Aus der Klinik für Neonatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle des CYP2C8*3-Polymorphismus beim Ductusverschluss sehr unreifer Frühgeborener

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tamara Kristiane Klippstein

aus Hamburg

Datum der Promotion: 09. September 2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I
Abstrakt deutsch III
Abstract english V
Abkürzungsverzeichnis VII
1 Einleitung 1
1.1 Persistierender Ductus arteriosus 1
1.1.1 Physiologie des postnatalen Ductusverschlusses 1
1.1.2 Bedeutung des PDA beim Frühgeborenen 7
1.1.3 Diagnostik 9
1.1.4 Therapie 9
1.2 Cytochrom P450 Enzyme – Eigenschaften und Funktion 12
1.2.1 CYP2C8 14
1.2.2 Polymorphismen von CYP2C8 15
1.2.3 Die Bedeutung von CYP2C8-Polymorphismen für den Ibuprofen-Stoffwechsel 16
1.3 Fragestellung 18
2 Material und Methoden 19
2.1 Material 19
2.1.1 Verwendete Chemikalien 19
2.1.2 Puffer/Lösungen 19
2.1.3 Kits 20
2.1.4 Enzyme/Primer 20
2.1.5 Molekulargewichtsmarker 20
2.1.6 Verbrauchsmaterialien 20
2.1.7 Geräte 20
2.1.8 Software 21
2.2 Methoden 21
2.2.1 Studienpopulation 21
2.2.2 Vorgehen bei der DNA-Analyse 21
2.2.3 DNA-Isolierung 22
2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion zur DNA-Amplifikation 24
2.2.5 Nachweis eines Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus 26
2.2.6 Agarose-Gel-Elektrophorese 28

2.2.7 Datenauswertung 29
2.2.8 Statistik 29
3 Ergebnisse 31
3.1 Population 31
3.2 Klinisches Profil der Gesamtpopulation 31
3.3 Klinisches Profil der Studienpopulation 34
3.4 CYP2C8*3 Untersuchung 36
3.4.1 Allelfrequenz der Gesamtpopulation 36
3.4.2 Allelfrequenz der Studienpopulation 37
3.4.3 CYP2C8*3 und Verschlusszeitpunkt eines nicht therapiebedürftigen PDA 38
3.4.4 Versagen der COX-Hemmer-Therapie 40
3.5 Morbidität und CYP2C8*3 43
3.6 Mehrlings-Betrachtung 45
3.7 Einfluss der Ethnizität 46
4 Diskussion 48
4.1 Klinisches Profil der Gesamt- und der Studienpopulation 48
4.2 Allelfrequenz des CYP2C8*3-Polymorphismus 50
4.3 Der CYP2C8*3-Polymorphismus als genetischer Risikofaktor für einen PDA, hsPDA und typische Frühgeborenenerkrankungen 51
4.4 Der Zusammenhang zwischen CYP2C8*3 und dem Versagen der COX-Hemmer Therapie 54
4.5 Wirksamkeit der COX-Hemmer-Therapie unter Berücksichtigung von Ethnizität und Mehrlingsgeburten 56
4.6 Stärken und Schwächen der Arbeit 57
5 Literaturverzeichnis 59
6 Abbildungsverzeichnis 72
7 Tabellenverzeichnis 73
8 Eidesstattliche Erklärung 74
9 Lebenslauf 75
10 Publikationsliste 76
11 Danksagung 77

Abstrakt deutsch

Der Ductus arteriosus (DA) stellt beim ungeborenen Kind eine Gefäßverbindung zwischen der Aorta und dem Truncus pulmonalis dar. Über diese Verbindung wird intrauterin aufgrund der herrschenden Druckverhältnisse der fetale Lungenkreislauf umgangen.

Bereits pränatal beginnen Umbauprozesse den späteren Verschluss des Ductus arteriosus vorzubereiten. Physiologischerweise verschließt sich dieser postnatal durch verschiedene Mechanismen in den ersten 72 Lebensstunden. Beim Frühgeborenen kann es durch eine Unreife der Verschlussmechanismen zu einem über diesen Zeitraum hinaus persistierenden Ductus arteriosus (PDA) kommen, der zu weiteren Komplikationen führen kann. In diesem Fall wird bei hämodynamisch signifikantem PDA (hsPDA) versucht, durch eine medikamentöse Therapie mit Cyclooxygenase(COX)-Hemmern, oder bei deren Versagen chirurgisch, den Ductusverschluss herbeizuführen. Polymorphismen im CYP2C8-Enzym bewirken eine Veränderung der Metabolisierung von Medikamenten, die über das Cytochrom P450-System abgebaut werden, wie zum Beispiel die COX-Hemmer.

Das Ziel dieser Studie war es, herauszufinden, ob das Vorliegen des CYP2C8*3 Polymorphismus einen Einfluss auf das Auftreten eines hsPDA hat und ob dieser Polymorphismus auch den Erfolg einer COX-Hemmer-Therapie beeinflusst.

Hierzu wurde Desoxyribonucleinsäure (DNA) von Guthrie-Filterkarten, die im Rahmen des Stoffwechselscreenings asserviert worden waren, isoliert und mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Daraufhin wurde mit Hilfe von Restriktionsenzymen das so entstandene DNA-Produkt an einer vorgegebenen Stelle geschnitten. Das etwaige Vorliegen eines Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) wurde dann nach Trennung der DNA-Fragmente per Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid unter Ultraviolett(UV)-Licht sichtbar gemacht.

Insgesamt wurden 864 Very low birth weight(VLBW)-Frühgeborene, darunter 218 Kinder mit therapiebedürftigem hsPDA, auf den CYP2C8*3-Polymorphismus untersucht. Es zeigte sich bei diesen 218 Kindern, dass die Allelfrequenz des mutierten Allels mit 15,6% signifikant höher war als bei der Gesamtpopulation, in der sie nur 10,3% betrug. Diese Beobachtung lässt einen Zusammenhang des CYP2C8*3-Polymorphismus mit dem Auftreten eines hsPDA vermuten. Weitere Betrachtungen ergaben allerdings keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Therapieerfolg der COX-Hemmer-Therapie und Auftreten des CYP2C8*3-Polymorphismus: 5,3% der Responder tragen 4 mutierte Allele, bei den Non-Respondern sind es nur 1,2%. Als bedeutsame Faktoren für den Erfolg der COX-Hemmer-Therapie konnten in

dieser Studie ein höheres Gestationsalter und Geburtsgewicht festgestellt werden. Zudem leiden die Non-Responder signifikant häufiger an einer Frühgeborenenretinopathie (ROP) und einer bronchopulmonalen Dysplasie (BPD).

Abschließend kann man sagen, dass ein Zusammenhang zwischen dem CYP2C8*3-Polymorphismus und dem Auftreten eines hsPDA durch diese Studie erhärtet wurde, wohingegen ein Zusammenhang mit dem Ansprechen auf die COX-Hemmer-Therapie nicht bestätigt werden konnte. Aus diesem Grund erscheint es sinnvoll, weitere Untersuchungen bezüglich möglicher Einflussfaktoren fortzuführen.

Abstract english

The Ductus arteriosus (DA) of the unborn child constitutes a vascular connection between the aorta and the pulmonary trunk during fetal life. It allows the blood to bypass the pulmonary circulation.

Prenatal structural changes of the DA begin in preparation of its postnatal closure and obliteration. Physiologically, DA closure occurs within the first 72 hours of life. In preterm newborns, immaturity of the closure mechanisms can lead to a persisting ductus arteriosus (PDA) beyond this point of life. In this case, an attempt at closing a hemodynamically significant PDA (hsPDA) can be made by treating the preterm with COX (Cyclooxygensase)-inhibitors, such as ibuprofen or indomethacin. Today, surgical PDA ligation is a rescue therapy for those infants in whom COX-inhibitor treatment failed to close the duct. Polymorphisms in the CYP2C8-enzyme can lead to altered metabolizing patterns of drugs metabolized by the cytochrome P450 system, e.g. COX-inhibitors.

*The goal of this study was to find out, if the appearance of the CYP2C8*3-polymorphism has an influence on the frequency of a hsPDA and if this polymorphism alters the response to COX-inhibitor-therapy.*

For this purpose, DNA was isolated from blood samples on Guthrie-filter cards, which had been taken beforehand during newborn screening tests, and was amplified using polymerase chain reaction (PCR). The generated DNA-product was attempted to be separated at a specific site by the restriction enzymes. The potential restriction fragment length polymorphism (RFLP) was made visible via ethidium bromide under UV-light after separating the DNA-segments by using gel electrophoresis.

*Altogether, 864 VLBW-preterm infants, among which 218 infants had a hsPDA, were tested for the CYP2C8*3-polymorphism. The latter group showed a significantly higher allele frequency of the mutated allele (15,6%) than the whole study population (10,3%). In light of this observation, a link between the CYP2C8*3-polymorphism and the occurrence of a hsPDA seems possible. Further observations showed no significant connection between the response to COX-inhibitor-therapy and the CYP2C8*3-polymorphism: 5,3% of the responders to COX-inhibitor therapy carry four mutated alleles and 1,2% of the non-responders. In this study, the only relevant factors indicating responsiveness to COX-inhibitor-therapy were higher gestational age and birth weight. Interestingly, among non-responders rethinopathy of prematurity (ROP) and bronchopulmonary dysplasia (BPD) occur significantly more often.*

*In conclusion, a correlation between the CYP2C8*3-polymorphism and the occurrence of a hsPDA seems likely, although an impact on the response to COX-inhibitor-treatment cannot be confirmed. Therefore, it seems to be necessary to continue further studies regarding this subject.*

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
AUC	Area under the curve
bp	Basenpaar
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
Ca^{2+}	Kalzium
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO_2	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
CRIB	Clinical Risk Index for Babies
CYP	Cytochrom
CYP0	kein mutiertes Allel
CYP1	ein mutiertes Allel
CYP2	zwei mutierte Allele
CYP3	drei mutierte Allele
CYP4	vier mutierte Allele
CYPP450	Cytochrom P450
DA	Ductus arteriosus
DASMC	Ductus arteriosus smooth muscle cells
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDHF	Endothelium-derived hyperpolarizing factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EET	Epoxyeicosatriensäuren
ELBW	Extremely low birth weight
ET-1	Endothelin-1
FG	Frühgeborenes
GA	Gestationsalter
GG	Geburtsgewicht
ddH_2O	Demineralisiertes Wasser
HE	Heterozygot
HO	Homozygot

hsPDA	hämodynamisch signifikanter PDA
IVH	Intraventrikuläre Hämorrhagie
KG	Körpergewicht
LA:Ao-Ratio	Verhältnis linker Vorhof zur Aortenwurzel
LT	Lebenstag
$MgCl_2$	Magnesium-Chlorid
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NEC	Nekrotisierende Enterokolitis
NO	Stickstoffmonoxid
NT-proBNP	N-terminales B-natriuretisches Peptid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDA	Persistierender Ductus arteriosus
PG	Prostaglandin
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
PVL	Periventrikuläre Leukomalazie
RDS	Atemnotsyndrom
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
ROP	Frühgeborenenretinopathie
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus
SSW	Schwangerschaftswoche
TGF-ß	Transforming growth factor ß
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenprozent
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VLBW	Very Low Birth Weight
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Persistierender Ductus arteriosus

1.1.1 Physiologie des postnatalen Ductusverschlusses

Historie

Die heute als Ductus arteriosus (DA) bekannte fetale Struktur wurde erstmals von Galen beschrieben (1). Jedoch wurde seine Funktion erst im 17. Jahrhundert deutlich, als Harvey den Blutkreislauf entdeckte (2). Erst viele Jahre später erkannte Virchow den histologischen Unterschied zwischen dem DA und anderen großen Arterien (3). Zur Analyse der Verschlussmechanismen des DA und deren Interventionsmöglichkeiten ist die Kenntnis der physiologischen Abläufe unerlässlich.

Eigenschaften des DA

Der DA entwickelt sich embryologisch aus der linken sechsten Pharyngealbogenarterie. Er bildet im fetalen Blutkreislauf eine Gefäßverbindung zwischen dem Truncus pulmonalis und der Aorta descendens (Abbildung 1) (4). In utero fließt ca. ein Drittel des Herzzeitvolumens über das Foramen ovale in den linken Vorhof und wird von dort vornehmlich zur zerebralen Versorgung in die Aorta ascendens ausgeworfen. Die übrigen zwei Drittel werden in den Truncus pulmonalis geleitet, wobei aufgrund des erhöhten Gefäßwiderstandes im Lungenkreislauf davon lediglich 8% durch die Lunge fließen. Der größere Teil nimmt den Weg über den DA in die Aorta descendens, die den gleichen Druck wie der Truncus pulmonalis aufweist. Nach Vermischung des sauerstoffreichen Blutes mit dem sauerstoffärmeren Blut aus dem DA wird der Rest des fetalen Körpers über den systemischen Kreislauf versorgt.

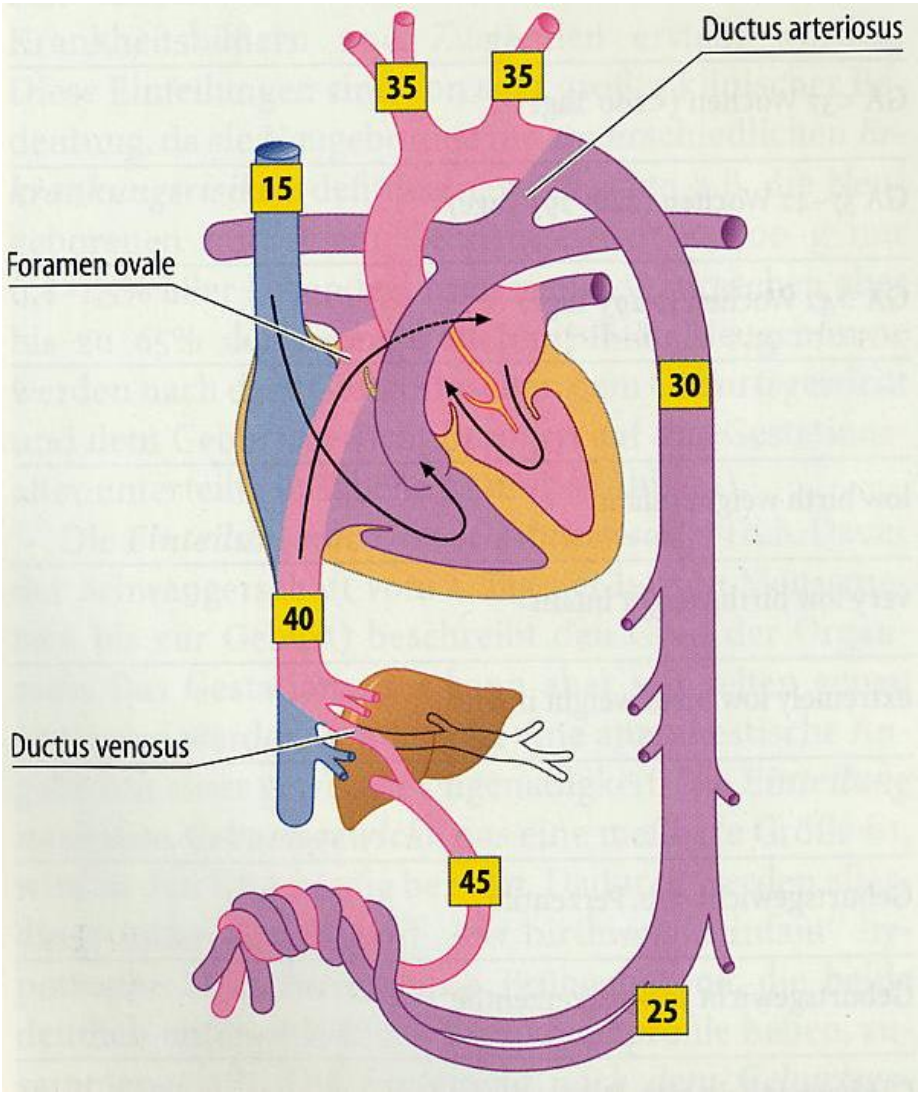


Abbildung 1: Der fetale Blutkreislauf (5).
Die Zahlen in den Kästchen beziehen sich auf Sauerstoffpartialdruck (pO_2)-Angaben in mmHg.

Obgleich der DA in direkter Nachbarschaft zu anderen großen Gefäßen des Körpers - der Aorta und dem Truncus pulmonalis - mit Eigenschaften von Arterien des elastischen Typs liegt, weist er einige essentielle histologische Unterschiede zu diesen auf (6). So handelt es sich beim DA histologisch eher um ein Gefäß des muskulären Typs. Während die Media der Aorta und des Truncus pulmonalis vorwiegend aus konzentrisch, ringförmig angeordneten elastischen Fasern besteht, weist die des DA längs- und spiralförmig angeordnete glatte Muskelzellen, umgeben von ringförmig angeordneten elastischen Fasern auf (7). Zu Beginn der Gestation findet sich im DA eine einzel-, lokal auch zweilagige, Lamina elastica interna sowie eine unregelmäßige und dünne Intima. Zum Ende der Fetalzeit kommt es im Rahmen der pränatalen morphologischen Veränderungen zu einer Fragmentierung der Lamina elastica interna und es entwickeln sich neointimale Kissen aus glatten Muskelzellen, die als Sauerstoffsensor fungieren, sowie

Endothelzellen, die für die Synthetisierung vasoaktiver Substanzen verantwortlich sind (4). Dieser genetisch vorprogrammierte Umbau stellt eine wesentliche Besonderheit des DA dar (8-10).

Verschluss bei Reifgeborenen

Nach der Geburt verschließt sich der DA in der Regel in den ersten 24-72 Lebensstunden (11). Besteht der DA über 72 Stunden nach der Geburt, so spricht man von einem persistierenden Ductus arteriosus (PDA) (12). Beim Reifgeborenen stellt der PDA mit ca. 0,06 % der Neugeborenen eine eher seltene Diagnose dar. Mit zunehmender Unreife der Kinder nimmt jedoch auch das Auftreten eines PDA zu. Bei Kindern mit einem Geburtsgewicht (GG) unter 1500 g (Very low birth weight, VLBW) tritt in etwa 30% der Fälle ein PDA auf (13). Wiegen die Kinder bei der Geburt unter 1000 g (Extremely low birth weight, ELBW) steigt die Inzidenz des PDA sogar auf 50-70% (14-16). Ohne Therapie schließt sich ein PDA bei ca. 34% der ELBW-Kinder innerhalb der ersten 2-6 Lebenstage (14) und bei der Mehrzahl der VLBW-Kinder innerhalb des ersten Lebensjahres (17).

Für das Offenbleiben des DA in utero sind verschiedene Faktoren verantwortlich (Abbildung 2):

- Generell sind die *Ductus arteriosus smooth muscle cells* (DASMC) in höherem Maße sensitiv gegenüber Ca^{2+} als vergleichbare glatte Muskelzellen der Aorta oder der Pulmonalarterien (18).
- Ein niedriger arterieller Sauerstoffpartialdruck verhindert einerseits die Sauerstoff-vermittelte Kalzium (Ca^{2+})-Ausschüttung sowie andererseits die Sauerstoff-vermittelte Freisetzung des Vasokonstriktors Endothelin-1 und die sich anschließende Ca^{2+}-Ausschüttung. Insgesamt verhindert dies eine Kontraktion der DASMC (4, 19).
- Ein erhöhter intraluminaler Druck im DA aufgrund der Konstriktion des Lungengefäßbetts (20).
- Weitere wichtige Faktoren zur Offenhaltung sind auf den DA einwirkende vasodilatierende Substanzen. Hierzu gehören Stickstoffmonoxid (NO) sowie Prostaglandine (PGs). NO wird vornehmlich von den Endothelzellen des DA sowie von seinen Vasa vasorum produziert. In Versuchen an Lammfeten zeigte sich, dass NO vor allem in frühen Phasen der Gestation für das Offenhalten des DA verantwortlich ist (21). Die PGs wirken verstärkt in späteren Phasen der Gestation als Hauptvasodilatatoren durch Interaktion mit den Prostaglandin-EP_2-, EP_3- und EP_4-Rezeptoren (21), von denen der EP_4-Rezeptor im dritten Trimenon am stärksten im DA exprimiert wird (22). Von den

PGs wirkt Prostaglandin E_2 (PGE_2) als potentester Vasodilatator (8). Die Produktion der lokal wirksamen PGs findet vor allem in den DASMC statt, jedoch tragen auch zirkulierende PGs aus der Plazenta zur Vasodilatation des DA bei (23). Zwei Faktoren erklären die starke Wirkung der PGs auf den fetalen DA: Zum einen reagiert er im Vergleich zu anderen Gefäßen besonders sensibel auf das Vorhandensein von PGs, und zum anderen ist die PGE_2-Konzentration beim Fetus aufgrund der verminderten pulmonalen Clearance infolge der fehlenden Lungendurchblutung besonders hoch (7, 24).

