologica = The Italian journal of urology and nephrology*. 2016;68(3):255-62.

114. Tietz O, Marshall A, Wuest M, Wang M, Wuest F. Radiotracers for molecular imaging of cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme. *Curr Med Chem*. 2013;20.

115. Liu Y, Sun H, Hu M, Zhang Y, Chen S, Tighe S, Zhu Y. The Role of Cyclooxygenase-2 in Colorectal Carcinogenesis. *Clinical colorectal cancer*. 2017;16(3):165-72.

116. Pacelli A, Greenman J, Cawthorne C, Smith G. Imaging COX-2 expression in cancer using PET/SPECT radioligands: current status and future directions. *J Labelled Compd Radiopharm*. 2014;57.

117. Tian J, Hachim MY, Hachim IY, Dai M, Lo C, Raffa FA, Ali S, Lebrun JJ. Cyclooxygenase-2 regulates TGF β -induced cancer stemness in triple-negative breast cancer. *Sci Rep*. 2017;7:40258-.

118. Tanabe T, Tohnai N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2002;68-69:95-114.

119. Kosaka T, Miyata A, Ihara H, Hara S, Sugimoto T, Takeda O, Takahashi E, Tanabe T. Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1994;221(3):889-97.

120. Papafili A, Hill MR, Brull DJ, McAnulty RJ, Marshall RP, Humphries SE, Laurent GJ. Common Promoter Variant in Cyclooxygenase-2 Represses Gene Expression. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2002;22(10):1631-6.

121. Bazan HE, Tao Y, DeCoster MA, Bazan NG. Platelet-activating factor induces cyclooxygenase-2 gene expression in corneal epithelium. Requirement of calcium in the signal transduction pathway. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1997;38(12):2492-501.
122. Herschman HR. Regulation of prostaglandin synthase-1 and prostaglandin synthase-2. *Cancer metastasis reviews*. 1994;13(3-4):241-56.
123. Douglas C, Goodwin LML, Lawrence J, Marnett. Effects of nitric oxide and nitric oxide-derived species on prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin biosynthesis. *The FASEB Journal*. 1999;13:1121-36.
124. Landino LM, Crews BC, Timmons MD, Morrow JD, Marnett LJ. Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(26):15069-74.
125. He T, Xing YQ, Zhao XH, Ai M. Interaction between iNOS and COX-2 in hypoxia-induced retinal neovascularization in mice. *Archives of medical research*. 2007;38(8):807-15.
126. Baragatti B, Brizzi F, Ackerley C, Barogi S, Ballou LR, Coceani F. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the mouse ductus arteriosus: individual activity and functional coupling with nitric oxide synthase. *British journal of pharmacology*. 2003;139(8):1505-15.
127. Coceani F, Barogi S, Brizzi F, Ackerley C, Seidlitz E, Kelsey L, Ballou LR, Baragatti B. Cyclooxygenase isoenzymes and patency of ductus arteriosus. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2005;72(2):71-7.
128. Guerguerian A-M, Hardy P, Bhattacharya M, Olley P, Clyman RI, Fouron J-C, Chemtob S. Expression of cyclooxygenases in ductus arteriosus of fetal and newborn pigs. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1998;179(6, Part 1):1618-26.
129. Rheinlaender C, Weber SC, Sarioglu N, Strauss E, Obladen M, Koehne P. Changing expression of cyclooxygenases and prostaglandin receptor EP4 during development of the human ductus arteriosus. *Pediatric research*. 2006;60(3):270-5.
130. Coceani F, Ackerley C, Seidlitz E, Kelsey L. Function of cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 in the ductus arteriosus from foetal lamb: differential development and change by oxygen and endotoxin. *British journal of pharmacology*. 2001;132(1):241-51.