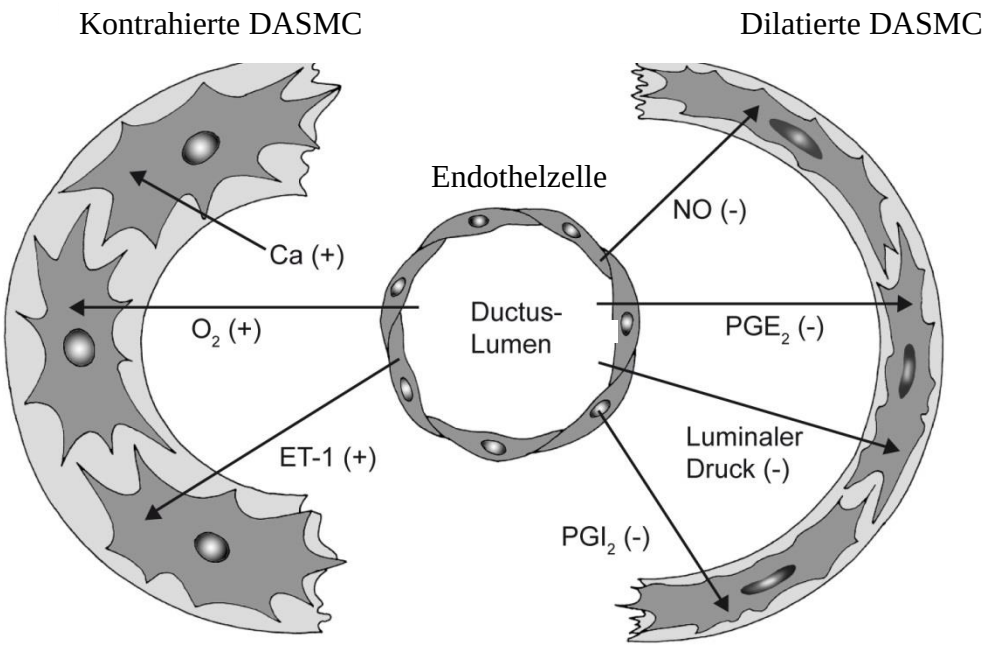


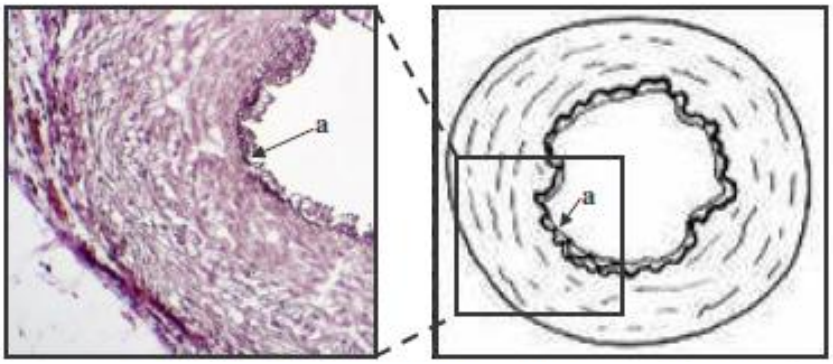
Abbildung 2: Einflussfaktoren auf den funktionellen Ductusverschluss.
Ca – Kalzium, O_2 – Sauerstoff, ET-1 – Endothelin-1, NO – Stickstoffmonoxid, PGE_2 – Prostaglandin E2, PGI_2 – Prostaglandin I2.

Der Verschluss des DA erfolgt in zwei Phasen (25). Zuerst kommt es innerhalb der ersten Stunden nach der Geburt zu einem funktionellen Verschluss, der innerhalb der nächsten Lebenstage bis -wochen zu einem anatomischen Verschluss mit Umbau zum Ligamentum arteriosum fortschreitet (26).

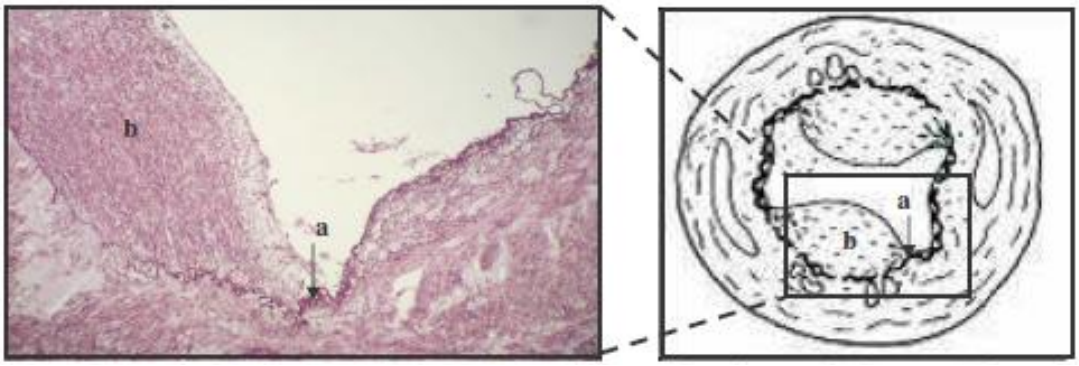
Am funktionellen Verschluss des DA sind folgende Veränderungen der physiologischen Verhältnisse nach der Geburt beteiligt (27): Aufgrund der Abnabelung kommt es zu einem Anstieg des Kohlenstoffdioxid (CO_2)-Partialdruckes, wodurch das Atemzentrum angeregt wird und die eigenständige Atmung des Neugeborenen einsetzt. Durch die Entfaltung der Lungen

kommt es zu einem Anstieg des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks sowie, aufgrund des herabgesetzten Gefäßwiderstandes im Lungenkreislauf, zu einem Abfall des Drucks innerhalb des Ductuslumens (25). Durch Unterbrechung des Plazentakreislaufs steigt zum einen der systemische Gefäßwiderstand, und zum anderen gelangen nun keine der dort gebildeten PGs mehr in den systemischen Kreislauf des Neugeborenen (23). Zusätzlich kommt es durch die gestiegene Lungenperfusion und die einsetzende Atmung zur vermehrten PG-Elimination über die Lunge, woraus eine verringerte PG-Konzentration im Blut resultiert (25). Außerdem kommt es zu einem Verlust der PGE_2-Sensitivität der glatten Muskelzellen des DA. Dieses Zusammenspiel verursacht durch Kontraktion der DASMC den funktionellen DA-Verschluss durch Konstriktion.

In Vorbereitung auf den sich anschließenden anatomischen Verschluss ist es bereits intrauterin ab dem zweiten Trimenon im DA zu einer Fragmentierung der Lamina elastica interna sowie zu einer fortschreitenden intimalen Verdickung und Ausbildung neointimaler Kissen gekommen, die das Lumen des kontrahierten DA weiter einengen (Abbildung 3). Diese neointimalen Kissen entstehen durch die Migration von glatten Muskelzellen aus der Media in die Intima sowie durch Proliferation von luminalen Endothelzellen (10, 25).



1.



2.

Abbildung 3: Intrauteriner Umbauprozess des Ductus arteriosus mit Ausbildung neointimaler Kissen. 1. Unreifer Ductus arteriosus ohne Intimakissen und mit intakter Lamina elastica interna. 2. Ductus arteriosus im fortgeschrittenen Reifestadium mit deutlich ausgebildeten Intimakissen und fragmentierter Lamina elastica interna. a = Lamina elastica interna, b = Intimakissen.

Für den Prozess des anatomischen Umbaus ist eine anhaltende Konstriktion des DA unerlässlich. Diese gilt als Initiationsprozess für den permanenten Verschluss, indem sie zu einer anhaltenden ischämischen Hypoxie der Ductuswand führt (26). Aufgrund der mit steigendem Gestationsalter (GA) zunehmenden Ductuswanddicke, kommt es bereits vor dem vollständigen Sistieren des luminalen Blutflusses zur ischämischen Hypoxie der Ductuswand. Die Ductuswanddicke eines Reifgeborenen beträgt ca. 1-1,2mm. Während die luminalen 400-500µm der Ductuswand durch Diffusion über das DA-Lumen versorgt werden (avaskuläre Zone), wachsen zur Versorgung der äußeren 400-500µm spezielle Versorgungsgefäße von außen in die Ductuswand ein, die Vasa vasorum (25). Kommt es zur Konstriktion der Ductuswand wird auch der Blutfluss in die Vasa vasorum unterbunden, sodass sie obliterieren. Folglich verbreitert sich die avaskuläre Zone auf die gesamte Ductuswanddicke von 1-1,2mm und bewirkt so eine vollständige Ischämie des DA (28).

Diese ischämische Hypoxie hemmt die Bildung von PGs und NO und triggert gleichzeitig die Apoptose von glatten Muskelzellen in der Ductuswand. Auch die Produktion von hypoxie-induzierten Wachstumsfaktoren wie Transforming growth factor ß (TGF-ß) oder Vascular endothelial growth factor (VEGF) sowie anderen pro-angiogenetischen Mediatoren wird angeregt (4, 25). Wie bereits an neugeborenen Pavianen gezeigt werden konnte, bedingen diese Wachstumsfaktoren ein vaskuläres Remodeling durch Dedifferenzierung und Proliferation der DASMC und somit nach 2-3 Wochen (29) den endgültigen anatomischen Verschluss des DA mit Umbau zum Ligamentum arteriosum. (26, 30).

Neueste Untersuchungen vermuten auch einen Zusammenhang zwischen Thrombozytenzahl und Verschlusserfolg des DA (31). So konnten niedrige Thrombozytenzahlen mit einem Verschlussversagen assoziiert werden (32). Die Rolle der Thrombozyten ist jedoch noch nicht abschließend geklärt.

1.1.2 Bedeutung des PDA beim Frühgeborenen

Pathophysiologie des DA-Verschlusses beim Frühgeborenen

Bei Frühgeborenen (FG) kommt es häufig zu einem Ausbleiben des DA-Verschlusses über den 3. Lebenstag hinaus, einem sogenannten PDA. Dies ist durch Defizite in beiden Phasen des Ductusverschlusses bedingt. Durch den niedrigeren intrinsischen Tonus sowie die herabgesetzte Sensitivität des unreifen DA auf die konstriktorische Wirkung von Sauerstoff und das erhöhte Ansprechen auf die vasodilatatorisch wirkenden PGs und NO kann es zur unzureichenden Kontraktion der DASMC und somit zur unvollständigen Konstriktion des DA kommen (12, 33, 34). Bei nicht ausreichender Konstriktion reagiert der unreife DA mit einer Hochregulierung der NO-Synthetase, so dass es zur vermehrten Produktion von NO kommt, was zusätzlich zur Verhinderung des funktionellen Verschlusses beiträgt (21).

Bei Frühgeborenen ist die DA-Wanddicke mit 200µm in der 24. Woche geringer als bei Reifgeborenen (19). Zudem liegen die wenigen vorhandenen Vasa vasorum verteilt in der Adventitia, nicht in der Media (4). Der dünnwandige DA ist somit zur Versorgung der Wand nicht von den Vasa vasorum abhängig, da die Diffusion aus dem Lumen zur Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff ausreicht. Somit kann die Diffusionsstrecke in der Ductuswand nicht durch Obliteration der Vasa vasorum erhöht werden. Zusätzlich finden sich beim Frühgeborenen höhere Glucosekonzentrationen im Gewebe unter Hypoxie, was zu einer erhöhten Hypoxietoleranz führt (35). So kommt es auch bei geringstem luminalen Blutfluss nicht zu einer ausreichenden ischämischen Hypoxie, um die Umbauprozesse zum Ligamentum arteriosum in Gang zu setzen (19).

Die Funktionalität dieser Verschlussmechanismen ist in der Regel proportional zum GA. Somit steigt die Wahrscheinlichkeit eines dauerhaften anatomischen Verschlusses des DA mit steigendem GA.
Bei Frühgeborenen kommt es durch die erhöhte Sensitivität des DA für dilatatorisch wirkende PGs und die erhöhte Zirkulation z.B. proinflammatorischer Zytokine im Rahmen systemischer Infektionen oft zu einer Wiedereröffnung des DA nach nicht vollständigem anatomischen Verschluss (36).

Komplikationen des PDA

Bei Frühgeborenen kann es aufgrund eines Surfactant-Mangels zur Entwicklung eines Atemnotsyndroms (Respiratory Distress Syndrome, RDS) kommen, woraus eine Erhöhung des pulmonalen Gefäßwiderstandes resultiert. Aufgrund der Druckverhältnisse zwischen kleinem und großem Kreislauf führt dies meist zu einem bidirektionalen Shunt über den DA, in selteneren Fällen auch zu einem Rechts-Links-Shunt (37). Nach Rückbildung des RDS sinkt der Gefäßwiderstand im Lungenkreislauf, wodurch dann, infolge des höheren systemischen Drucks in der Aorta im Vergleich zu den Lungenarterien, ein Links-Rechts-Shunt entsteht.
Übersteigt das Shuntvolumen über den DA 50% des linksventrikulären Outputs, sinkt der systemische Druck. Dies kann zu einem sogenannten „ductal steal“-Phänomen führen (38). Hierbei kommt es aufgrund der Minderperfusion des systemischen Kreislaufs zur Unterversorgung der nachgeschalteten Organe. Sind die mesenterialen Gefäße betroffen, kann es aufgrund einer Ischämie zu einer nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) kommen (39). Schwanken die mittleren arteriellen cerebralen Blutdrücke kann eine intraventrikuläre Hämorrhagie (IVH) begünstigt werden (40). Eine verminderte Perfusion der renalen Gefäße bedingt eine potentielle Oligo- oder gar Anurie (27).
Obwohl bei erhöhter Lungenperfusion der Lymphabfluss kompensatorisch ansteigt, ist dieser Mechanismus nach wenigen Tagen erschöpft, und es kann zu einem Lungenödem kommen, was durch den niedrigen onkotischen Druck im Plasma und die erhöhte kapilläre Permeabilität zusätzlich begünstigt wird (25). So kann es, neben erneuter Beatmungsnotwendigkeit, Erhöhung der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration und Spitzendrücke sowie der Unmöglichkeit der Entwöhnung von der maschinellen Beatmung, zu einer daraus resultierenden chronischen Lungenschädigung (Bronchopulmonale Dysplasie, BPD) kommen (41).

1.1.3 Diagnostik

Bislang existiert keine einheitliche Definition zur Diagnose eines hämodynamisch signifikanten PDA (hsPDA). Neben Klinik und Echokardiographiebefund können auch Laborparameter zur Diagnostik herangezogen werden. Gerade bei extrem unreifen Frühgeborenen ist die klinische Diagnose jedoch unzuverlässig. Typische Symptome wie ein Systolikum, kräftige periphere Pulse, große Blutdruckamplitude oder Verschlechterung der respiratorischen Situation können fehlen, sodass es zu einem sogenannten „silenten Ductus“ kommt (42). Deswegen muss stets neben den klinischen Parametern auch die echokardiographische und dopplersonographische Bewertung des PDA erfolgen. Als echokardiographische Diagnosekriterien gelten: der Nachweis eines DA-Shuntflusses, der Ductusdurchmesser, das Verhältnis von linkem Vorhof zu Aortenwurzel (LA:Ao-Ratio), der diastolische Fluss in der Aorta descendens, das linksventrikuläre Schlagvolumen, der Fluss in der Vena cava superior sowie ein diastolischer Flussverlust in den cerebralen, renalen oder mesenterialen Arterien (41, 43-45). Anhand der Echokardiographie lässt sich ein hsPDA im Mittel 1,8 Tage vor dem Auftreten klinischer Symptome diagnostizieren (46).

Ein neuer ergänzender Ansatz der Diagnostik liegt in der laborchemischen Bestimmung von beispielsweise NT-proBNP, das eine Rechtsherzbelastung anzeigt (47).

1.1.4 Therapie

Bei ca. 60-70% der Frühgeborenen mit einem GA unter 28 Wochen ist im Verlauf eine Ductusintervention notwendig (12). Es bestehen zwei Möglichkeiten der Behandlung, die medikamentöse Therapie mit Cyclooxygenase(COX)-Hemmern oder die chirurgische Ductusligatur.

1.1.4.1 Medikamentös

Die in der Literatur beschriebenen medikamentösen Therapieoptionen des PDA reichen von der prophylaktischen Therapie aller VLBW-Frühgeborenen, unabhängig vom Bestehen eines PDA, über die Behandlung direkt nach Diagnosestellung bis hin zur Medikamentengabe nur bei symptomatischem PDA, wobei eine generelle Empfehlung zum Therapiebeginn derzeit nicht existiert. Zur medikamentösen Therapie stehen momentan grundsätzlich zwei Medikamente, Indometacin und Ibuprofen, zur Verfügung. Da die PGs hauptverantwortlich für die Persistenz des DA sind, liegt der Ansatzpunkt der medikamentösen Therapie darin, die Enzyme, die für die Bildung von PGs verantwortlich sind, COX-1 und -2, zu hemmen. Bei beiden Medikamenten handelt es sich um nichtselektive Hemmer der COX-1 und COX-2.

Indometacin

Obwohl Indometacin seit 1976 in Deutschland verwendet wird (48), ist es hierzulande im Gegensatz zu Ibuprofen zum Ductusverschluss nicht zugelassen und wird daher nur im „off-label-use“ genutzt. Trotzdem war es bis in die 90er-Jahre das Medikament der ersten Wahl (49). Verabreicht wurden in den meisten Studien 0,2 – 0,1 – 0,1 mg/kg Körpergewicht (KG) intravenös im 12-Stunden-Intervall (50), wobei durch ein Fehlen von Studien zum Vergleich unterschiedlicher Dosierungen keine abschließenden Therapieempfehlungen gegeben werden können. Auch existieren keine generellen Empfehlungen zur Therapiedauer (50).

Die Erfolgsrate der Indometacintherapie liegt bei 70-90% (40, 49), obwohl einschränkend gesagt werden muss, dass bei Frühgeborenen mit einem GA ≤26 Schwangerschaftswochen (SSW) das Ansprechen auf die Therapie auf unter 60% sinkt. Bei über 20% der behandelten Frühgeborenen ist außerdem eine Wiedereröffnung des DA zu beobachten (34). Die Wirksamkeit von Indometacin zur Behandlung des PDA wurde in zahlreichen prospektiv randomisierten Studien und Metaanalysen nachgewiesen (34, 48, 49, 51, 52).

Im Rahmen einer eskalierenden Hochdosistherapie mit Indometacin-Einzeldosen von bis zu 1mg/kg Körpergewicht konnte sogar eine Verschlussrate von 98,5% erzielt werden (53).

Trotz der relativ hohen Erfolgsrate, ist der Einsatz von Indometacin durch seine zahlreichen Nebenwirkungen limitiert. Hierbei handelt es sich um gastrointestinale Blutungen (54), eine Verminderung des zerebralen, mesenterialen und renalen Blutflusses mit Reduktion der zerebralen intrazellulären Oxygenierung (55, 56) sowie Beeinträchtigungen der Nierenfunktion (57).

Ibuprofen

Anders als Indometacin ist Ibuprofen bereits seit 2004 zur Behandlung eines hsPDA bei Frühgeborenen mit einem GA unter 34 SSW zugelassen.

Aufgrund des umfangreichen Nebenwirkungsprofils von Indometacin wurde bereits früh nach alternativen COX-Hemmern zum Einsatz in der PDA-Therapie gesucht (58). Seit 1995 wurde Ibuprofen in klinischen Studien zum Ductusverschluss getestet (59). Bei Frühgeborenen zwischen 27-29 SSW wurden 10 – 5 – 5 mg/kg KG intravenös im Abstand von 24 Stunden verabreicht (60), wobei die Erfolgsrate bei 77% lag. In neuen Studien konnte ein verbesserter Erfolg der Ibuprofentherapie bei FG ≤29 SSW mit einem Hochdosisregime von 20 – 10 – 10 mg/kg KG intravenös erzielt werden. Hierbei kam es zu einer Ductusverschlussrate von 86%, während in der Vergleichsgruppe mit Standarddosierung nur eine Verschlussrate von 63%

erreicht wurde. Trotz der höheren Dosierung konnte keine erhöhte Inzidenz von Nebenwirkungen beobachtet werden (61).

Ibuprofen und Indometacin im Vergleich

Obgleich die unterschiedlich ausgeprägte COX-1 und COX-2-Hemmung von Ibuprofen und Indometacin divergierende Wirkungs- und Nebenwirkungsprofile vermuten lässt (62), zeigte eine aktuelle Metaanalyse keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Wirksamkeit beider Medikamente. Hinsichtlich ihrer Nebenwirkungen unterscheiden Indometacin und Ibuprofen sich lediglich darin signifikant, dass es unter Ibuprofentherapie zu einer geringeren Inzidenz von NEC kommt (Abbildung 4) (52).

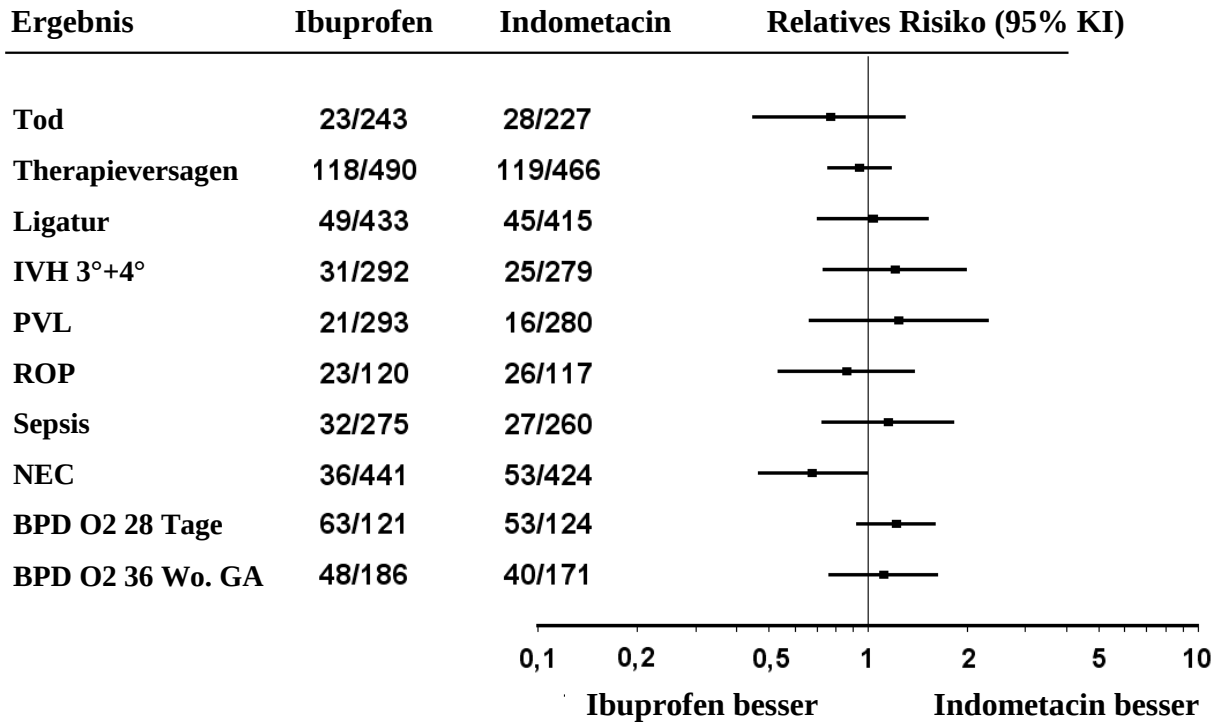


Abbildung 4: Vergleich der Wirkung und der Nebenwirkungen von Ibuprofen und Indometacin (aus (52)). IVH= Intraventrikuläre Hämorrhagie, PVL= Periventrikuläre Leukomalazie, ROP= Frühgeborenenretinopathie, NEC= Nekrotisierende Enterokolitis, BPD= Bronchopulmonale Dysplasie.

1.1.4.2 Chirurgisch

Die chirurgische Ductusligatur war die erste Möglichkeit zur PDA-Therapie und lange Zeit vor der pharmakologischen Therapie etabliert (48). Als „Rescue"-Therapie bei erfolgloser medikamentöser Behandlung oder bei Kontraindikationen gegen eine Behandlung mit COX-Hemmern wird die chirurgische Ductusligatur heute nur noch als Methode der zweiten Wahl

nach der medikamentösen Ductustherapie eingesetzt. Obwohl die Erfolgsraten der chirurgischen Ligatur im Vergleich zur medikamentösen Therapie besser sind, kann es aufgrund des chirurgischen Vorgehens zu einer höheren Komplikationsrate kommen. Dazu gehören die Schädigung des Nervus laryngeus recurrens, ein Pneumothorax, Blutungen und ein Chylothorax bei Schädigung der Lymphbahnen (49). Zudem haben neuere Studien ein schlechteres entwicklungsneurologisches Outcome im Alter von 18 Monaten nach Ductusligatur gezeigt (63).

1.2 Cytochrom P450 Enzyme – Eigenschaften und Funktion

Eigenschaften

Die Cytochrom P 450 (CYP-P450) Enzyme gehören zur Superfamilie der Hämproteine. Als Monooxygenasen katalysieren sie den Einbau eines Sauerstoffatoms aus molekularem Sauerstoff in ihr Substrat (64). Die Hämproteine wurden zuerst als Pigmente in den Mikrosomen der Rattenleber gefunden. Der Name Cytochrom entstammt der Eigenschaft jener Pigmente, ein Spektrum mit Absorptionsmaximum bei 450nm zu emittieren, was wiederum spezifisch für diese Hämproteine ist (65). Diese Enzyme findet man in unterschiedlicher Zahl und Zusammensetzung bei allen Lebewesen.

Die CYP-P450-Enzyme bestehen aus einer Kette von ungefähr 500 AS. Am C-Terminus dieser Kette befindet sich ein Cystein, das essentiell für die Bindung des Häm-Eisens ist. Der N-Terminus der Kette ist reich an Alanin und erlaubt so die nötige Verankerung der CYP-P450-Enzyme an Membranen des Endoplasmatischen Retikulums oder der Mitochondrien, sodass die bekannten membranständigen CYP-P450-Enzyme entstehen (66).

In den 1960er Jahren ging man von einem einzelnen CYP-P450-Enzym aus, welches bis zur Mitte der 1960er Jahre mit dem Metabolismus von Steroiden und Medikamenten in Verbindung gebracht wurde. Anfang der 1970er Jahre waren bereits sechs P450 Enzyme bekannt. Da diese membranassoziiert und hydrophob waren, stellte es sich jedoch als schwierig heraus, die Enzyme zu isolieren und ihre genaue Anzahl zu bestimmen (64) . In den frühen 1980er Jahren konnte die erste cDesoxyribonucleinsäure (cDNA) isoliert werden, die für ein komplettes CYP-P450-Enzym kodierte (67). In zahlreichen folgenden Studien wurden viele weitere CYP-P450-Enzyme gefunden. Bei einem Vergleich der Sequenzen stellte sich eine starke Ähnlichkeit zwischen den einzelnen Enzymen heraus, so dass man davon ausgeht, dass die Superfamilie von einem gemeinsamen Ur-Gen abstammt (68).

Bis heute sind beim Menschen 57 für CYP-P450-Enzyme kodierende Gene und eine variierende Anzahl an Pseudogenen (zwischen 33 und 58) bekannt (69, 70). Diese 57 Proteine lassen sich in 18 Familien und 42 Subfamilien unterteilen.

Die Einteilung erfolgt nach dem Prozentsatz der Aminosäure (AS)-Sequenz-Übereinstimmung. Bei einer Identität von mehr als 40% werden die Enzyme einer gemeinsamen Familie zugeteilt. Diese wird mit einer arabischen Zahl gekennzeichnet. Enzyme, die sich zu mehr als 55% in ihren AS-Sequenzen gleichen, gehören derselben Subfamilie an, die durch einen Buchstaben nach der Zahl kenntlich gemacht wird. Mitglieder einer Subfamilie werden zeitlich nach ihrer Entdeckung mit arabischen Zahlen markiert, die den Buchstaben folgen. So kommt es zum Beispiel zur Familie CYP2 (>40% gleiche AS), mit der Subfamilie CYP2C (>55% gleiche AS) und den einzelnen Mitgliedern dieser Subfamilie CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 und CYP2C19 (68, 71).

Funktion

Die CYP-P450-Enzyme stellen die Hauptkatalysatoren der Phase I–Reaktion der Biotransformation dar. Hierbei werden unpolaren Gruppen durch Oxidation oder Reduktion funktionelle Gruppen hinzugefügt (69). Die Reaktionen finden vornehmlich in der Leber, zu einem geringeren Anteil aber auch in anderen Organen des menschlichen Körpers statt (64).

Die Enzyme sind katalytisch am Metabolismus einer großen Anzahl von Xeno- und Endobiotika beteiligt (70). Zu den endogenen Stoffen, die metabolisiert werden, gehören u.a. gesättigte und ungesättigte Fettsäuren, Steroide, Vitamin A und D (64). Daneben stellen exogene Substanzen, wie Medikamente oder Umweltchemikalien, auch eine sehr wichtige Substratklasse dar (72). So geht man davon aus, dass ein Viertel der 57 CYP-P450-Enzyme an der Verstoffwechselung von Xenobiotika beteiligt ist (73). CYP1, CYP2 und CYP3 zusammen metabolisieren mehr als 90% der eingenommenen Medikamente, während die Substrate anderer CYP-P450-Enzyme eher endogene Substanzen sind (64, 73).

Bei der Metabolisierung der Substrate kommt es meist zur Detoxifikation der Substanzen. Es kann jedoch auch zur Entstehung toxischer Metabolite kommen, die potentiell kanzerogen sein können (64).

Die Aktivität der Enzyme ist modifizierbar. Durch bestimmte Induktoren oder Substratakkumulation kann es zur Steigerung der Enzymaktivität kommen, während Inhibitoren die Aktivität reduzieren (74, 75). Diese Regulation geschieht über Agonisierung oder Antagonisierung der Transkriptionsfaktoren (69).

Betrachtet man die Spiegel der einzelnen CYP-P450-Enzyme im Gewebe der Leber, so fällt eine hohe Variabilität auf. Aufgrund genetischer Unterschiede kann es bei manchen Personen sogar

zum kompletten Fehlen einiger Enzyme kommen. Diese Konstellation führt zur Akkumulation der Substrate dieser Enzyme. Man nennt Individuen mit fehlenden Enzymen *poor metabolizer*, während solche mit normalen Enzymspiegeln als *extensive metabolizer* bezeichnet werden.

1.2.1 CYP2C8

Die größte CYP-Familie beim Menschen ist die CYP2-Familie, deren Subfamilie CYP2C aus vier Genen besteht: CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 und CYP2C19 (64, 69). Alle vier Gene liegen auf dem Chromosom 10q24 in der folgenden Reihenfolge: Cen-CYP2C18-CYP2C19-CYP2C9-CYP2C8-Tel (76). Alle 4 Gene sind genetisch polymorph. Zusammen metabolisieren die 4 Enzyme dieser Subfamilie 20-50% der verabreichten Medikamente (64, 76, 77).

Von den 9 Exons des CYP2C8-Gens befinden sich in Exon 3, 5 und 8 Einzelnukleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNPs) (78, 79) .

Das CYP2C8-Enzym ist mit einer Größe von 31kb das kleinste der CYP2C-Subfamilie, im Gegensatz zu CYP2C9 mit 39kb, CYP2C18 mit 55kb und CYP2C19 mit 91kb (80).

Trotz der großen Ähnlichkeit ihrer AS-Sequenz ist CYP2C8 aus mehreren Gründen klar abgrenzbar gegenüber den anderen Enzymen der CYP2C-Subfamilie: das uncharakteristisch große aktive Zentrum, die hohe Substratspezifität, die extrahepatische Expression und die hohe Modifizierbarkeit der enzymatischen Aktivität.

Zur Strukturanalyse des Enzyms wurde eine Röntgenkristallographie herangezogen. Das aktive Zentrum ist T- oder Y- förmig mit mindestens 48 aktiven AS-Resten, die an der Bindung der Substrate in das aktive Zentrum beteiligt sind. Mit einer Größe von 1438 $Å^3$ hat das Enzym ein uncharakteristisch großes aktives Zentrum, welches auch die Metabolisierung von relativ großen Substraten ermöglicht (80, 81).

Trotz der relativ hohen AS-Sequenz-Identität der CYP2C-Enzyme hat CYP2C8 eine hohe Substratspezifität. Die Substrate von CYP2C8 variieren in Größe, Struktur und pK_a-Werten, müssen jedoch relativ groß und leicht azidotisch, basisch oder neutral sein. Das prototypische Substrat ist Paclitaxel, ein Zytostatikum der Gruppe der Taxane (82, 83).

Die mRNA von CYP2C8 lässt sich außer in der Leber, in der sie 7% der Gesamt-CYP-Menge ausmacht (84), auch in extrahepatischen Geweben nachweisen. Dazu gehören die Niere, Nebenniere, das Gehirn, die Brustdrüse, der Uterus, die Ovarien, das Herz und Brustkrebs-Tumoren (79, 85, 86).

Das CYP2C8-Enzym lässt sich durch verschiedene Inhibitoren und Induktoren in seiner enzymatischen Aktivität modifizieren. Der selektive Inhibitor Montelukast reduziert die

Aktivität, wohingegen Rifampicin oder auch Dexamethason in niedrigen Dosierungen als Induktoren die enzymatische Aktivität steigern (84).
Durch die Metabolisierung von über 60 verschiedenen Medikamenten hat CYP2C8 einen Anteil von 5-8% an der Gesamtmetabolisierung von Medikamenten im Körper, die in Phase I-Reaktionen eliminiert werden. Zu den Substraten gehören Chloroquin (87) und Statine (88).
Auch für R-(-)-Ibuprofen ist CYP2C8 Hauptmetabolisierer (89, 90). Während R-(-)-Ibuprofen über eine 2- & 3- Hydroxylierung von CYP2C8 metabolisiert wird, geht man davon aus, dass der Abbau von Indometacin vornehmlich über CYP2C9 durch O-Demethylierung stattfindet.

1.2.2 Polymorphismen von CYP2C8

Polymorphismus

Der Polymorphismus ist eine Genom-Veränderung, die bei mehr als 1% der Bevölkerung auftritt. Ähnlich wie bei Mutationen gibt es auch bei Polymorphismen diejenigen mit und diejenigen ohne Bedeutung. Bei einem SNP kommt es zu einem einzelnen Basenaustausch in der Desoxyribonucleinsäure (DNA). Dieser kann bei der Translation entweder einen Aminosäureaustausch im Protein bedingen oder ohne weitere Konsequenz bleiben.

CYP2C8

Bis heute sind 15 Varianten von CYP2C8 bekannt, die mit *1B bis *14 bezeichnet sind. Diese beinhalten zum Beispiel SNPs oder andere Veränderungen des Genoms. Die häufigsten sind *2, *3, *4 und *5. Diese Varianten sind in verschiedenen Ethnizitäten unterschiedlich verteilt. *2 kommt vor allem in der afro-amerikanischen Bevölkerung, mit einer Allelfrequenz von 4-18%, vor (91, 92) und selten bei Kaukasiern (93). Bei dieser Variante kommt es durch den SNP 805 A>T zu einem Austausch der AS Phenylalanin zu Isoleucin an Position 269. Dies führt zu einem Aktivitätsverlust von 50-85% im Vergleich zur Normvariante (70, 75). *4 kommt in der kaukasischen Bevölkerung mit einer Allelfrequenz von 7-11% vor (93, 94). Es kommt durch den SNP 792 C>G zu einem AS-Austausch von Isoleucin zu Methionin. Ein Aktivitätsverlust wurde nicht beschrieben (93). *5 ist nur in der japanischen Bevölkerung bekannt, die Allelfrequenz liegt bei 0,25-0,9% (95, 96). Durch eine Deletion an Position 475 kommt es zu einem Frameshift an Codon 159 und somit zu einem verfrühten Stop-Codon in Codon 177. Dies führt zum Fehlen von über 60% der Proteinstruktur, inklusive der Substratbindungszentren und somit zu einem inaktiven Enzym (95, 97).
Die am besten untersuchte Variante ist *3. Sie beinhaltet 2 SNPs und tritt mit einer Allelfrequenz von 11-23% (91, 92, 98, 99) in der kaukasischen Bevölkerung auf, bei Afro-Amerikanern

hingegen sehr selten, bei Japanern wurde sie gar nicht nachgewiesen. In Exon 3 führt ein SNP zu dem Basenaustausch 416 G>A, was dazu führt, dass an Position 139 statt Arginin Lysin eingefügt wird. In Exon 8 kommt es zum Basenaustausch 1196 A>G und somit zu einem Tausch von Lysin zu Arginin an der Position 399 (Abbildung 5). Diese Variante bewahrt in vitro einen unveränderten Metabolismus von Amiodaron, einem Antiarrhythmikum mit hauptsächlicher Wirkung über die Kalium-Kanäle, weist jedoch eine um 50% reduzierte Verstoffwechselung von Paclitaxel auf (91, 93). Auch in vivo ist bei CYP2C8*3 ein veränderter Metabolismus von verschiedenen Medikamenten zu beobachten, z.B. eine reduzierte Clearance von Ibuprofen (79). Es scheint eine Verbindung zwischen CYP2C8*3 und CYP2C9*2 zu geben, denn 96% der Individuen, die CYP2C8*3 tragen, tragen auch CYP2C9*2, und 73-85% der Individuen, die CYP2C9*2 tragen, tragen auch CYP2C8*3 (98, 100). Auch eine andere Studie findet bei 25,4% der Individuen ein Vorhandensein beider CYP-Varianten, wobei nach Errechnung der Allelfrequenzen nur 9,7% beide Varianten tragen sollten (98).

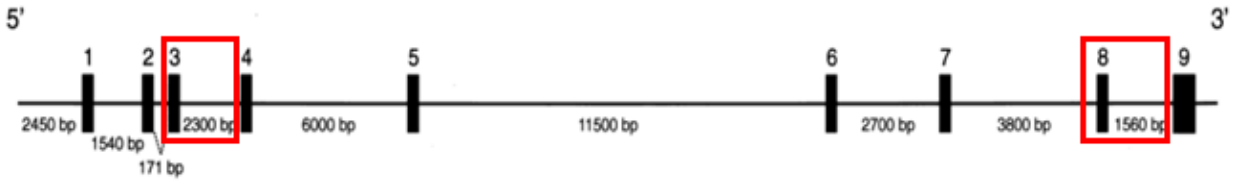


Abbildung 5: Struktur des CYP2C8-Gens, Markierung der Veränderungen bei CYP2C8*3 aus (79).

1.2.3 Die Bedeutung von CYP2C8-Polymorphismen für den Ibuprofen-Stoffwechsel

Die meisten Ibuprofen-Präparate enthalten eine Mischung aus den beiden Ibuprofen-Enantiomeren R-(-)-Ibuprofen und S-(+)-Ibuprofen. Die größte antiinflammatorische Wirkung geht von S-(+)-Ibuprofen aus. Es hat eine höhere Wirksamkeit bei der Hemmung der Thrombozytenaggregation sowie hinsichtlich der Hemmung der Synthese von Thromboxanen und PGs (101-103). Bedenkt man jedoch, dass in vivo durch unidirektionale Umwandlung 60% des R-(-)-Ibuprofen zu S-(+)-Ibuprofen konvertiert werden (104), wird klar, dass beide Formen einen wichtigen Einfluss auf die Wirksamkeit von Ibuprofen haben (102, 105).