131. Bouayad A, Fouron J-C, Hou X, Beauchamp M, Quiniou C, Abran D, Peri K, Clyman RI, Varma DR, Chemtob S. Developmental regulation of prostaglandin E2 synthase in porcine ductus arteriosus. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2004;286(5):R903-R9.
132. Gonzalez A, Sosenko IR, Chandar J, Hummler H, Claire N, Bancalari E. Influence of infection on patent ductus arteriosus and chronic lung disease in premature infants weighing 1000 grams or less. *The Journal of pediatrics*. 1996;128(4):470-8.
133. Arayici S, Kadioglu Simsek G, Oncel MY, Eras Z, Canpolat FE, Oguz SS, Uras N, Zengeroglu S, Dilmen U. The effect of histological chorioamnionitis on the short-term outcome of preterm infants ≤ 32 weeks: a single-center study. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*. 2014;27(11):1129-33.
134. Park HW, Choi YS, Kim KS, Kim SN. Chorioamnionitis and Patent Ductus Arteriosus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS one*. 2015;10(9):e0138114.
135. Kajimura I, Akaike T, Minamisawa S. Lipopolysaccharide Delays Closure of the Rat Ductus Arteriosus by Induction of Inducible Nitric Oxide Synthase But Not Prostaglandin E₂. *Circulation Journal*. 2016;80(3):703-11.
136. Du Y, Sarthy VP, Kern TS. Interaction between NO and COX pathways in retinal cells exposed to elevated glucose and retina of diabetic rats. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2004;287(4):R735-41.
137. Goren I, Lee SY, Maucher D, Nusing R, Schlich T, Pfeilschifter J, Frank S. Inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 activity in keratinocytes inhibits PGE formation and impairs vascular endothelial growth factor release and neovascularisation in skin wounds. *International wound journal*. 2015.
138. Majima M, Hayashi I, Muramatsu M, Katada J, Yamashina S, Katori M. Cyclooxygenase-2 enhances basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis through induction of vascular endothelial growth factor in rat sponge implants. *British journal of pharmacology*. 2000;130(3):641-9.
139. Millanta F, Andreani G, Rocchigiani G, Lorenzi D, Poli A. Correlation Between Cyclo-oxygenase-2 and Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Canine and Feline Squamous Cell Carcinomas. *Journal of comparative pathology*. 2016.
140. Sitarz R, Leguit RJ, de Leng WWJ, Polak M, Morsink FM, Bakker O, Maciejewski R, Offerhaus GJA, Milne AN. The COX-2 promoter polymorphism -765 G>C is

associated with early-onset, conventional and stump gastric cancers. *Modern Pathology*. 2008;21(6):685-90.

141. Luo D, Long Y, Chen G-J. Cyclooxygenase-2 gene polymorphisms and risk of Alzheimer's disease: A meta-analysis. *Journal of the Neurological Sciences*. 2015;359(1):100-5.

142. de Vries HS, te Morsche RHM, van Oijen MGH, Nagtegaal ID, Peters WHM, de Jong DJ. The functional -765G→C polymorphism of the COX-2 gene may reduce the risk of developing crohn's disease. *PloS one*. 2010;5(11):e15011-e.

143. Zhao F, Zhu H, Huang M, Yi C, Huang Y. The 765G>C polymorphism in the cyclooxygenase-2 gene and gastric cancer risk: an update by meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(6):2863-8.

144. Coskunpinar E, Eraltan IY, Turna A, Agachan B. Cyclooxygenase-2 gene and lung carcinoma risk. *Medical Oncology*. 2011;28(4):1436-40.

145. Zhu W, Wei B-b, Shan X, Liu P. -765G>C and 8473T>C polymorphisms of COX-2 and cancer risk: a meta-analysis based on 33 case-control studies. *Molecular Biology Reports*. 2010;37(1):277-88.

146. Koch J, Hensley G, Roy L, Brown S, Ramaciotti C, Rosenfeld CR. Prevalence of spontaneous closure of the ductus arteriosus in neonates at a birth weight of 1000 grams or less. *Pediatrics*. 2006;117(4):1113-21.

147. Lu J, Li Q, Zhu L, Chen C, Li Z. Oral ibuprofen is superior to oral paracetamol for patent ductus arteriosus in very low and extremely low birth weight infants. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(31):e16689-e.

148. Chan NM, Law CW, Kwan KF. Ibuprofen versus indomethacin treatment of patent ductus arteriosus: comparative effectiveness and complications. *Hong Kong medical journal = Xianggang yi xue za zhi*. 2014;20(3):205-12.

149. Bühner C, Grimmer I, Metze B, Obladen M. The CRIB (Clinical Risk Index for Babies) score and neurodevelopmental impairment at one year corrected age in very low birth weight infants. *Intensive care medicine*. 2000;26(3):325-9.

150. Lodha A, Sauvé R, Chen S, Tang S, Christianson H. Clinical Risk Index for Babies score for the prediction of neurodevelopmental outcomes at 3 years of age in infants of very low birthweight. *Developmental medicine and child neurology*. 2009;51(11):895-900.

151. Giedion A, Haefliger H, Dangel P. Acute pulmonary X-ray changes in hyaline membrane disease treated with artificial ventilation and positive end-expiratory pressure (PEP). *Pediatric radiology*. 1973;1(3):145-52.
152. Couchard M, Polge J, Bomsel F. [Hyaline membrane disease: diagnosis, radiologic surveillance, treatment and complications]. *Annales de radiologie*. 1974;17(7):669-83.
153. Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;163(7):1723-9.
154. Papile L-A, Burstein J, Burstein R, Koffler H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: A study of infants with birth weights less than 1,500 gm. *The Journal of pediatrics*. 1978;92(4):529-34.
155. An international classification of retinopathy of prematurity. The Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960)*. 1984;102(8):1130-4.
156. The International Classification of Retinopathy of Prematurity revisited. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960)*. 2005;123(7):991-9.
157. Bell RS. Neonatal necrotizing enterocolitis. *The New England journal of medicine*. 1970;283(3):153-4.
158. ElHassan NO, Bird TM, King AJ, Ambadwar PB, Jaquiss RD, Kaiser JR, Robbins JM. Variation and comparative effectiveness of patent ductus arteriosus pharmacotherapy in extremely low birth weight infants. *Journal of neonatal-perinatal medicine*. 2014;7(3):229-35.
159. Kaempf JW, Wu YX, Kaempf AJ, Kaempf AM, Wang L, Grunkemeier G. What happens when the patent ductus arteriosus is treated less aggressively in very low birth weight infants? *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association*. 2012;32(5):344-8.
160. Hagadorn JI, Bennett MV, Brownell EA, Payton KSE, Benitz WE, Lee HC. Covariation of Neonatal Intensive Care Unit-Level Patent Ductus Arteriosus Management and In-Neonatal Intensive Care Unit Outcomes Following Preterm Birth. *The Journal of pediatrics*. 2018;203:225-33.e1.
161. Mohamed MA, El-Dib M, Alqahtani S, Alyami K, Ibrahim AN, Aly H. Patent ductus arteriosus in premature infants: to treat or not to treat? *Journal Of Perinatology*. 2017;37:652.

162. Semberova J, Sirc J, Miletin J, Kucera J, Berka I, Sebkova S, O'Sullivan S, Franklin O, Stranak Z. Spontaneous Closure of Patent Ductus Arteriosus in Infants ≤ 1500 g. *Pediatrics*. 2017;140(2).
163. Romagnoli V, Pedini A, Santoni M, Scutti G, Colaneri M, Pozzi M, Cogo PE, Carnielli VP. Patent ductus arteriosus in preterm infants born before 30 weeks' gestation: high rate of spontaneous closure after hospital discharge. *Cardiology in the young*. 2018;28(8):995-1000.
164. Rolland A, Shankar-Aguilera S, Diomandé D, Zupan-Simunek V, Boileau P. Natural evolution of patent ductus arteriosus in the extremely preterm infant. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*. 2015;100(1):F55.
165. Hagadorn JI, Brownell EA, Trzaski JM, Johnson KR, Lainwala S, Campbell BT, Herbst KW. Trends and variation in management and outcomes of very low-birth-weight infants with patent ductus arteriosus. *Pediatric research*. 2016;80:785.
166. Yoo H, Lee JA, Oh S, Jung YH, Sohn JA, Shin SH, Choi CW, Kim EK, Kim HS, Kim BI. Comparison of the Mortality and In-Hospital Outcomes of Preterm Infants Treated with Ibuprofen for Patent Ductus Arteriosus with or without Clinical Symptoms Attributable to the Patent Ductus Arteriosus at the Time of Ibuprofen Treatment. *Journal of Korean medical science*. 2017;32(1):115-23.
167. Ngo S, Profit J, Gould JB, Lee HC. Trends in Patent Ductus Arteriosus Diagnosis and Management for Very Low Birth Weight Infants. *Pediatrics*. 2017;139(4):e20162390.
168. WANG Chen-Hong SL-P, MA Xiao-Lu, LUO Fang, CHEN Zheng, LIN Hui-Jia, DU Li-Zhong. Factors influencing the prognosis of patent ductus arteriosus in very low birth weight infants. *CJCP*. 2016;18(8):688-93.
169. Loomba R, Nijhawan K. Ibuprofen Versus Indomethacin for Medical Closure of the Patent Arterial Duct: A Pooled Analysis by Route of Administration. *Cureus*. 2015;7(6):e274.
170. Baragatti B, Ciofini E, Scebbba F, Angeloni D, Sodini D, Luin S, Ratto GM, Ottaviano V, Pagni E, Paolicchi A, Nencioni S, Coceani F. Cytochrome P-450 3A13 and endothelin jointly mediate ductus arteriosus constriction to oxygen in mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2011;300(3):H892-H901.
171. Weber SC, Rheinlaender C, Sarioglu N, Peiser C, Rüdiger M, Obladen M, Koehne PS. The Expression of VEGF and its Receptors in the Human Ductus Arteriosus. *Pediatric research*. 2008;64:340.