In vitro Studien haben gezeigt, dass CYP2C8 vor allem die Metabolisierung von R-(-)-Ibuprofen übernimmt, während CYP2C9 das S-(+)-Ibuprofen metabolisiert. (89, 106)

Betrachtet man den Ibuprofen-Stoffwechsel von Individuen, die die CYP2C8-Varianten *1/*1 (Wildtyp, WT), *1/*3 (Heterozygot, HE) und *3/*3 (Homozygot, HO) aufweisen, in vivo, so erkennt man deutliche Unterschiede in der Verstoffwechselung. Verschiedene Parameter werden zur Beurteilung der Metabolisierung herangezogen. Dazu gehören die area under the curve

(AUC), die Plasmahalbwertszeit ($t_{1/2}$) sowie die Clearance. Vergleicht man die AUC für die homozygoten und heterozygoten Individuen, so weisen diese eine 2,2-fach (HE) und sogar 8,7-fach (HO) erhöhte AUC im Vergleich zum WT auf (98). Auch die Plasmahalbwertszeit ist für heterozygote und homozygote Individuen erhöht: 2,0 h (WT), 4,2 h (HE) und 9,0 h (HO) (90). Die Clearance spiegelt dieses Bild ebenso wider. Während die WT-Individuen eine Clearance von 3-4 L/h haben, nimmt diese von HE- (2,2-2,8 L/h) zu HO-Individuen (0,4- 2,1 L/h) immer weiter ab (70, 98).

Hieraus lässt sich ableiten, dass die Variante CYP2C8*3 mit einem reduzierten Metabolismus und einer verringerten Clearance von R-(-)- und S-(+)- Ibuprofen assoziiert ist. Es findet sich keine Enantiospezifität. Das bedeutet, dass die Träger dieser Variante das Ibuprofen langsamer verstoffwechseln und somit länger eine höhere Ibuprofen-Konzentration im Körper haben (slow metabolizer), wohingegen Träger des Wildtyps das Ibuprofen schneller verstoffwechseln (fast metabolizer).

Bislang gibt es keine eindeutigen Erkenntnisse darüber, ob CYP2C8- oder CYP2C9-Varianten den Metabolismus von Indometacin beeinflussen.

Es wurde gezeigt, dass die postnatale Ausreifung von CYP2C8 im Verlauf der ersten 8 Tage dazu führt, dass die Clearance von Ibuprofen bis zum 8. Lebenstag deutlich zunimmt (107).

Die Variante CYP2C8*3 steht im Verdacht, für gastrointestinale Blutungen nach der Einnahme von COX-Hemmern verantwortlich zu sein. Es ist jedoch unklar, ob dies durch die Akkumulierung der Medikamente selbst geschieht, oder ob Produkte alternativer Metabolisierungswege dafür verantwortlich sind (108).

1.3 Fragestellung

Bei Frühgeborenen, deren DA sich nicht innerhalb von 72h verschließt und hämodynamisch bedeutsam ist, wird in der Regel eine Therapie mit COX-Hemmern begonnen. Bis zu 40% der Frühgeborenen, die mit COX-Hemmern behandelt werden, sprechen auf die Therapie nicht an (109-111). Diese sogenannten Therapieversager sind häufig die kleinsten und unreifsten Kinder an der Grenze zur Lebensfähigkeit. Da sich diese Kinder oft nur schwer von der Beatmung entwöhnen lassen, wird bei ihnen eine sekundäre Ligatur erwogen. Bei der chirurgischen Ligatur kommt es jedoch häufiger zu Komplikationen, vor allem unter Berücksichtigung der Langzeitergebnisse. Durch die steigende Zahl sehr unreifer Frühgeborener und deren höhere Überlebenswahrscheinlichkeit aufgrund der verbesserten medizinischen Versorgung kommt es bei diesen Kinder immer häufiger zu einem Therapieversagen der COX-Hemmer mit der Problematik einer sekundär erforderlichen Ductusligatur. Daher ist es notwendig, die medikamentöse Therapie zu optimieren, um so die Therapieerfolgsrate der COX-Hemmer zu steigern. Es ist bekannt, dass Polymorphismen im CYP-P450-System für den veränderten Abbau von COX-Hemmern verantwortlich sind. So ist bei Trägern des Polymorphismus CYP2C8*3 ein reduzierter Metabolismus sowie eine verringerte Clearance von Ibuprofen zu beobachten. Hierdurch könnte sich eine Möglichkeit zur individualisierten Pharmakotherapie eröffnen.

Falls ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten des CYP2C8*3-Polymorphismus und der Rate der medikamentös mittels COX-Hemmern erfolgreich erzielten Ductusverschlüsse bestünde, könnte jedem Frühgeborenen nach der Geburt Blut abgenommen und auf den Polymorphismus CYP2C8*3 getestet werden. Trüge das Kind den WT, würde ihm eine erhöhte Dosis der COX-Hemmer zur Ductustherapie verabreicht. Trüge es homozygot den Polymorphismus, so erhielte es eine entsprechend niedrigere Dosierung der COX-Hemmer.

Um den möglichen Einfluss des CYP2C8*3 Polymorphismus im CYP2C8-Enzym auf die Wirksamkeit und den Therapieerfolg der medikamentösen Ductustherapie zu untersuchen, wurde bei 864 VLBW-Frühgeborenen mit und ohne hämodynamisch signifikanten PDA eine Genanalyse bezüglich des Polymorphismus durchgeführt.

Mittels der Genanalyse sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Hat der CYP2C8*3-Polymorphismus einen Einfluss auf die Inzidenz und den Verschlusszeitpunkt eines hsPDA?

2. Kommt es bei VLBW-Frühgeborenen aufgrund des Vorhandenseins des CYP2C8*3-Polymorphismus zu einem veränderten Therapieerfolg der COX-Hemmer?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Chemikalien

Agarose	Fermentas, St. Leon-Rot
Aqua ad injectabilia (ddH_2O)	Braun, Melsungen
Chloroform	Merck, Darmstadt
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (10mg/ml)	Roth, Karlsruhe
Glycogen (1µg/µl)	Fermentas, St. Leon-Rot
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Fermentas, St. Leon-Rot
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumacetat (3M; pH 5,2)	Fermentas, St. Leon-Rot
Phenol	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.2 Puffer/Lösungen

dNTP Mix (2mM)	Fermentas, St. Leon-Rot
10x NE Puffer 4	New England Biolabs, Frankfurt am Main
50x TAE-Elektrophorese Puffer	40mM Tris, 20mM Essigsäure, 1mM EDTA, Fermentas, St. Leon-Rot
PCI	25 (v/v) Phenol, 24 (v/v) Chloroform, 1 (v/v) Isoamylalkohol
CI	24 (v/v) Chloroform, 1 (v/v) Isoamylalkohol
Puffer A	0,1M NaCl; 0,05mM Tris; 5mM EDTA; (pH 7,5)
TE-Puffer	10mM Tris/HCl; pH 7,4 und 1mM EDTA; (pH 8,0)
Puffer Tango (10x mit BSA)	Fermentas, St. Leon-Rot
10x DreamTaqTM Green Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
1x Elektrophorese-Puffer	1 (v/v) 50x TAE-Elektrophorese Puffer, 49 (v/v) ddH_2O

10% SDS	10 (v/v) SDS
70% Ethanol	70 (v/v) Ethanol

2.1.3 Kits

MSB®spin PCRapace (500)	Invitek, Berlin

2.1.4 Enzyme/Primer

BseRI, 4U/µl	New England Biolabs, Frankfurt am Main
DreamTaq DNA Polymerase (5U/µl)	Fermentas, St. Leon-Rot
PdmI (XmnI), 10U/µl	Fermentas, St. Leon-Rot
Proteinase K (>30U/mg)	Promega, Mannheim
CYP-3-F-Primer (AGGCAATTCCCCAATATCTC)	BioTeZ, Berlin
CYP-3-R-Primer (ACTCCTCCACAAGGCAGTGA)	BioTeZ, Berlin
CYP-8-F-Primer (CTTCCGTGCTACATGATGACg)	BioTeZ, Berlin
CYP-8-R-Primer (CTGCTGAGAAAGGCATGAAG)	BioTeZ, Berlin

2.1.5 Molekulargewichtsmarker

DNA-Ladder, 50bp, 0,1µg/µl	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Reaktionsgefäße 1,5ml, 0,2ml	Eppendorf, Hamburg
Pipetten und Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Falconröhrchen (50ml)	Falcon BD, Heidelberg

2.1.7 Geräte

Elektophoresekammer	Bio-Rad, München
Mastercycler, ep gradient S	Eppendorf, Hamburg
MS1 Minishaker	Ika-Works, Wilmington, USA
Mikrowelle	Panasonic, Hamburg
Spektrophotometer, ND-1000	Kisker-Biotech, Steinfurt
Stromversorgungsgerät	Hoefer, Holliston, USA
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
UV-Dokumentationsgerät	UVsolo Biometra, Göttingen

UV-Dokumentationsgerät	Syngene, Cambridge, UK
Video Graphic Printer, UP-890 CE	Sony, Köln
Zentrifuge, Biofuge fresco	Heraeus, Osterode
Zentrifuge, Megafuge 1.0 R	Heraeus, Osterode

2.1.8 Software

Microsoft Office Version 2010	Microsoft, Redmond, Washington, USA
IBM SPSS Version 22	SPSS inc.

2.2 Methoden

2.2.1 Studienpopulation

Es wurden 1119 VLBW-Kinder mit und ohne PDA, die an der Charité im Zeitraum zwischen 1995-2008 geboren wurden, in die Studie eingeschlossen. Ihnen wurde am zweiten Lebenstag im Rahmen des routinemäßig zur U2-Vorsorgeuntersuchung durchgeführten Stoffwechselscreenings Kapillarblut aus der Ferse abgenommen. Dieses wurde dann auf mehrere Guthrie-Filterkarten (Abbildung 7) aufgetragen. Zu einigen Patienten gab es keine klinischen Daten, bei einigen anderen Kindern, gerade aus den frühen Jahrgängen, waren wiederum keine Blutproben mehr vorhanden, sodass die zur Polymorphismusanalyse zur Verfügung stehende Gesamtpopulation mit vollständigen Daten letztlich aus 864 VLBW-Frühgeborenen bestand (Abbildung 10, Tabelle 6). Von diesen 864 Kindern hatten 218 einen hsPDA, der medikamentös oder zusätzlich sekundär chirurgisch therapiert wurde. Die Datenerhebung der klinischen Daten erfolgte aus den archivierten Epikrisen und Akten der Patienten. Die daraus erstellte Excel-Datei mit den klinischen Parametern der Kinder blieb bis zur Fertigstellung der Laborexperimente ohne Zuordnung zu den Proben unzugänglich unter Verschluss. Dies ermöglichte eine verblindete Bearbeitung der Proben. Die Blutproben auf den Guthrie-Filterkarten wurden nach der Zustimmung der Eltern während des initialen Krankenhausaufenthaltes gewonnen und für zukünftige Forschungszwecke archiviert. Die erforderliche Zustimmung der Ethikkommission der Charité (Reg. No. EA2/051/09) wurde nach den aktuellen Standards eingeholt.

2.2.2 Vorgehen bei der DNA-Analyse

Die vorhandenen Patientenproben wurden nach DNA-Extraktion aus Vollblut von Screening-Guthrie-Filterkarten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) und Agarose-Gel-Elektrophorese auf die CYP2C8*3-Einzelnukleotid-Polymorphismen in Exon 3 und Exon 8 untersucht (Abbildung 6).

Die Einteilung der Kinder erfolgte in Wildtyp (*1/*1, WT, fast metabolizer), heterozygot (*1/*3, HE) und homozygot (*3/*3, HO, slow metabolizer) (Abbildung 8).

Die im Folgenden beschriebenen Versuchsbedingungen wurden in einer vorangehenden Etablierungsphase bezüglich verschiedener Parameter optimiert. Hierzu zählten die Annealing-Temperaturen der Primer, die DNA-Konzentration, die Magnesium-Chlorid ($MgCl_2$)-Konzentration sowie die Verdaubedingungen bezüglich DNA- und PCR-Produkt-Konzentration. So ergaben sich, ohne nähere Beschreibung der einzelnen Etablierungsschritte, die nachfolgend angegebenen Parameter zur optimalen Versuchsdurchführung.

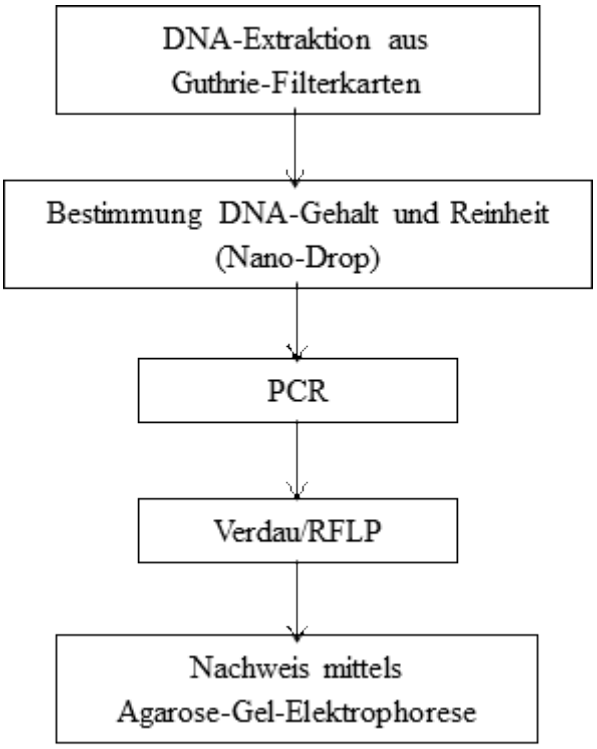


Abbildung 6: Schematischer Ablauf der Versuche zur Polymorphismenanalyse.

2.2.3 DNA-Isolierung

DNA-Präparation aus Guthrie-Filterkarten

Für die Studie wurden aus den Guthrie-Filterkarten (Abbildung 7) die kreisförmigen Blutproben-Areale ausgeschnitten und in 50ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 2ml Puffer A, 200µl Proteinase K-Lösung und 200µl 10% SDS wurden die Filterkartenstanzen über Nacht bei 55°C inkubiert.

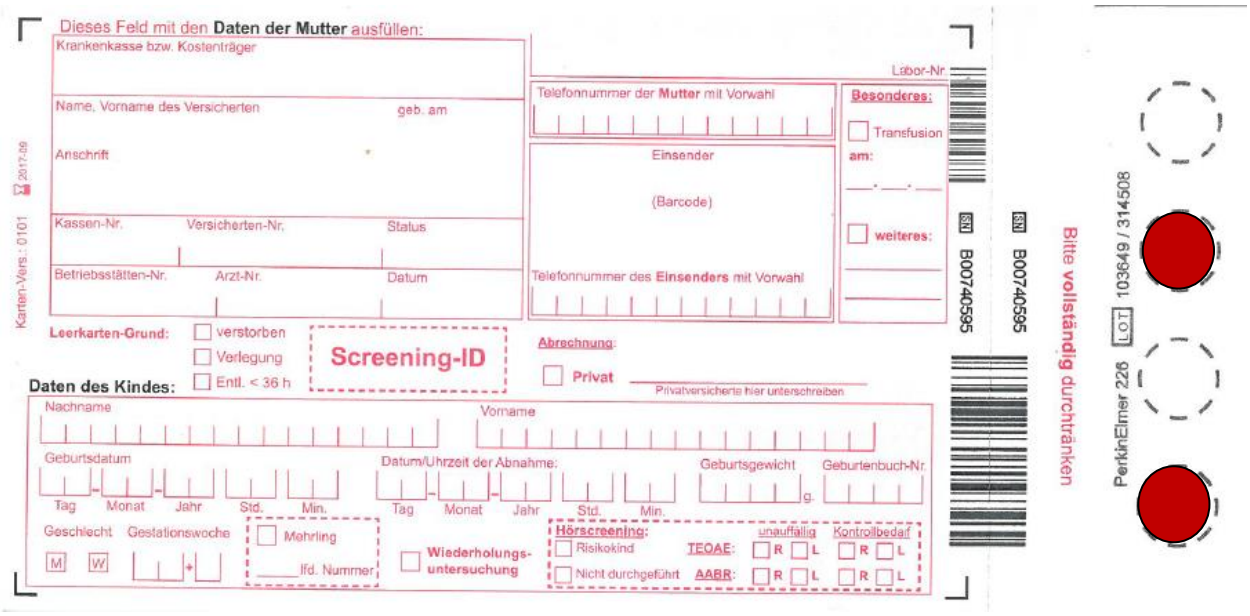


Abbildung 7: Guthrie-Filterkarte für das Stoffwechselscreening im Rahmen der U2-Vorsorgeuntersuchung.

Extraktion der DNA

Nach Entfernung der Filterkartenstanzen am nächsten Tag wurden die Proben bei 3000rpm für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend jeweils 600µl des Überstands auf mehrere 1,5ml Reaktionsgefäße verteilt. Nach Zugabe von 600µl Phenol und Zentrifugation bei 13000rpm für 10 Minuten wurde erneut der Überstand abpipettiert und in ein frisches 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurde ein Volumen (gleiche Menge in µl, wie der abpipettierte Überstand) PCI hinzugefügt und die Probe wieder bei 13000rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der abpipettierte Überstand wurde abermals in ein frisches 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von einem Volumen CI und einer weiteren Zentrifugation, unter den vorangegangenen Bedingungen, überführte man den jetzt erhaltenen Überstand in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß. Dieser Überstand wurde nun mit 1/10 Volumen (1/10 der Menge in µl, wie der abpipettierte Überstand) 3M Natriumacetat, 1 Volumen Isopropanol und 1µl Glykogen versetzt und über Nacht bei -20°C inkubiert.

Alkoholische Fällung der DNA

Nach Zentrifugation der Proben bei 15000rpm am nächsten Tag, wurde der Überstand verworfen und das als kleiner weißer Punkt erkennbare Pellet drei Mal mit 70% Ethanol gewaschen. Zwischen den Waschschritten erfolgte jeweils eine Zentrifugation bei 15000rpm für 5 Minuten. Die nachfolgende Trocknung der Pellets erfolgte in einem Heizblock bei 37°C. Anschließend wurde das Pellet in TE-Puffer resuspendiert, je nach Größe des Pellets mit einem Volumen von

20-80µl. Nach Inkubation bei 55°C für 1-2h wurde die DNA-Konzentration am Nano-Drop massenspektrometrisch gemessen.

2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion zur DNA-Amplifikation

Die PCR ist eine Methode zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen, mit der sich auch kleinste Mengen an DNA nachweisen lassen. Hierzu werden mehrere Substanzen benötigt: die Ursprungs-DNA, eine thermostabile DNA-Polymerase, zwei Primer (einer für beide DNA-Stränge), Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP's), Puffer sowie $MgCl_2$. Es finden 20-40 Zyklen der PCR statt, in denen die Ausgangsmenge der DNA exponentiell vermehrt wird. Die Zyklen bestehen aus drei Schritten:

1. Melting- Bei einer Temperatur von ca. 95°C werden die DNA-Doppelstränge gespalten.
2. Annealing- Die Primer lagern sich bei 40-70°C (abhängig vom GC-Gehalt der DNA, weil GC-Verbindungen mehr Wasserstoffbrückenbindungen ausbauen) an die DNA-Einzelstränge an.
3. Elongation- Die DNA-Polymerase verlängert die Primer am 3'-OH Ende mit dNTP's bei einer Temperatur von 70-72°C. Da die DNA-Polymerase keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzt, können falsch eingebaute dNTP's nicht korrigiert werden. Daraus folgt ein Gemisch aus vielen höchst ähnlichen, aber nicht gleichen, DNA-Sequenzen.