172. Lewis TR, Shelton EL, Van Driest SL, Kannankeril PJ, Reese J. Genetics of the patent ductus arteriosus (PDA) and pharmacogenetics of PDA treatment. *Seminars in fetal & neonatal medicine*. 2018;23(4):232-8.
173. Mani A, Meraji SM, Houshyar R, Radhakrishnan J, Mani A, Ahangar M, Rezaie TM, Taghavinejad MA, Broumand B, Zhao H, Nelson-Williams C, Lifton RP. Finding genetic contributions to sporadic disease: a recessive locus at 12q24 commonly contributes to patent ductus arteriosus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(23):15054-9.
174. Yamaguchi H, Wada K, Nagasawa M, Kikusui T, Sakai H, Mizobuchi M, Yoshimoto S, Nakao H. Very Low Birth Weight Monochorionic Diamniotic Twins as a Risk Factor for Symptomatic Patent Ductus Arteriosus. *Neonatology*. 2016;109(3):228-34.
175. Ma Y, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M. Glucocorticoids Suppress the Protective Effect of Cyclooxygenase-2-Related Signaling on Hippocampal Neurogenesis Under Acute Immune Stress. *Molecular neurobiology*. 2017;54(3):1953-66.
176. Slaughter JL, Reagan PB, Bapat RV, Newman TB, Klebanoff MA. Nonsteroidal anti-inflammatory administration and patent ductus arteriosus ligation, a survey of practice preferences at US children's hospitals. *European journal of pediatrics*. 2016;175(6):775-83.
177. Edstedt Bonamy AK, Gudmundsdottir A, Maier RF, Toome L, Zeitlin J, Bonet M, Fenton A, Hasselager AB, van Heijst A, Gortner L, Milligan D, Van Reempts P, Boyle EM, Norman M. Patent Ductus Arteriosus Treatment in Very Preterm Infants: A European Population-Based Cohort Study (EPICE) on Variation and Outcomes. *Neonatology*. 2017;111(4):367-75.
178. Yan H, Ma F, Li Y, Zhou K, Hua Y, Wan C. The optimal timing of surgical ligation of patent ductus arteriosus in preterm or very-low-birth-weight infants: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(9):e19356-e.
179. Li N, Subrahmanyam L, Smith E, Yu X, Zaidi S, Choi M, Mane S, Nelson-Williams C, Behjati M, Kazemi M, Hashemi M, Fathzadeh M, Narayanan A, Tian L, Montazeri F, Mani M, Begleiter ML, Coon BG, Lynch HT, Olson EN, Zhao H, Ruland J, Lifton RP, Mani A. Mutations in the Histone Modifier PRDM6 Are Associated with Isolated Nonsyndromic Patent Ductus Arteriosus. *Am J Hum Genet*. 2016;98(6):1082-91.

180. Solans Pérez de Larraya AM, Ortega Molina JM, Uberos Fernández J, González Ramírez AR, García Serrano JL. Speed of Retinal Vascularization in Retinopathy of Prematurity: Risk and Protective Factors. *Biomed Res Int.* 2019;2019:2721578-.
181. Khorshidifar M, Nikkhah H, Ramezani A, Entezari M, Daftarian N, Norouzi H, Shahiari M, Radfar M, Norinia R, Karimi S. Incidence and risk factors of retinopathy of prematurity and utility of the national screening criteria in a tertiary center in Iran. *Int J Ophthalmol.* 2019;12(8):1330-6.
182. Yau GS, Lee JW, Tam VT, Liu CC, Yip S, Cheng E, Chu BC, Yuen CY. Incidence and Risk Factors of Retinopathy of Prematurity From 2 Neonatal Intensive Care Units in a Hong Kong Chinese Population. *Asia-Pacific journal of ophthalmology (Philadelphia, Pa).* 2016;5(3):185-91.
183. Nugud AA, Nugud S, Nugud A, Nugud AA, Kathamuthu R, Jalal M. Perinatal risk factors for development of retinopathy of prematurity in a tertiary neonatal intensive care unit. *J Taibah Univ Med Sci.* 2019;14(3):306-11.
184. Ng T, Wong IB, Ngo CS, Niduvaje K, Ngiam XY, Sensaki S, Lee LY. Case control study of risk factors and ophthalmological outcomes of very low birth weight infants with Type 1 retinopathy of prematurity. *Singapore medical journal.* 2019.
185. Chang JW. Risk factor analysis for the development and progression of retinopathy of prematurity. *PloS one.* 2019;14(7):e0219934-e.
186. Fortes Filho JB, Eckert GU, Valiatti FB, Dos Santos PGB, da Costa MC, Procianoy RS. The influence of gestational age on the dynamic behavior of other risk factors associated with retinopathy of prematurity (ROP). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2010;248(6):893-900.
187. Karkhaneh R, Mousavi SZ, Riazi-Esfahani M, Ebrahimzadeh SA, Roohipoor R, Kadivar M, Ghalichi L, Mohammadi SF, Mansouri MR. Incidence and risk factors of retinopathy of prematurity in a tertiary eye hospital in Tehran. *The British journal of ophthalmology.* 2008;92(11):1446-9.
188. Dollberg S, Lusky A, Reichman B. Patent ductus arteriosus, indomethacin and necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants: a population-based study. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition.* 2005;40(2):184-8.
189. Beharry KD, Valencia GB, Lazzaro DR, Aranda JV. Pharmacologic interventions for the prevention and treatment of retinopathy of prematurity. *Seminars in perinatology.* 2016;40(3):189-202.

190. Aranda JV, Qu J, Valencia GB, Beharry KD. Pharmacologic interventions for the prevention and treatment of retinopathy of prematurity. *Seminars in perinatology*. 2019;43(6):360-6.

7. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Christina Helena Bode, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Bedeutung des COX-2 Polymorphismus beim Ductusverschluss sehr unreifer Frühgeborener“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

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

Datum

Unterschrift

8. Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Frau Christina Bode 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 Bühner, P Koehne, 38. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, 2012, Abstract veröffentlicht in: Monatsschrift Kinderheilkunde, September 2012, Supplement 1, Seite 142.

Beitrag im Einzelnen: Frau Christina Bode hat gemeinsam mit Frau Stefanie Hort (geb. Berkmann) und Frau Tamara Klippstein retrospektiv die klinischen Daten erhoben und vervollständigt. Dazu wurden im Aktenarchiv der Charité alte Patientenakten bestellt und besonders im Hinblick auf Durchführung der Echokardiographie und deren Ergebnisse bei unserer Studienpopulation vervollständigt. Zudem hat Frau Christina Bode die notwendige DNA-Isolierung und Analyse der Polymorphismen von COX-2 und großen Teilen von CYP3 durchgeführt, die diesem Kongressbeitrag zugrunde liegt. Des Weiteren war Frau Christina Bode an der Auswertung der Daten zur Allel- und Geschlechtsverteilung für das Poster und das Abstract verantwortlich und hat die zugehörigen Tabellen „geschlechtsspezifische Allelhäufigkeit“ und „Häufigkeit der Allelmutationen“ erstellt. Die Laborarbeit erstreckte sich über einen Zeitraum von 21 Monaten.