Diese Schritte werden bis zu 40 Mal wiederholt, wobei die Ausgangsmenge an DNA in jedem Schritt verdoppelt wird, sodass man im Anschluss die bis zu 2^{40}-fache DNA-Menge im Vergleich zur Ausgangsmenge erhält.

In diesem Fall wurden Primer verwendet (Tabelle 1), die nach Anlagerung an die komplementäre DNA-Sequenz den potentiell Polymorphismus-enthaltenden Bereich zwischen sich einschließen.

Tabelle 1: Charakterisierung der Primer.

Primer	Sequenz 5‘-3‘	Schmelzpunkt T_M	Produktgröße (bp)
CYP3-F	AGGCAATTCCCCAATATCTC	58 °C	347
CYP3-R	ACTCCTCCACAAGGCAGTGA	62 °C	
CYP8-F	CTTCCGTGCTACATGATGACg*	64 °C	117
CYP8-R	CTGCTGAGAAAGGCATGAAG	60 °C	

*mismatch sense Primer, nähere Erläuterung siehe 2.2.5

Nach Optimierung der Versuchsbedingungen, wurde der in Tabelle 2 angegebene PCR-Ansatz verwendet.

Tabelle 2: Optimierter PCR-Ansatz für Exon 3 und Exon 8.

Komponenten	**Volumen (µl)**		**Endkonzentration**	
	Exon 3	**Exon 8**	**Exon 3**	**Exon 8**
10x DreamTaq Green Buffer	2,5	2,5	1x	1x
dNTP-Mix, 2mM	2,5	2,5	0,2mM	0,2mM
Primer F (50pmol/µl)	1,0	1,0	2pmol	2pmol
Primer R (50pmol/µl)	1,0	1,0	2pmol	2pmol
Template-DNA	X	X	30ng	50ng
DreamTaq DNA-Polymerase (5U/µl)	0,2	0,2	1U	1U
$MgCl_2$	0,0	2,0	2mM	3mM
ddH_2O	X	X		
Gesamtvolumen	**25**	**25**		

Von diesem PCR-Ansatz wurde nun ein Mastermix (Mix aller Komponenten ohne Template-DNA und Wasser) erstellt, von dem daraufhin jeweils 7,2µl (Exon 3) oder 9,2µl (Exon 8) in 0,2ml fassende Reaktionsgefäße überführt wurde. Jetzt wurde, je nach DNA-Konzentration der einzelnen Proben, das Volumen an DNA-Lösung berechnet, welches hinzugefügt werden musste, um eine Endkonzentration von 30 bzw. 50ng zu erreichen. Anschließend wurde so viel Wasser hinzugegeben, bis der Ansatz ein Gesamtvolumen von 25µl hatte. All diese Schritte erfolgten auf Eis, um einen Funktionsverlust der DNA-Polymerase zu vermeiden. Nach kurzer Zentrifugation (Megafuge 1.0 R), um Rückstände an den Reaktionsgefäßwänden zu vermeiden,

wurden die Reaktionsgefäße in den Mastercycler überführt. Am Mastercycler wurden die optimierten Temperaturen für Melting, Annealing und Elongation sowie die optimierte Anzahl an Zyklen eingestellt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Optimiertes PCR-Programm für Exon 3 und 8.

Zyklenzahl		**Temperatur**		**Zeit**	**Reaktion**
Exon 3	**Exon 8**	**Exon 3**	**Exon 8**		
1	1	95°C	95°C	3 min	Initial Melting
35	40	95°C	95°C	1 min	Melting
		54°C	58°C	1 min	Annealing
		72°C	72°C	1 min	Elongation
1	1	72°C	72°C	5 min	Elongation Terminal

2.2.5 Nachweis eines Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

Zum Nachweis von mutierten Allelen des CYP2C8*3-Polymorphismus wurde im Anschluss an die DNA-Amplifikation die RFLP-Technik genutzt. Die hierfür genutzten Restriktionsenzyme zeichnen sich dadurch aus, dass sie DNA an für sie spezifischen Schnittstellen in einzelne Fragmente schneiden. Bei sequenziellen Veränderungen auf DNA-Ebene, wie Insertionen, Deletionen oder Punktmutationen, die die Restriktionsschnittstellen betreffen, ergibt sich nach Spaltung mit geeigneten Restriktionsenzymen ein verändertes Bandenmuster in der Gelelektrophorese. Es wurde ein Restriktionsenzym eingesetzt, das die spezifische Sequenz der DNA erkennt, in der sich der Polymorphismus befinden soll. Falls es sich um Wildtyp-DNA handelte, konnte die Sequenz erkannt und geschnitten werden. Wenn sich an besagter Stelle ein SNP befand, konnte das Restriktionsenzym die veränderte Sequenz nicht mehr erkennen. Somit konnte die DNA nicht gespalten werden.

Falls eine nachzuweisende Mutation keine Restriktionsenzymerkennungssequenz aufweist, wie im Falle des Exons 8, kann durch eine Primer-bedingte Mutagenese, die die SNP umgebende Basenabfolge verändert, in dem amplifizierten PCR-Produkt eine Restriktionsenzymerkennungssequenz modifiziert werden (mismatch sense Primer). Der Nachweis erfolgt dann nachfolgend adäquat über die RFLP-Technik.

Es wurde für Exon 3 das Restriktionsenzym BseRI und für Exon 8 das Enzym PdmI verwendet. Die PCR-Produkte von 347bp für Exon 3 und 117bp für Exon 8 werden bei Erkennung der Sequenz (Wildtyp) in zwei unterschiedlich große Fragmente geschnitten. Abbildung 8

veranschaulicht den Spaltungsvorgang. Genaue Angaben zur Erkennungssequenz und den Produktgrößen sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: Verdau von Exon 3 und Exon 8 mit BseRI und PdmI.

Exon	Enzym	Erkennungssequenz/Schnittstelle	Produkt WT	Produkt HO
Exon 3	BseRI	5‘ … GAGGAG$(N)_{10}$↓… 3‘ 3‘ … ↑$(N)_{10}$CTCCTC… 5‘	2 Fragmente von 310 und 37bp	1 Fragment von 347bp
Exon 8	PdmI	5‘ … GAANN↓NNTTC … 3‘ 3‘ … CTTNN↑NNAAG … 5‘	2 Fragmente von 92 und 25bp	1 Fragement von 117bp

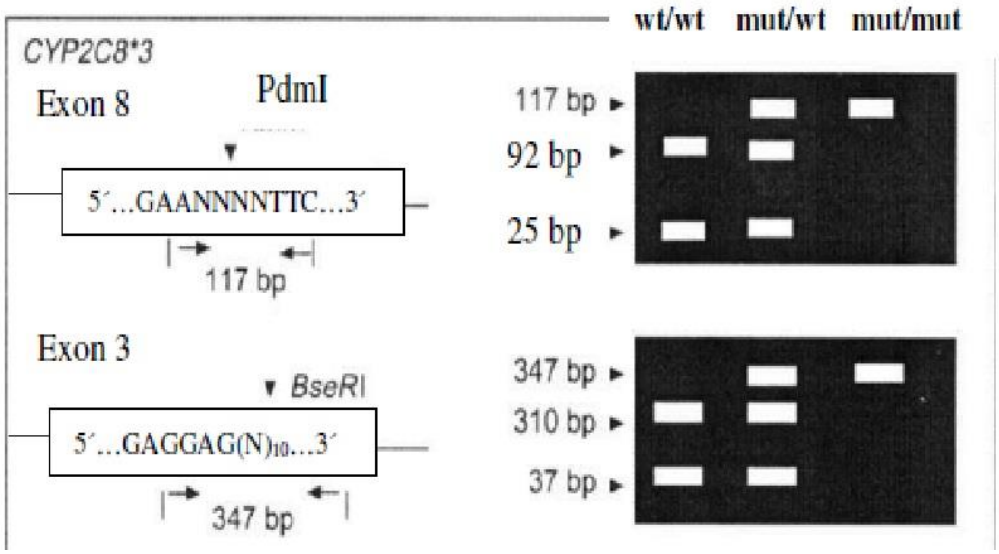


Abbildung 8: Darstellung des RFLP von CYP2C8*3 Exon 3 und Exon 8, modifiziert nach Dai et al. (91).

Nach Optimierung der Versuchsbedingungen wurde der in Tabelle 5 dargestellte Verdauansatz verwendet.

Tabelle 5: Optimierter Verdau-Ansatz für Exon 3 und 8.

Komponenten	**Exon 3**	**Komponenten**	**Exon 8**
PCR-Produkt (µl)	10	PCR-Produkt (µl)	25
ddH_2O (µl)	18	ddH_2O (µl)	3
10x NE Puffer 4 (µl)	2	10x Puffer Tango (µl)	2
BseRI 4U/µl (µl)	2	PdmI 10U/µl (µl)	1

Im Anschluss an die PCR wurden die Reaktionsgefäße erneut auf Eis gestellt. Das PCR-Produkt wurde in frische 0,2ml fassende Reaktionsgefäße überführt und aus ddH_2O, den entsprechenden Puffern und den jeweiligen Restriktionsenzymen erneut ein Mastermix hergestellt. Dieser wurde zu jeweils 22µl (Exon 3) bzw. 6µl (Exon 8) auf die einzelnen Reaktionsgefäße verteilt. Nach kurzer Zentrifugation zur Vermeidung von Rückständen an der Wand der Reaktionsgefäße, wurden die Proben abermals in den Mastercycler gestellt. Der Verdau erfolgte 16 Stunden bei 37°C und anschließend 20 Minuten bei 65°C, um die Restriktionsenzyme zu inaktivieren und einen weiteren Verdau der schon geschnittenen Fragmente zu verhindern.

2.2.6 Agarose-Gel-Elektrophorese

Nach dem Verdau mit Restriktionsenzymen erfolgte eine Agarose-Gel-Elektrophorese. Diese Methode dient der Trennung geladener Teilchen, wie z.B. DNA, nach Ladung und Größe. Durch die negative Ladung der Phosphatreste der DNA wandert diese als Polyanion im elektrischen Feld. Die Laufstrecke linearer DNA-Fragmente ist proportional zum Logarithmus ihrer Länge. So erfolgt eine Auftrennung in Banden von DNA einer spezifischen Größe.

Die Gel-Elektrophorese wurde mit 3%-igem Agarosegel durchgeführt. Nach Herstellung des Gels aus einfachem TAE-Puffer (100ml) mit Agarose (3g) und Ethidiumbromid (3µl) wurde dieses zum Erhärten in eine Form gegossen. Nach Abkühlung des Gels konnten die Verdauprodukte in die Taschen aufgetragen werden. Als Referenz für die Größe der Produkte wurde ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen, bei mehr als 12 Taschen wurden zwei Marker verwendet. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 70V für 1,5-2h. Anschließend konnte das Gel unter der UV-Lampe betrachtet werden. Das hinzugefügte Ethidiumbromid interkalierte zwischen den Basen der DNA und machte somit die Verdauprodukte im Agarosegel sichtbar. Ein beispielhaftes Ergebnis ist in Abbildung 9 dargestellt.

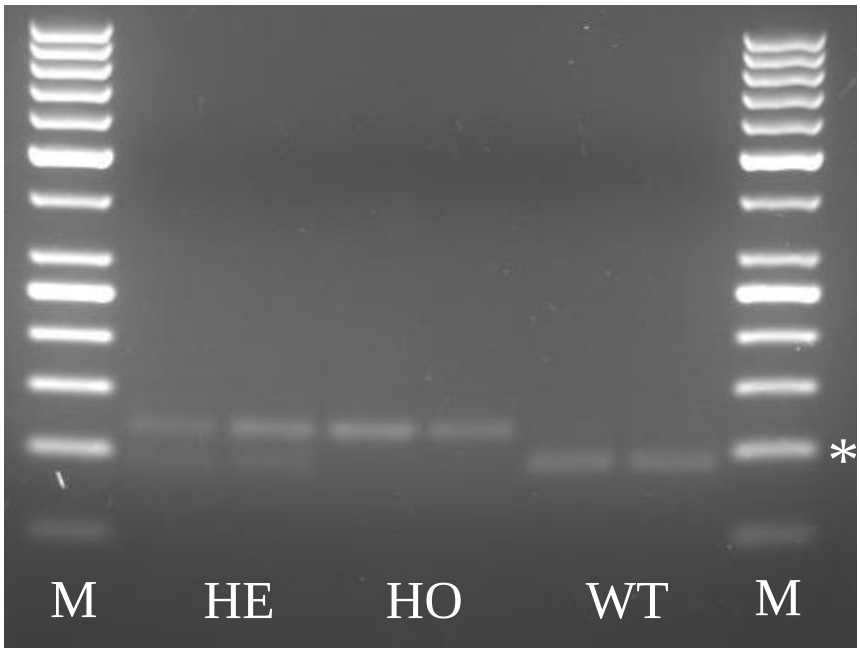


Abbildung 9: EtBr-haltiges 3-prozentiges Agarosegel mit aufgetrennten Patientenproben am Beispiel von Exon 8.
* = 100kb, M= Molekulargewichtsmarker, WT= Wildtyp, HE= Heterozygot, HO= Homozygot.

2.2.7 Datenauswertung

Nach abgeschlossener Laborarbeit wurden die Datensätze der klinischen Daten und der Laborergebnisse zusammengeführt und den einzelnen Probennummern der Patienten zugeordnet. Im Rahmen der statistischen Auswertung wurden mögliche Zusammenhänge zwischen klinischen Daten und dem im Labor ermittelten Vorhandensein des Polymorphismus analysiert.

2.2.8 Statistik

Die Analyse der Daten erfolgte mittels der Methoden der deskriptiven Statistik. Da es sich bei den Variablen größtenteils um nicht normalverteilte Variablen handelte, wurden nicht-parametrische Tests angewandt. Für die quantitativen Variablen kam der Mann-Whitney-U-Test zur Anwendung, bei mehr als 2 Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Bei qualitativen Variablen eignete sich der Chi-Quadrat-Test, wobei bei einer angenommenen Gruppengröße unter 5 der Fisher-Exact-Test benutzt wurde.
Eine statistische Signifikanz wurde bei einem $p<0,05$ angenommen. Der p-Wert wurde bis auf drei Stellen hinter dem Komma berechnet. Zur Veranschaulichung der Daten der statistischen Auswertung wurden die Ergebnisse in Tabellen, Diagrammen und Abbildungen dargestellt.

Die statistische Auswertung sowie die graphische Darstellung erfolgte mittels der Programme Word und Excel, Version 2010, (Microsoft, Redmond, Washington, USA) sowie IBM SPSS Version 22 (SPSS inc.).

3 Ergebnisse

3.1 Population

Insgesamt wurden im Studienzeitraum von Januar 1992 bis Dezember 2008 1797 VLBW-Frühgeborene an der Charité am Campus Virchow-Klinikum geboren. Darunter waren 864 VLBW-Frühgeborene, zu denen sowohl klinische Daten als auch die experimentell ermittelten Daten zum CYP-Polymorphismus erhoben werden konnten. Diese 864 Frühgeborenen stellen die Gesamtpopulation dar (Abbildung 10). Bei 434 VLBW-Kindern wurde kein PDA nachgewiesen. Eine medikamentöse Therapie zur Behandlung eines hsPDA wurde bei 218 Kindern eingeleitet, wobei es bei 85 Kindern zu einem Versagen der medikamentösen Therapie mit anschließender Notwendigkeit einer sekundären chirurgischen Ductusligatur kam.

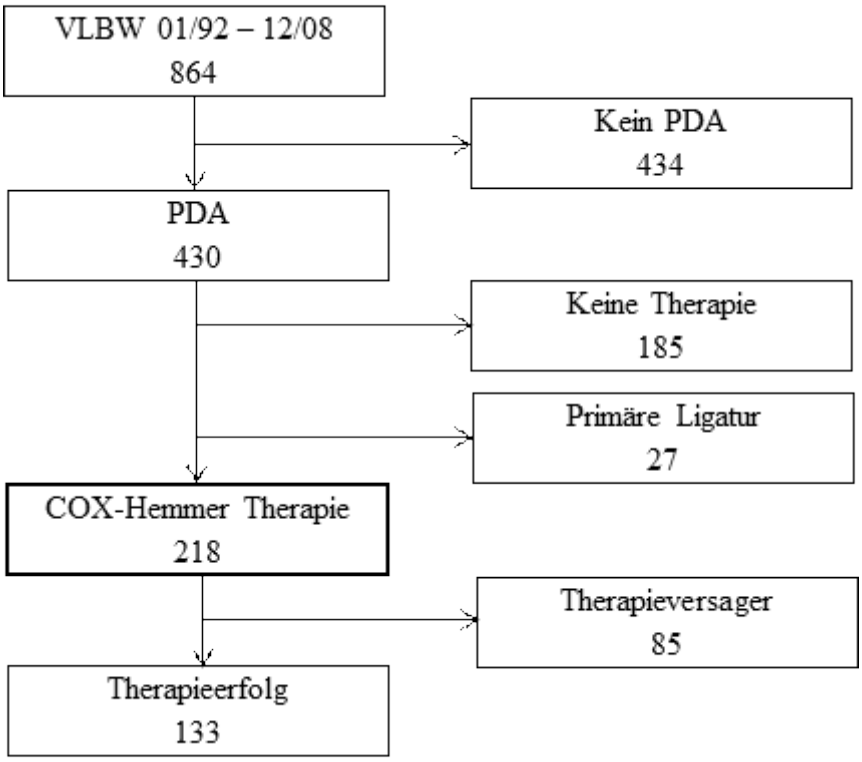


Abbildung 10: Flow-Chart der Studienpopulation.

3.2 Klinisches Profil der Gesamtpopulation

Zunächst werden die klinischen Daten der Gesamtpopulation von 864 VLBW-Frühgeborenen in Bezug auf den Nachweis eines PDA betrachtet. Es zeigt sich eine Gesamtinzidenz des PDA von 49,8% bei allen VLBW-Kindern. Bei den Frühgeborenen mit einem GG zwischen 1000 und 1500g liegt die Inzidenz eines PDA bei 31,1% (151 von 485 Kindern) während sie bei den Frühgeborenen mit einem GG unter 1000g 73,6% (279 von 379 Kindern) beträgt.

Die spontane Verschlussrate eines als nicht therapiebedürftig eingestuften PDA während des stationären Aufenthaltes lag bei 30,5% (131 von 430 Kindern). Bei 29,2% der Frühgeborenen (54 Kindern) mit nicht therapiebedürftigem PDA bestand dieser noch zum Zeitpunkt der Entlassung nach Hause, allerdings ohne hämodynamische Relevanz.

Im Vergleich zeigt sich deutlich, dass diejenigen VLBW-Frühgeborenen mit PDA signifikant kleiner (893g GG vs. 1240g GG) und unreifer (26,6 SSW GA vs. 30,0 SSW GA) sind als die Kinder ohne PDA. Außerdem tritt ein PDA signifikant häufiger bei männlichen VLBW-Frühgeborenen auf (Tabelle 6).

Bezüglich der typischen Frühgeborenenerkrankungen wie Atemnotsyndrom (RDS), bronchopulmonale Dysplasie (BPD), intraventrikuläre Hämorrhagie (IVH), periventrikuläre Leukomalazie (PVL), Frühgeborenenretinopathie (ROP) und nekrotisierende Enterokolitis (NEC) zeigt sich bei all denjenigen Kindern ein vermehrtes Auftreten, bei denen auch ein PDA nachweisbar war.

Tabelle 6: Vergleich des klinischen Profils zwischen den Gruppen mit PDA und ohne PDA.

Parameter	Gesamt (n=864)	PDA (n=430)	Kein PDA (n=434)
GA, SSW	28,3 (22,9/37,4)	26,6 (22,9/33,9) *	30,0 (24,0/37,4)
GG, g	1058 (442/1495)	893 (442/1495) *	1240 (495/1495)
Männlich, n (%)	418 (48,4)	228 (53,0) *	190 (43,8)
Mehrlinge, n (%)	291 (33,7)	151 (35,1)	140 (32,3)
CRIB-Score	3 (0/17)	5 (0/17)	1 (0/15)
Lungenreife, vollst., n (%)	526 (64,7)	283 (68,9)	243 (60,4)
Surfactant-Gabe, n (%)	391 (45,9)	297 (70,7)*	94 (21,8)
RDS, n (%)	523 (62,1)	344 (83,3) *	179 (41,7)
BPD gesamt, n (%)	261 (31,8)	229 (56,7) *	32 (7,7)
IVH, n (%)	92 (10,7)	81 (19,2) *	11 (2,6)
PVL, n (%)	37 (4,8)	29 (7,9) *	8 (2,0)
ROP ≥II°, n (%)	99 (13,2)	83 (23,2) *	16 (4,1)
NEC, n (%)	81 (9,6)	47 (11,3) *	34 (9,0)
Verstorben, n (%)	35 (4,1)	23 (5,3)	13 (3,0)

Die Ergebnisse sind als absolute Zahlen (Prozent) oder als Median (min/max) dargestellt. * = statistische Signifikanz bei $p<0,05$ für den Vergleich mit vs. ohne PDA.

3.3 Klinisches Profil der Studienpopulation

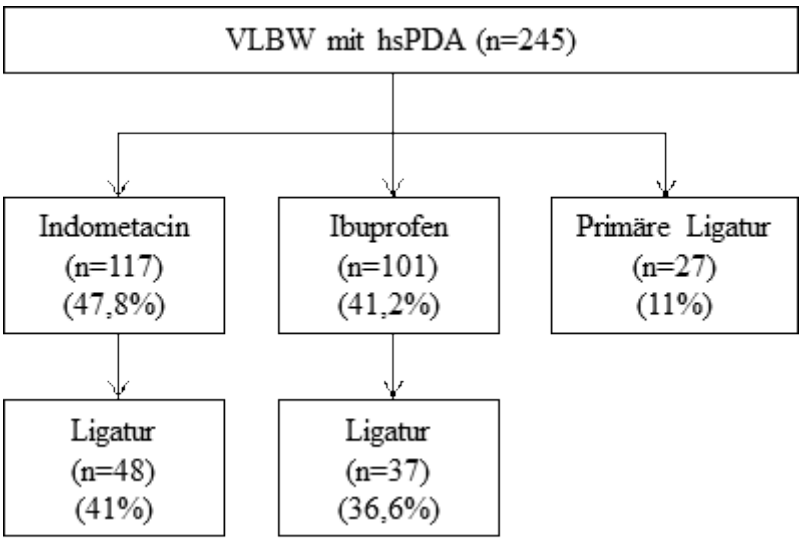


Abbildung 11: Übersicht zur PDA-Intervention.
Die Ergebnisse sind als absolute Zahlen (Prozent) dargestellt. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Fallzahl des darüber liegenden Kästchens.

In der Studienpopulation von 218 VLBW-Frühgeborenen, die aufgrund eines hsPDA medikamentös therapiert wurden, war die Therapie bei 85 Kindern (39%) nicht erfolgreich, sodass eine sekundäre Ductusligatur erfolgte (Non-Responder) (Abbildung 11). Der Vergleich der klinischen Patientendaten beider COX-Hemmer Gruppen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit Indometacin und Ibuprofen therapierten Kindern. Daher werden im Folgenden die Responder und Non-Responder beider Gruppen gemeinsam betrachtet.

Die Gruppe der Non-Responder zeichnet sich durch ein deutlich geringeres GG (731g GG vs. 870g GG) und eine ausgeprägte Unreife (25,0 SSW GA vs. 26,1 SSW GA) aus (Tabelle 7). Außerdem traten bei diesen Kindern signifikant häufiger eine ROP und eine BPD auf. Sowohl bezüglich des Geschlechts, als auch in Bezug auf RDS, IVH, PVL oder NEC konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Respondern und Non-Respondern festgestellt werden (Tabelle 7).

Tabelle 7: Vergleich des klinischen Profils der Responder und Non-Responder innerhalb der Therapiegruppe.

Parameter	Responder (n=133)	Non-Responder (n=85)
GA, SSW	26,1 (23,0/31,7)	25,0 (23,4/30,3) *
GG, g	870 (442/1490)	731 (478/1235) *
Männlich, n (%)	76 (57,1)	43 (50,6)
Mehrlinge, n (%)	51 (38,3)	28 (32,9)
CRIB-Score	5 (0/17)	7 (0/16)
Lungenreife, vollst., n (%)	88 (69,8)	56 (68,3)
Surfactant-Gabe, n (%)	106 (81,5)	71 (87,7)*
RDS, n (%)	112 (87,5)	73 (93,6)
BPD gesamt, n (%)	84 (67,3)	78 (96,3) *
IVH, n (%)	41 (30,8)	30 (35,3)
PVL, n (%)	8 (6,8)	3 (4,1)
ROP ≥II°, n (%)	50 (37,6)	47 (55,3) *
NEC, n (%)	19 (14,5)	9 (10,7)
Beatmungsdauer (Tage)	11 (0/156)	26 (2/134)*
Sekundären Ligatur (Tag)		18 (5/41)
Verstorben, n (%)	9 (6,8)	6 (7,1)

Die Ergebnisse sind als absolute Zahlen (Prozent) oder als Median (min/max) dargestellt. * = statistische Signifikanz bei $p<0,05$ für den Vergleich zwischen Respondern und Non-Respondern.

3.4 CYP2C8*3 Untersuchung

3.4.1 Allelfrequenz der Gesamtpopulation

Die Allelfrequenz in der Gesamtpopulation von 864 VLBW-Frühgeborenen liegt bei 10,3%, bei den Kindern ohne PDA beträgt die Allelfrequenz 9,3% und in der Gruppe der VLBW-Kinder mit einem nicht hsPDA nur 7,9%.

Der prozentuale Anteil homozygot Mutierter in der Gesamtpopulation beträgt 1,9% (16 von 864 VLBW-Kindern). In der Gruppe mit nicht therapiebedürftigem PDA beträgt er lediglich 1,1% (2 von 185 VLBW-Kindern) und in der Gruppe ohne PDA nur 1,4% (6 von 434 VLBW-Kindern) (Tabelle 8).

Tabelle 8: Mutationsverteilung des Polymorphismus in der Gesamtpopulation und in den Gruppen ohne PDA bzw. ohne hsPDA.

CYP2C8*3		Exon 3			
		0	1	2	
Exon 8	0	**643**	39	6	688
	1	20	**130**	3	153
	2	4	3	**16**	23
		667	172	25	864

8a

CYP2C8*3		Exon 3			
		0	1	2	
Exon 8	0	**330**	18	4	352
	1	11	**61**	1	73
	2	2	1	**6**	9
		343	80	11	434

8b

CYP2C8*3		Exon 3			
		0	1	2	
Exon 8	0	**145**	8	1	154
	1	5	**23**	0	28
	2	0	1	**2**	3
		150	32	3	185

8c

8a=Gesamtpopulation, 8b=kein PDA, 8c=kein hsPDA. 0=rein Wildtyp, 1=Heterozygot, 2=Homozygot.

3.4.2 Allelfrequenz der Studienpopulation

Die 218 VLBW-Kinder der Studienpopulation wurden auf das Auftreten des CYP2C8*3 Polymorphismus untersucht. Hierbei zeigte sich, dass nicht alle Kinder rein WT, HE und HO für beide Allele waren. In 22 Fällen gab es unterschiedliche Allel-Konstellationen für Exon 3 und Exon 8, sodass insgesamt nur 196 Kinder vollständig in WT, HE und HO für CYP2C8*3 eingeordnet werden konnten (in Tabelle 9 als fett gedruckte Zahlen hervorgehoben).

Tabelle 9: Gegenüberstellung von Exon 3 und Exon 8 bezüglich der Mutationsverteilung des Polymorphismus innerhalb der Studienpopulation.

CYP2C8*3		Exon 3			
		0	1	2	
Exon 8	0	**143**	13	1	157
	1	3	**45**	2	50
	2	2	1	**8**	11
		148	59	11	218

0=rein Wildtyp, 1=Heterozygot, 2=Homozygot.

Um die übrigen 22 VLBW-Kinder nicht für die Untersuchungen einzubüßen, folgen die weiteren Betrachtungen nach mutierten Allelen aufgeteilt in CYP0-4, d.h. von 0 bis 4 mutierten Allelen. Dabei entspricht CYP0 dem Wildtyp, CYP4 den homozygot Mutierten und CYP1-3 den unterschiedlichen Kombinationen von 1-3 mutierten Allelen.

Der prozentuale Anteil homozygot Mutierter in der Studienpopulation beträgt 3,7% (8 von 218 VLBW-Kindern). Ferner fällt auf, dass in dieser Gruppe 2,9% der Jungen, aber nur 0,9% der Mädchen homozygot mutiert waren.

In der Studienpopulation von 218 VLBW-Kindern zeigte sich eine Allelfrequenz von 15,6%, während in der Vergleichsgruppe der VLBW-Kinder ohne hsPDA und daher ohne Therapiebedürftigkeit der CYP2C8*3-Polymorphismus signifikant seltener nachweisbar war (p=0,002) (Abbildung 12).

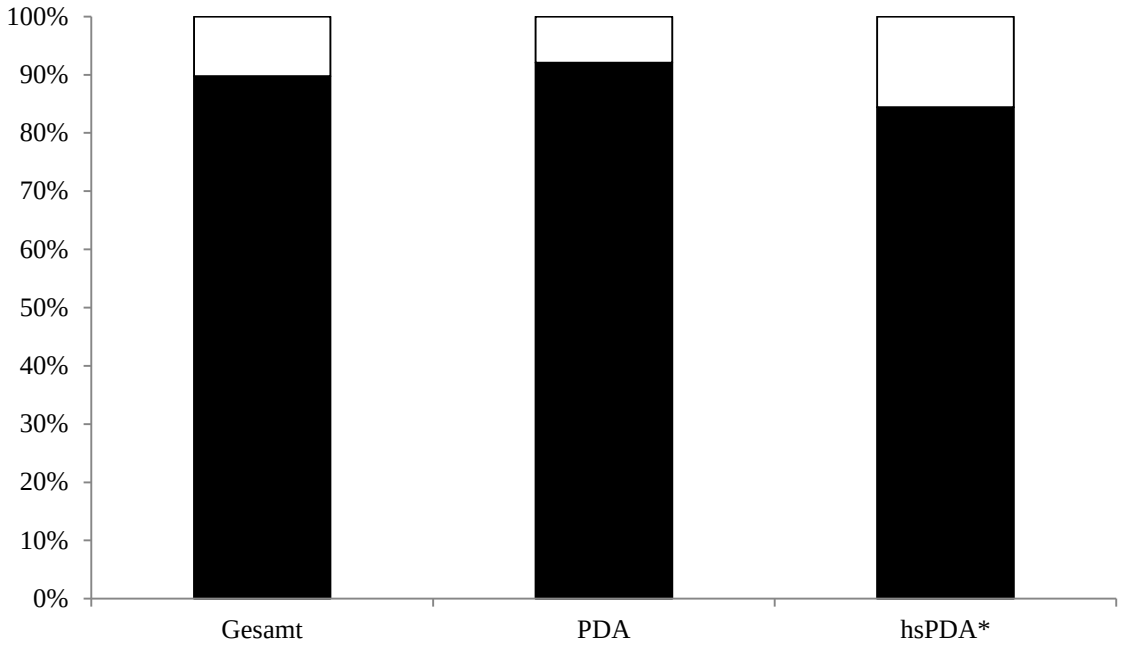


Abbildung 12: Allelfrequenzen der verschiedenen Populationen.
*=statistische Signifikanz bei p=0,002 für den Vergleich zwischen mit und ohne hsPDA und bei p=0,003 für den Vergleich zwischen Gesamt und mit hsPDA. Schwarz=WT, Weiß=SNP.

3.4.3 CYP2C8*3 und Verschlusszeitpunkt eines nicht therapiebedürftigen PDA

Bei insgesamt 185 VLBW-Kindern der Gesamtpopulation ließ sich ein hämodynamisch nicht relevanter und daher nicht therapiebedürftiger PDA nachweisen. Betrachtet man bei diesen Kindern den spontanen Verschlusszeitpunkt des Ductus, so fällt kein signifikanter Unterschied in den einzelnen Gruppen von CYP0 bis CYP4 auf (Tabelle 10). Es zeigt sich jedoch die Tendenz, dass ein nicht hsPDA mit steigender Anzahl mutierter Allele bei Entlassung weiterhin offen ist (Abbildung 13).

Tabelle 10: Kein hsPDA (nicht therapiert) und Verschlusszeitpunkt in Abhängigkeit von der Anzahl mutierter Allele.

CYP2C8*3	Verschlusszeitpunkt			Gesamt
	<7 Tage	≥7 Tage	Offen bei Entlassung	
CYP0	1 (0,7)	102 (70,4)	42 (28,9)	145
CYP1	0	10 (67,1)	3 (23,9)	13
CYP2	1 (4,2)	16 (66,7)	7 (29,1)	24
CYP3	0	0	1 (100)	1
CYP4	0	1 (50)	1 (50)	2
Gesamt	2	129	54	185

Die Ergebnisse sind als absolute Zahlen (Prozent) dargestellt. CYP0=keine aberranten Allele, CYP1=ein aberrantes Allel, CYP2=zwei aberrante Allel, CYP3=drei aberrante Allele, CYP4=vier aberrante Allele.

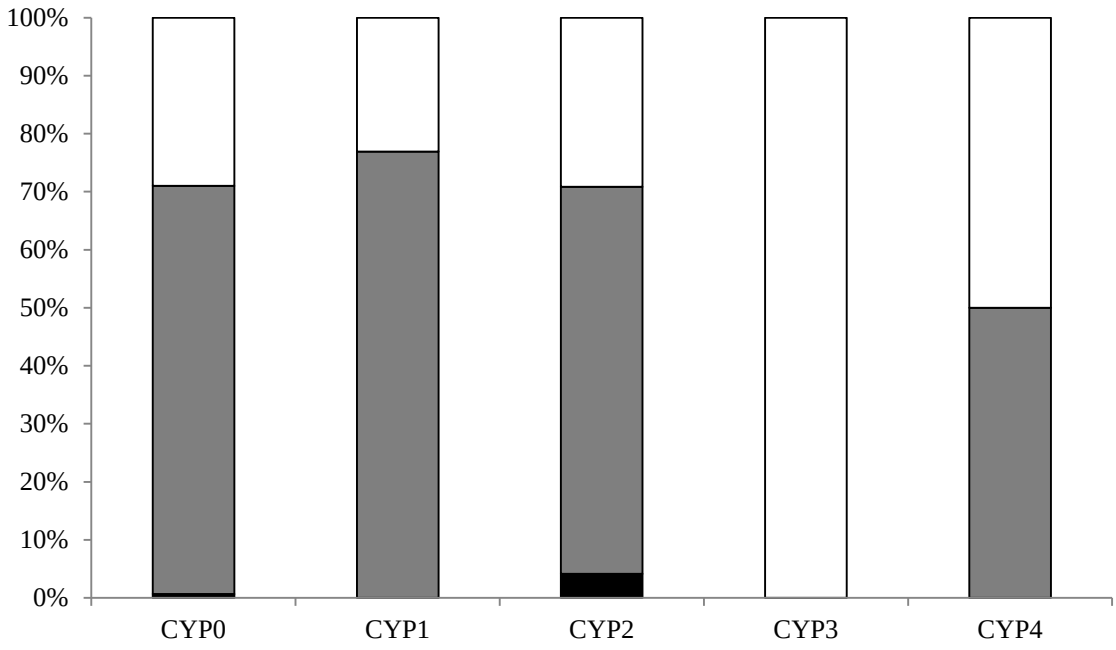


Abbildung 13: Kein hsPDA (nicht therapiert) und Verschlusszeitpunkt in Abhängigkeit von der Anzahl mutierter Allele.
Schwarz= Verschluss <7d, grau= Verschluss ≥7d, weiß= offen bei Entlassung.

Betrachtet man die gesamte Population von 864 VLBW-Frühgeborenen bezüglich des Verschlusszeitpunktes des Ductus im Zusammenhang mit den aberranten Allelen, so fällt noch deutlicher auf, dass sich die Dauer eines offenen PDAs mit steigender Anzahl aberranter Allele verlängert (Abbildung 14). Jedoch ist diese zeitliche Verlängerung statistisch nicht signifikant.

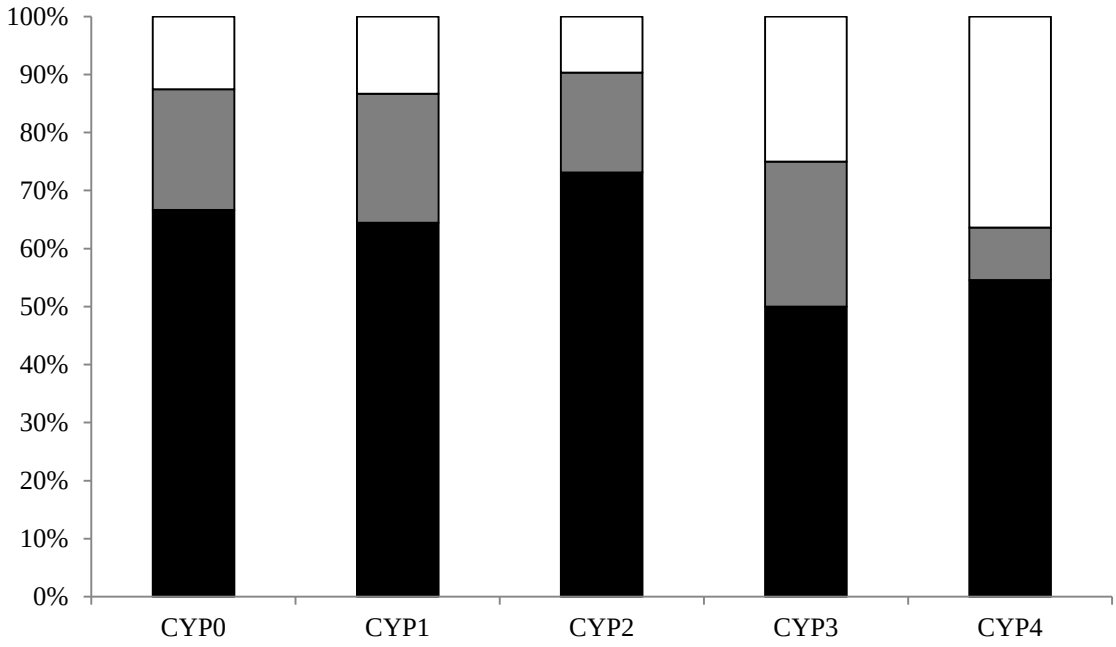


Abbildung 14: Verschlusszeitpunkt des Ductus in der Gesamtpopulation in Abhängigkeit von der Anzahl mutierter Allele.
Schwarz= Verschluss <7d, grau= Verschluss ≥7d, weiß= offen bei Entlassung.

3.4.4 Versagen der COX-Hemmer-Therapie

Das primäre Studienziel war es festzustellen, ob der Erfolg der medikamentösen PDA-Therapie mittels Ibuprofen und Indometacin mit dem Auftreten des CYP2C8*3 Polymorphismus assoziiert ist. Bei 39% (n=85) der VLBW-Kinder zeigte sich ein Therapieversagen, während 61% (n =133) auf die medikamentöse Therapie ansprachen und es zu einem Ductusverschluss oder zu einem nicht mehr hsPDA kam (Tabelle 12). Eine sekundäre Ligatur wurde im Median am 18. LT durchgeführt. Der früheste sekundäre Verschluss erfolgte am 5., der späteste am 41. LT. Unter den Kindern mit nur einem Zyklus COX-Inhibitor-Therapie hatten lediglich 31,7% mindestens ein mutiertes Allel, während in der Gruppe der VLBW-Kinder mit mindestens zwei Zyklen 38,2% mindestens 1 mutiertes Allel aufwiesen. Im Durchschnitt wurde bei den Respondern ein Zyklus der COX-Hemmer-Behandlung verabreicht, während die Non-Responder vor der chirurgischen Ligatur in der Regel 2 Zyklen erhielten (Abbildung 15).