2. *Vascular endothelial growth factor polymorphism rs2010963 status does not affect patent ductus arteriosus incidence or cyclooxygenase inhibitor treatment success in preterm infants.*

Hannes Sallmon, Tünay Aydin, Stefanie Hort, Anja Kubinski, Christina Bode, Tamara Klippstein, Stefanie Endesfelder, Christoph Bühner, Petra Koehne, *Cardiology in the Young*, Volume 29, Issue 7, July 2019, pp. 893 – 897. Published online June 2020.

Beitrag im Einzelnen: Frau Christina Bode hat gemeinsam mit Frau Stefanie Hort (geb. Berkmann) und Frau Tamara Klippstein retrospektiv die klinischen Daten

erhoben und vervollständigt. Dazu wurden im Aktenarchiv der Charité alte Patientenakten bestellt und besonders im Hinblick auf Durchführung der Echokardiographie und deren Ergebnisse bei unserer Studienpopulation vervollständigt. Zudem hat Frau Christina Bode die notwendige DNA-Isolierung zur Analyse der Polymorphismen des Endothelwachstumsfaktor (VEGF) die der Publikation zugrunde liegen, durchgeführt. Die Laborarbeit erstreckte sich über den Zeitraum von insgesamt 21 Monaten. An der Ausgestaltung der Publikation war sie nicht beteiligt.

Unterschrift, Datum und Stempel der erstbetreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

9. Lebenslauf

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

10. Publikationsliste

- 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 Bühler, P Koehne, 38. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, 2012, Abstract veröffentlicht in: Monatsschrift Kinderheilkunde, September 2012, Supplement 1, Seite 142.

- Vascular endothelial growth factor polymorphism rs2010963 status does not affect patent ductus arteriosus incidence or cyclooxygenase inhibitor treatment success in preterm infants.

Hannes Sallmon, Tünay Aydin, Stefanie Hort, Anja Kubinski, Christina Bode, Tamara Klippstein, Stefanie Endesfelder, Christoph Bühler, Petra Koehne, Cardiology in the Young, Volume 29, Issue 7, July 2019, pp. 893 – 897. Published online June 2020.

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau PD Dr. Petra Koehne für die Bereitstellung dieses spannenden Themas bedanken. Danke für das unerschöpfliche Fachwissen und die Motivation. Unter den zuletzt ohnehin erschwerten Arbeitsbedingungen im Rahmen einer Pandemie und Lockdown nach Lockdown hat Frau Koehne sich trotz eigener Arbeit und vor allem Familie immer die Zeit genommen, um mich bei meiner Arbeit zu unterstützen und mich auch auf zwischenmenschlicher Ebene zu motivieren. Danke dafür!

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Christoph Bühner für freundliche Unterstützung bei dieser Arbeit.

Vielen Dank an Frau PD Dr. Stefanie Endesfelder für die geduldige Unterstützung bei der Arbeit im Labor. Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Boris Metze für die unaufhörliche Hilfe bei der Datenauswertung.

Zuletzt, aber nicht in geringstem Maße weniger wichtig, möchte ich meiner Familie danken. Ohne deren unermüdliche Unterstützung hätte diese Arbeit kein Ende gefunden. Meinem Mann Christian Bode und meinem Sohn Anton Valentin, ihr seid meine kleine Welt und euch im Rücken zu haben, hätte keine bessere Motivation sein können. Ein besonderer Dank gilt dabei auch meinem Vater, Herrn Dr. Gerhard Mayerhofer, der mich bei jedem Schritt meiner Ausbildung und Berufswahl unterstützt hat. Sein wichtigstes Anliegen ist es stets, seine Töchter glücklich zu sehen. Mit seiner ausdauernden Unterstützung und dem Glauben an mich, hat er mir mehr ermöglicht als ich selbst es manchmal für möglich gehalten hätte.

An meine verstorbene Mama, das ist für dich.