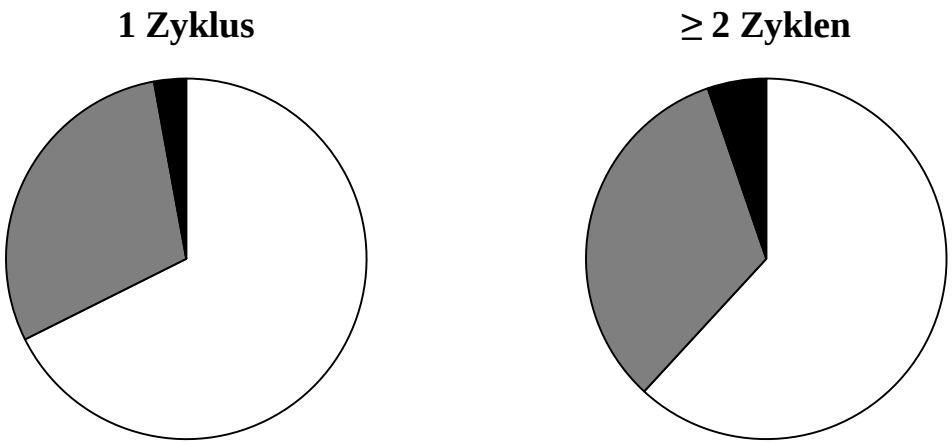


Abbildung 15: Mutationsverteilung des Polymorphismus und COX-Hemmer-Zyklusbedarf. Weiß= CYP0, grau= CYP1-3, schwarz= CYP4. 1 Zyklus: 104 Responder (74,8%), Mind. 2 Zyklen: 26 Responder (34,2%).

Tabelle 11: Gegenüberstellung des CYP-Polymorphismus in den beiden COX-Hemmer-Gruppen bezüglich des Therapieausgangs.

CYP2C8*3	Ibuprofen		Indometacin		Gesamt
	Responder	Non-Responder	Responder	Non-Responder	
CYP0	45 (70,3)	22 (59,5)	43 (62,3)	33 (68,8)	143
CYP1	4 (6,3)	6 (16,2)	3 (4,3)	3 (6,3)	16
CYP2	9 (14,1)	7 (18,9)	20 (29,0)	12 (25,0)	48
CYP3	1 (1,6)	1 (2,7)	1 (1,4)	0	3
CYP4	5 (7,8)	1 (2,7)	2 (2,9)	0	8
Gesamt	64	37	69	48	218

Die Ergebnisse sind als absolute Zahlen (Prozent) dargestellt. CYP0=keine aberranten Allele, CYP1=ein aberrantes Allel, CYP2=zwei aberrante Allel, CYP3=drei aberrante Allele, CYP4=vier aberrante Allele.

Bezüglich des Therapieerfolges zeigte sich kein signifikanter Unterschied, wenn zwischen Ibuprofen (n=101) und Indometacin (n=117) in den CYP2C8*3 Genotypen differenziert wurde, sodass auf eine getrennte Betrachtung beider COX-Hemmer-Gruppen verzichtet wurde (p=0,51) (Tabelle 12). Insgesamt zeigte sich eine Verschlussrate von 59% (n=69) für Indometacin im Vergleich zu 63,4% (n=64) für Ibuprofen (Tabelle 11).

Tabelle 12: Gegenüberstellung des CYP2C8*3-Polymorphismus in der gesamten Studienpopulation unter Berücksichtigung des Therapieausgangs.

CYP2C8*3	COX-Hemmer-Therapie		Gesamt
	Responder	Non-Responder	
CYP0	88 (66,2)	55 (64,3)	143
CYP1	7 (5,3)	9 (10,6)	16
CYP2	29 (21,8)	19 (22,4)	48
CYP3	2 (1,5)	1 (1,2)	3
CYP4	7 (5,3)	1 (1,2)	8
Gesamt	133	85	218

Die Ergebnisse sind als absolute Zahlen (Prozent) dargestellt. CYP0=keine aberranten Allele, CYP1=ein aberrantes Allel, CYP2=zwei aberrante Allel, CYP3=drei aberrante Allele, CYP4=vier aberrante Allele.

Ein Therapieversagen der COX-Hemmer-Behandlung trat demnach unabhängig vom Vorhandensein mutierter Allele des CYP2C8*3-Polymorphismus auf. Bei den homozygot Mutierten mit 4 mutierten Allelen zeigte sich tendenziell ein besseres Ansprechen auf die medikamentöse Therapie, das jedoch statistisch nicht signifikant war (Abbildung 16).

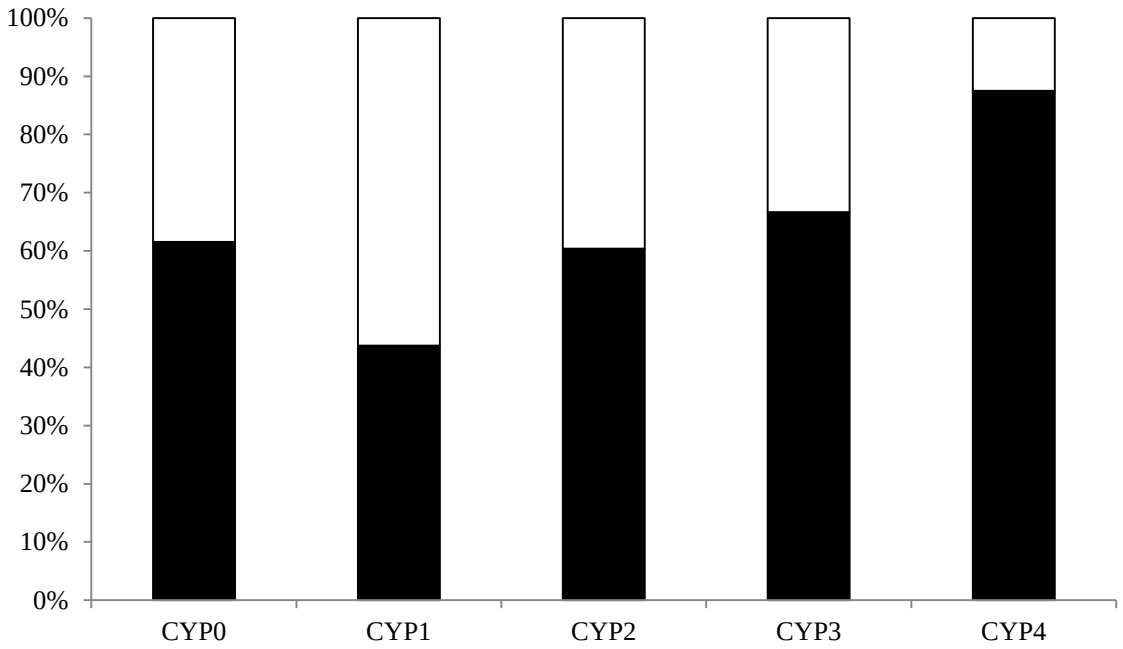


Abbildung 16: Therapieansprechen in Bezug auf das Auftreten mutierter Allele.
CYP0=keine aberranten Allele, CYP1=ein aberrantes Allel, CYP2=zwei aberrante Allel, CYP3=drei aberrante Allele, CYP4=vier aberrante Allele. Schwarz= Responder, weiß= Non-Responder.

Bei getrennter Betrachtung von VLBW- und ELBW-Kindern hinsichtlich der CYP2C8*3 Genotypen-Verteilung und des Therapieversagens ist ebenfalls kein Unterschied zu erkennen.

3.5 Morbidität und CYP2C8*3

Zusätzlich wurden die möglichen Auswirkungen des CYP2C8*3 Polymorphismus auf die Häufigkeit des Auftretens typischer Erkrankungen, die mit extremer Frühgeburtlichkeit assoziiert sind, untersucht. Um eine größtmögliche Kohorte für die Analyse zu erlangen, wurden zunächst die klinischen Daten aller 864 VLBW-Kinder verwendet. Dazu wurden die klinischen Daten sowie die Krankheitsverteilung von RDS, BPD, ROP, IVH, PVL und NEC innerhalb der Genotypen von CYP2C8*3 untersucht (Tabelle 13).

Weder bezüglich des GG noch hinsichtlich des GA zeigten sich signifikante Unterschiede. Es fiel jedoch auf, dass Kinder mit mindestens drei aberranten Allelen deutlich kleiner waren als jene mit zwei oder weniger mutierten Allelen.

Des Weiteren konnten auch keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich des Auftretens und der Schwere der Frühgeborenenerkrankungen festgestellt werden. Es zeigte sich jedoch ein gehäuftes Vorkommen des RDS und der BPD im Zusammenhang mit drei (RDS) bzw. vier (BPD) mutierten Allelen; der Anteil an VLBW-Kindern mit BPD ist hier um ein Viertel höher als in den anderen Gruppen. Eine IVH scheint mit zunehmender Anzahl mutierter Allele seltener zu werden. So hatte in den Gruppen CYP3 und CYP4 insgesamt nur ein VLBW-Frühgeborenes eine IVH.

Eine primäre Ligatur ist in den Gruppen CYP3 und CYP4 bei keinem Kind notwendig gewesen. Zusätzlich fällt auf, dass unter den homozygot mutierten VLBW-Frühgeborenen deutlich mehr männliche Frühgeborene sind (75%).

Tabelle 13: Vergleich klinisches Profil der CYP-Untergruppen der Gesamtpopulation (n=864).

Parameter	CYP0 (n=643)	CYP1 (n=59)	CYP2 (n=140)	CYP3 (n=6)	CYP4 (n=16)
GA, SSW	28,43 (22,86/37,29)	28,29 (23,86/37,43)	28,14 (23,00/35,00)	26,79 (25,43/31,14)	27,36 (25,14/33,29)
GG, g	1060 (465/1495)	1045 (570/1475)	1074 (442/1490)	840 (692/1180)	929 (545/1945)
Geschlecht (männlich), n (%)	304 (47,3)	29 (49,2)	72 (51,4)	1 (16,7)	12 (75)
Mehrling, n (%)	225 (35)	20 (33,9)	37 (26,4)	2 (33,3)	7 (43,8)
CRIB	2 (0/17)	4 (0/12)	2 (0/15)	5 (1/9)	5 (0/13)
RDS, n (%)	384 (61,0)	37 (67,3)	85 (63,0)	5 (83,3)	12 (75,0)
BPD gesamt, n (%)	185 (30,3)	21 (37,5)	46 (34,6)	2 (33,3)	7 (43,8)
Beatmung (Tage)	1 (0/156)	2 (0/185)	2 (0/118)	17 (0/47)	4 (0/54)
ROP ≥II°, n (%)	69 (12,4)	9 (17,7)	16 (13,3)	2 (40)	3 (18,8)
IVH, n (%)	102 (16,1)	8 (13,6)	28 (20,3)	0 (0)	1 (6,3)
PVL, n (%)	29 (5,1)	2 (3,8)	5 (4,1)	0 (0)	1 (6,3)
NEC, n (%)	61 (9,7)	7 (11,9)	11 (8,0)	1 (16,7)	1 (6,3)
Dauer des PDA (Tage)	9 (2/110)	11 (3/46)	10 (2/64)	12 (9/15)	6 (2/9)
Primäre Ligatur, n (%)	25 (3,9)	1 (1,7)	1 (0,7)	0	0

Die Ergebnisse sind als absolute Zahlen (Prozent) oder als Median (min/max) dargestellt.

* = statistische Signifikanz bei $p<0,05$ für den Vergleich CYP0, 1, 2, 3 bzw. 4.

Betrachtet man die Studienpopulation (n=218) allein, sind alle Kinder mit homozygoter Mutation für den CYP2C8*3-Polymorphismus männlich (Tabelle 14). Auch in dieser kleineren Gruppe ist ein deutlicher Trend zum vermehrten Auftreten von RDS und BPD im Zusammenhang mit einer steigenden Anzahl mutierter Allele erkennbar. Das seltenere Vorkommen der IVH bei Kindern ab drei aberranten Allelen ist in der Studienpopulation noch deutlicher zu erkennen.

Tabelle 14: Vergleich klinisches Profil der CYP-Untergruppen der Studienpopulation (n=218).

Parameter	CYP0 (n=143)	CYP1 (n=16)	CYP2 (n=48)	CYP3 (n=3)	CYP4 (n=8)
GA, SSW	26,00 (24,86/27,29)	25,64 (24,50/27,07)	26,00 (24,79/27,00)	26,00 (25,43/26,14)	25,71 (25,43/26,21)
GG, g	795 (465/1395)	831 (570/1305)	813 (442/1490)	802 (692/838)	730 (545/812)
Geschlecht (männlich), n (%)	73 (51,0)	6 (37,5)	31 (64,6)	1 (33,3)	8 (100)*
CRIB	6 (0/17)	6 (1/12)	6 (0/12)	8 (4/9)	6 (4/13)
RDS, n (%)	126 (90,6)	12 (92,3)	37 (86)	2 (66,7)	8 (100)
BPD gesamt, n (%)	108 (81,2)	12 (75,0)	34 (75,6)	1 (33,3)	7 (87,5)
Beatmung (Tage)	19 (0/156)	17 (0/94)	21 (0/118)	17 (16/32)	20 (1/54)
ROP ≥II°, n (%)	47 (39,8)	9 (64,3)	17 (40,5)	2 (66,7)	4 (50,0)
IVH, n (%)	49 (34,3)	4 (25,0)	17 (35,4)	0 (0)	1 (12,5)
PVL, n (%)	8 (6,6)	0 (0)	2 (4,7)	0(0)	1 (12,5)
NEC, n (%)	20 (14,3)	3 (18,8)	4 (8,3)	1 (33,3)	0 (0)
Dauer des PDA (Tage)	8 (2/110)	11 (3/46)	8 (2/64)	12 (9/15)	6 (2/9)
Wiedereröffnung PDA, n (%)	23 (16,4)	3 (18,8)	6 (12,5)	0 (0)	1 (14,3)

Die Ergebnisse sind als absolute Zahlen (Prozent) oder als Median (min/max) dargestellt. * = statistische Signifikanz bei $p<0,05$ für den Vergleich CYP0, 1, 2, 3 bzw. 4.

3.6 Mehrlings-Betrachtung

Bei den Zwillingsgeschwistern der Gesamtpopulation (n=67 Paare) war zu beobachten, dass nahezu die gleichen genetischen Konstellationen vorhanden waren (Tabelle 15, Tabelle 16). Allerdings fehlte die klinische Information darüber, ob es sich um mono- oder dizygote Zwillinge handelte.

Tabelle 15: Mutationsverteilung für Exon 3 bei Zwillingspaaren.

CYP2C8*3 Exon 3	Erster Zwilling	Zweiter Zwilling	Gesamt
Wildtyp	56 (52,8)	50 (47,2)	112
Heterozygot	9 (36)	16 (64)	19
Homozygot	2 (66,7)	1 (33,3)	3
Gesamt	67	67	134

Tabelle 16: Mutationsverteilung für Exon 8 bei Zwillingspaaren.

CYP2C8*3 Exon 8	Erster Zwilling	Zweiter Zwilling	Gesamt
Wildtyp	56 (50)	56 (50)	112
Heterozygot	9 (47,4)	10 (52,6)	19
Homozygot	2 (66,7)	1 (33,3)	3
Gesamt	67	67	134

3.7 Einfluss der Ethnizität

In der Studienpopulation waren in 14,2% der Fälle die Ethnizität unbekannt. Soweit Daten erfasst sind, liegt der Anteil an Kindern anderer Ethnizität als der deutschen in der untersuchten Studienpopulation bei 28,9%.

Hierbei fällt vor allem auf, dass die VLBW-Kinder in der Gruppe der anderen Ethnizitäten signifikant häufiger auf die COX-Hemmer-Therapie ansprechen als die deutschen Kinder, sodass es bei Letzteren in 42,7% der Fälle zu einem Versagen der medikamentösen Therapie kommt. Dies ist bei den Kindern anderer Ethnizitäten nur in 26,6% der Fälle zu beobachten (p=0,04).

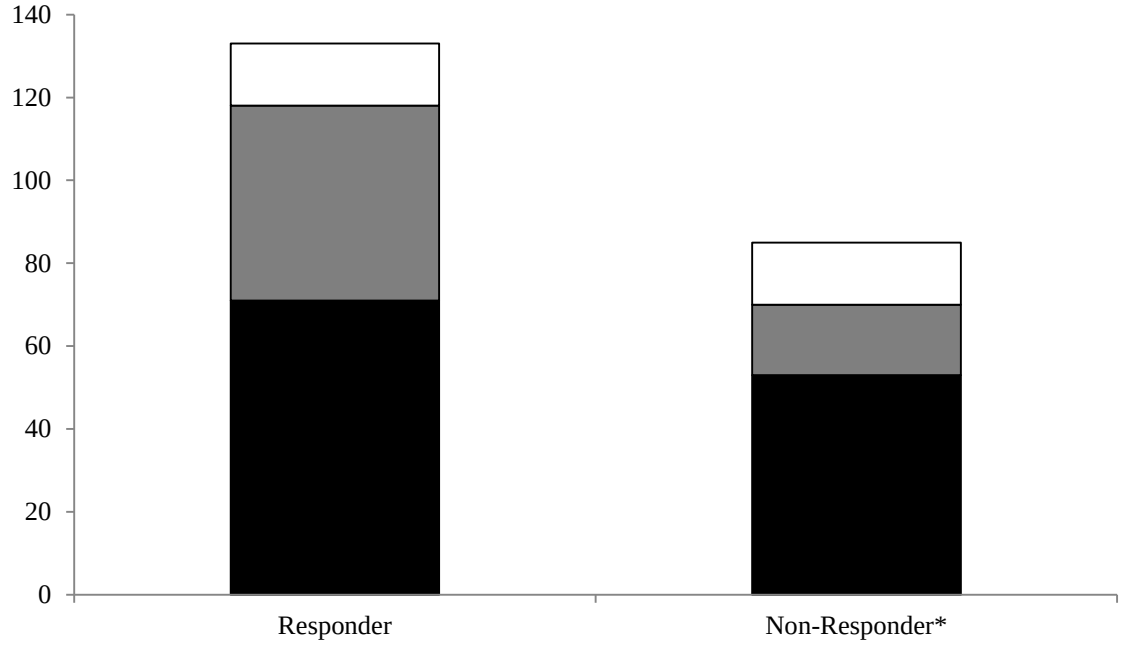


Abbildung 17: Ethnizität der Responder und Non-Responder.
Die Ergebnisse sind als absolute Zahlen angegeben. *=p=0,04 für den Vergleich Responder und Non-Responder anderer Ethnizitäten. Schwarz= deutsch, grau= andere, weiß= unbekannt.

Auch bei der Mutationsverteilung wird ein Trend deutlich. In der Gruppe der Deutschen ist eine Mutation mindestens eines der Allele häufiger als in der Gruppe anderer Ethnizitäten. So tragen

die deutschen VLBW-Frühgeborenen lediglich in 58,9% der Fälle den Wildtyp bezüglich des CYP2C8*3 Polymorphismus, während dies bei den Kindern der anderen Ethnizitäten in 78,1% der Fälle so ist. Allerdings ist dieser Unterschied statistisch nicht signifikant (p=0,09).

4 Diskussion

Der PDA stellt eines der häufigsten Probleme sehr unreifer Frühgeborener dar. Trotz zahlreicher Studien besteht weiterhin große Uneinigkeit bezüglich der Notwendigkeit, des Zeitpunktes und der Art der Behandlung eines PDA bei diesen Kindern (112). In den letzten Jahren hat es insgesamt große Fortschritte in der Therapie sehr unreifer Frühgeborener gegeben, die beispielsweise eine Reduktion von invasiver Beatmung sowie eine Prävention von IVH (113) und NEC (114, 115) ermöglicht haben. In jüngster Zeit wird daher die Notwendigkeit der PDA-Behandlung bei reiferen Frühgeborenen sogar ganz in Frage gestellt. Allerdings gibt es aufgrund der steigenden Überlebensraten extrem unreifer Frühgeborener auch ein großes Interesse daran, die aktuellen Behandlungsstrategien eines hsPDA für diejenigen Kinder, die mit einem GA von ≤26 SSW geboren werden und in der Regel schlechter auf eine medikamentöse Ductustherapie ansprechen, zu verbessern. In diesem Zusammenhang ist die Annahme von Bedeutung, dass neben dem Grad der Frühgeburtlichkeit und verschiedenen Umweltfaktoren auch pharmakogenetische Faktoren, die die Verstoffwechselung von Ibuprofen und Indometacin beeinflussen, für die Wirksamkeit der Behandlung eines PDA maßgeblich sind (116). Eine Verbindung zwischen der AUC und der Wirksamkeit von Ibuprofen und Indometacin zum PDA-Verschluss wurde bereits in mehreren Studien erkannt (60, 90).

Ziel dieser Arbeit war es daher zu klären, welche Rolle der CYP2C8*3 Polymorphismus in Bezug auf die COX-Hemmer-Metabolisierung und somit den Erfolg und den Zeitpunkt des PDA-Verschlusses spielt. Die variable Verstoffwechselung der COX-Hemmer könnte das unterschiedliche Ansprechen der Kinder auf die medikamentöse Therapie erklären. Ein Polymorphismus in CYP2C8, der die Metabolisierungsrate der COX-Hemmer verlangsamt, könnte somit zu einer verbesserten Wirksamkeit von Ibuprofen und Indometacin führen. Es erfolgte hierfür eine Konzentration auf die Untersuchung des CYP2C8*3 Polymorphismus mit Veränderungen in Exon 3 und Exon 8 des Gens.

Besonders wichtige Faktoren der Untersuchung waren die Etablierung der Methodik in einer großen Kohorte von sehr unreifen Frühgeborenen, die Bestimmung der Allelfrequenz des CYP2C8*3-Polymorphismus sowie die Sammlung von Anhaltspunkten zu potentiellen Funktionseinschränkungen.

4.1 Klinisches Profil der Gesamt- und der Studienpopulation

Anhand der sehr großen Gesamtpopulation (n=864 Kinder) konnten fundierte Untersuchungen bezüglich des klinischen Profils angestellt werden. Die Inzidenz eines PDA sowohl bei den

VLBW- (31%) als auch bei den ELBW-Frühgeborenen (74%) dieser Studie bestätigt die Zahlen der bisherigen Literatur (13-16). Auch die spontane Verschlussrate eines als nicht therapiebedürftig eingestuften PDA während des stationären Aufenthalts (31%) deckt sich weitgehend mit den in der Literatur angegebenen Zahlen (14).

Die Kinder der Gesamtpopulation mit einem PDA zeigten sich kleiner und unreifer, was die bisherige Annahme bestätigt, dass die PDA-Inzidenz mit abnehmendem GA und niedrigerem GG steigt (4, 117).

Wie in bisherigen Studien schon häufig gezeigt wurde, gab es auch in der Gesamtpopulation dieser Studie ein vermehrtes Auftreten der typischen Frühgeborenenerkrankungen RDS, BPD, IVH, PVL sowie ROP und NEC in Assoziation mit einem PDA (34, 112, 118). Trotzdem stellt sich die Frage, ob es sich in diesem Fall wirklich um eine kausale Beziehung handelt. Die Frühgeborenen mit PDA sind nicht nur kleiner und früher geboren, sondern in der Regel gleichzeitig auch kränker, sodass sie allein aufgrund dieser Tatsache einem potentiell höheren Risiko für das Auftreten typischer Komorbiditäten ausgesetzt sind (119-121). Auch in der aktuellen Literatur wird zunehmend die Frage nach dem direkten Zusammenhang zwischen einem hsPDA und den typischen Begleiterkrankungen Frühgeborener diskutiert (4).

Hinsichtlich der Wirksamkeit bei der medikamentösen Therapie des PDA konnte bereits gezeigt werden, dass Ibuprofen und Indometacin bei intravenöser Applikation vergleichbar effektiv sind. Der einzige Unterschied, der diskutiert wird, ist eine unterschiedlich stark ausgeprägte Nebenwirkung in Bezug auf die Hämodynamik des Gastrointestinaltraktes und somit auf die Häufigkeit der Entwicklung einer NEC (118). Daher wurden in den Untersuchungen beide Therapiegruppen der Studienpopulation zusammengefasst. Beide Medikamente erfahren auch eine ähnliche Metabolisierung über CYP2C8 und CYP2C9, sodass es auch unter diesem Aspekt möglich war, die beiden COX-Hemmer-Gruppen zusammenzufassen (122).

In bisherigen Studien kam es bei bis zu 30% der Kinder zu einem Therapieversagen der medikamentösen Ductusintervention (63, 123). Das in der Studienpopulation von 218 Kindern mit 39% (85 Kinder) etwas höhere Therapieversagen ist auffällig und lässt sich am ehesten durch den hohen Anteil von 170 ELBW-Frühgeborenen dieser Kohorte erklären. Es ist bekannt, dass bei Frühgeborenen unter 1000 g die Erfolgsrate des medikamentösen Ductusverschlusses deutlich geringer ist (34).

In Übereinstimmung mit vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Kinder der Non-Responder Gruppe unreifer waren und ein niedrigeres GG hatten (123). Betrachtet man die anatomischen und biochemischen Gegebenheiten bei sehr unreifen Frühgeborenen, wird der Grund hierfür deutlich. Die herabgesetzte Sensitivität gegenüber Sauerstoff und die im

Verhältnis erhöhte Empfindlichkeit des Ductus arteriosus beim sehr unreifen Frühgeborenen auf Prostaglandine, vor allem PGE_2, scheint eine große Rolle in der verminderten Verschlussrate zu spielen (4, 34). Außerdem exprimiert der DA bei sehr unreifen Frühgeborenen besonders große Mengen an NO-Synthase, deren Produkte eine wesentliche Rolle beim Offenbleiben des DA spielen (21, 33).

Auffällig war außerdem ein signifikant häufigeres Auftreten von BPD und ROP bei Frühgeborenen, die zusätzlich nach Versagen der medikamentösen Therapie einer sekundären Ligatur bedurften. Sowohl Kabra et al. (63), Chorne et al. (124) als auch Rheinländer et al. (123) konnten ebendiese Beobachtung auch machen. Es ist ebenfalls anhand der Daten dieser Studie ein Zusammenhang von chirurgischer Ligatur mit BPD und ROP anzunehmen. Die Entscheidung zur sekundären chirurgischen Ligatur wurde in der Studienpopulation von der Notwendigkeit zur Beatmung um den 21. LT herum abhängig gemacht. Die sekundäre Ductusligatur wurde bei den Non-Respondern im Median am 18. LT durchgeführt. Der Tag der Entscheidung zur Ductusligatur lag also nahe dem 28. LT, dem Tag, an dem nach der Definition von Bancalari, bei weiter bestehendem zusätzlichen Sauerstoffbedarf, bereits von einer milden BPD gesprochen wird (125). Die Beatmungsdauer der Responder betrug im Median lediglich 11 Tage, während die Non-Responder im Median 26 Tage beatmet waren. Es liegt daher nahe, dass die Non-Responder, die im Median bis zum 26. LT beatmet waren, auch am 28. LT noch zusätzlichen Sauerstoffbedarf hatten. Somit könnte man auch die Verbindung zwischen PDA und BPD erklären.

Bezüglich des Zusammenhangs der ROP mit einem PDA muss man bedenken, dass die kleinsten und kränksten Kinder besonders häufig von einem PDA betroffen sind. Eben diese Kinder entwickeln allerdings auch aufgrund der stärkeren Unreife der Netzhautvaskularisation häufiger eine ROP. Hinzu kommt, dass der RDS-Schweregrad mit zunehmender Unreife zunimmt. Dieser Schweregrad hat sowohl aufgrund des erhöhten Gefäßwiderstandes im Lungengefäßbett ein vermehrtes Ausbleiben des PDA-Verschlusses (37) als auch einen erhöhten Sauerstoffbedarf zur Folge. Dieser vermehrte Sauerstoffbedarf kann auch als Trigger für die ROP-Entstehung wirken und somit die Verbindung zwischen Persistenz des Ductus und ROP-Entstehung erklären.

4.2 Allelfrequenz des CYP2C8*3-Polymorphismus

Die Allelfrequenz der Gesamtpopulation von 864 VLBW-Kindern betrug 10,9% und ist vergleichbar mit den 11-23%, die in anderen Studien erhoben wurden (91, 92, 98, 99).

Die Beobachtung, dass alle homozygot den CYP2C8*3-Polymorphismus tragenden Patienten männlich sind, ist neu und konnte so bisher in anderen Studien nicht nachgewiesen werden. Bei

Durrmeyer et al. betrug der Anteil männlicher VLBW-Frühgeborener mit CYP2C8*3 Polymorphismus lediglich 59% (116). Bedenkt man jedoch, dass die Studienpopulation mit insgesamt 48,4 % männlichen VLBW-Frühgeborenen ein ausgewogenes Verhältnis von männlichen zu weiblichen Patienten hat, scheint diese Beobachtung relevant zu sein. So kann man davon ausgehen, dass der CYP2C8*3-Polymorphismus eine Knabenwendigkeit aufweist. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Beobachtung, dass ein PDA signifikant häufiger bei männlichen Frühgeborenen nachgewiesen werden konnte.

Zudem zeigte sich mit 15,6% eine signifikant höhere Allelfrequenz des CYP2C8*3-Polymorphismus in der Studienpopulation von 218 VLBW-Frühgeborenen mit hsPDA, als bei den 185 Kindern, bei denen der nachgewiesene PDA keine hämodynamische Bedeutung hatte. Diese Allelfrequenz bei Kindern mit therapiebedürftigem PDA deckt sich mit der von Durrmeyer et al. mit 17% beschriebenen Allelfrequenz (116).

4.3 Der CYP2C8*3-Polymorphismus als genetischer Risikofaktor für einen PDA, hsPDA und typische Frühgeborenenerkrankungen

Bisherige Studien zur Untersuchung genetischer Risikofaktoren in Bezug auf bestimmte neonatale Erkrankungen haben zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt. Die meisten Studien zu funktionellen Polymorphismen und ihrer Beteiligung an der Entstehung von typischen Frühgeborenenerkrankungen, wie zum Beispiel BPD, IVH oder ROP, haben keinen Zusammenhang nachweisen können (126, 127). Ebenso konnten in dieser Studie keine signifikanten Einflüsse des CYP2C8*3-Polymorphismus auf die typischen Frühgeborenenerkrankungen nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch der deutliche Trend, dass es mit zunehmender Anzahl mutierter Allele zu einem vermehrten Auftreten von RDS und BPD kommt. Man weiß, dass VEGF nicht nur, wie im Folgenden erwähnt, während des PDA-Verschlusses eine Rolle spielt, sondern vermutlich auch bei der Entwicklung eines RDS und einer BPD (128). So scheint es denkbar, dass der von VEGF aktivierte Signalweg, in dem vasoaktive Epoxyeicosatriensäuren (EETs) eine Rolle spielen, durch Polymorphismen von CYP2C8 gestört ist. Die infolgedessen veränderte Synthese von EETs könnte somit sowohl die Entwicklung einer BPD als auch die Verschlussmechanismen eines PDA beeinflussen. Es ist jedoch ebenso möglich, dass der durch CYP2C8*3 potentiell häufiger bestehende PDA als direkte Folge oder Wechselwirkung zu einem vermehrten Auftreten von RDS und BPD führt.

Es ist bekannt, dass der Verschluss des Ductus arteriosus ein multifaktorielles Geschehen ist, bei dem der pränatale Umbau auf den postnatalen Verschluss hinwirkt und der reibungslose Ablauf der postnatalen Verschlussmechanismen eine wesentliche Rolle spielt. Es stellt sich also die

Frage, ob und in welchem Ausmaß genetische Risikofaktoren, wie Polymorphismen, einen Einfluss auf das Vorhandensein und den Verschlusszeitpunkt eines PDA haben. Die Tatsache, dass Unreife potentiell zu limitierter Genexpression sowie Beeinträchtigung der physiologischen Verschlussmechanismen führt, und somit an sich bereits ein Risikofaktor für das Auftreten eines PDA ist, erschwert die Untersuchung genetischer Einflussfaktoren.

Bisher haben sich nur wenige Studien mit der Untersuchung der Relevanz genetischer Polymorphismen für das Auftreten eines PDA beschäftigt.

Eine Studie von Treszl et al. untersuchte eine mögliche Erhöhung des pulmonalen Gefäßwiderstands durch einen Polymorphismus im Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1, der somit indirekt zu einem PDA führen könnte. Dieser Zusammenhang konnte jedoch nicht bestätigt werden (129).

Auch Dagle et al. versuchten potentielle genetische Einflussfaktoren für einen PDA bei Frühgeborenen aufzudecken. Hierfür wurden 377 SNPs in verschiedenen, für den Ductusverschluss relevanten, Genen untersucht. Es konnte jedoch nur für zwei dieser 377 SNPs (Transkriptionsfaktor AP-2ß-Gen und Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ1-assoziierter Faktor-Gen) eine positive Korrelation zwischen SNP und PDA nachgewiesen werden (130).

Die Daten zeigten in der Gesamtpopulation, neben der erhöhten Inzidenz eines hsPDA im Zusammenhang mit dem CYP2C8*3-Polymorphismus, außerdem mit zunehmender Anzahl mutierter Allele ein verlängertes Offenbleiben eines unbehandelten, hämodynamisch nicht signifikanten PDA. Es zeigte sich bei den homozygot Mutierten, dass diese bei Entlassung häufiger einen noch bestehenden nicht hsPDA aufweisen als die Wildtyp-tragenden Kinder. Dies könnte für eine Auswirkung des CYP2C8*3-Polymorphismus auf die postnatalen Verschlussmechanismen des PDA sprechen. Im Folgenden werden daher die einzelnen Schritte des postnatalen Ductusverschlusses hinsichtlich ihrer Beeinflussung durch den CYP2C8*3-Polymorphismus näher beleuchtet.

So gibt es Hinweise, dass CYP2C8 eine Rolle bei der Metabolisierung von endogenen Stoffen wie Arachidonsäure spielt. Bei diesem Stoffwechselweg kommt es durch die Epoxygenase-Aktivität von CYP2C8 zur Bildung von vasoaktiven Epoxyeicosatriensäuren (EETs) (131).

Diese EETs sind wichtiger Bestandteil eines von VEGF im Rahmen der Angiogenese aktivierten Signalwegs (132).

Bekannt ist, dass CYP2C8 sowohl in der Leber als auch in der Niere ein Schlüsselenzym zur Bildung biologisch aktiver EETs aus Arachidonsäure ist. Die EETs spielen hier durch Wirkung auf die glatte Gefäßmuskulatur eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Gefäßtonus und beeinflussen die Wasser- und Natrium-Reabsorption (133-135). In anderen Studien wurde bereits

gezeigt, dass der CYP2C8*3-Polymorphismus zu einer Reduktion des Arachidonsäurestoffwechsels auf 1/3 der Aktivität im Vergleich zum Wildtyp führt (91, 136).
Zusätzlich ist von Fisslthaler et al. bereits 1999 entdeckt worden, dass CYP2C8 auch in den menschlichen Endothelzellen der Nabelvene, der Coronarien sowie des Gefäßsystems der Lunge vorhanden ist (137). Somit könnte CYP2C8 auch in den Endothelzellen des Ductus vorkommen. Die potentiell funktionell wirksamen Polymorphismen führten hierbei zu einer Veränderung des Arachidonsäurestoffwechsels mit veränderter Konzentration an EETs. Somit wäre eine Beeinflussung des Ductusverschlusses durch Veränderung des Arachidonsäurestoffwechsels unabhängig von der COX-Hemmer-Therapie denkbar.
Einen möglichen weiteren Einfluss auf den Ductusverschluss stellt die CYP2C8-Wirkung auch als Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF) Synthase dar (137). Die EDHF Synthase ist ein relevanter Bildner von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die wiederum eine Auswirkung auf den Gefäßtonus haben (138).
Da über die Cyclooxygenasen aus Arachidonsäure PGs synthetisiert werden, könnte es durch diese Auswirkung auf den Stoffwechsel der PGs zu einer fehlenden Kontraktion des DA und somit zu einem verlängerten Offenbleiben des PDA kommen.
Betrachtet man die potentielle Beteiligung von Thrombozyten am Verschluss des Ductus, muss auch eine Veränderung der Thrombozytenfunktion durch den CYP2C8*3-Polymorphismus als möglicher Einflussfaktor in Betracht gezogen werden. Jarrar et al. konnten 2013 zeigen, dass mehrere CYP-P450-Enzyme am Arachidonsäurestoffwechsel der Thrombozyten beteiligt sind (139). Tsantes et al. zeigten ebenfalls in 2013 eine Auswirkung von CYP2C19 auf die Thrombozytenantwort gegenüber Clopidogrel, einem Inhibitor des Adenosindiphosphat (ADP)-Rezeptors vom Subtyp P2Y12 aus der Familie der inhibitorischen G_i-Protein-gekoppelten Purinrezeptoren. Da dieser Rezeptor auf der Oberfläche der Thrombozyten die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation vermittelt, wirkt Clopidogrel als Thrombozytenaggregationshemmer (140). Leider tauchten in diesen Betrachtungen weder CYP2C8 noch CYP2C9 auf, sodass eine erneute Untersuchung des Stoffwechsels der Thrombozyten sowie möglicher Thrombozytenfunkionseinschränkungen unter Einbeziehung dieser CYP-P450-Enzyme sinnvoll erscheint.
So könnten sich die vorangehend diskutierten Veränderungen durch CYP2C8 im Arachidonsäurestoffwechsel über EETs, ROS und PGs auf die initiale Phase der Ductuskontraktion auswirken. Wohingegen sich eine Beeinflussung des Stoffwechsels der Wachstumsfaktoren sowie der Thrombozytenfunktion eher in der zweiten Phase des endgültigen bindegewebigen Umbaus des PDA zum Ligamentum arteriosum bemerkbar machen würden.

Insbesondere im Hinblick darauf, dass in dieser Studie die Allelfrequenz des CYP2C8*3-Polymorphismus bei den Frühgeborenen mit hsPDA signifikant höher war, scheint es sinnvoll, weitere ausführliche Untersuchungen des gesamten Arachidonsäurestoffwechsels, unter Berücksichtigung unterschiedlicher Polymorphismen im CYP-Gen, durchzuführen. Nur so kann es gelingen, deren potentielle Auswirkungen für das Offenbleiben des Ductus bzw. auf den PDA-Verschluss vollständig aufzuklären.

4.4 Der Zusammenhang zwischen CYP2C8*3 und dem Versagen der COX-Hemmer Therapie

Es ist bekannt, dass besonders der Grad der Frühgeburtlichkeit sowie andere Umweltfaktoren die Effektivität von COX-Hemmern zur medikamentösen Behandlung des PDA beeinflussen (131, 141). Man weiß, dass die Reifung und ein Konzentrationsanstieg der CYP-P450-Enzyme erst im Laufe der ersten Lebenstage voranschreiten. So hat man zum Beispiel erst am 10. Lebenstag einen konzentrationsabhängigen Metabolismus von CYP2C9 (141). Zudem kommt es bei Frühgeborenen abhängig vom GA zur Unreife von Ionenkanälen und Signalkaskaden (131).
Es liegt jedoch nahe, dass auch genetische Faktoren die Metabolisierung von COX-Hemmern beeinflussen und somit das Therapieansprechen verändern können.
Die Hypothese ist, dass es einen Zusammenhang zwischen der Wirksamkeit von Ibuprofen zur medikamentösen Therapie des hsPDA und dem CYP2C8-Genotyp durch dessen Auswirkung auf den Ibuprofen-Metabolismus gibt.
In der großen Studienpopulation von 218 VLBWs, die aufgrund eines hsPDA mit COX-Hemmern behandelt wurden, konnte kein Effekt des CYP2C8*3-Polymorphismus auf die Metabolisierungsrate von Ibuprofen und somit keinen Einfluss auf den Therapieerfolg festgestellt werden. Das gleiche gilt für Indometacin, wofür kein Unterschied in der Allelverteilung des CYP2C8*3-Polymorphismus zwischen Respondern und Non-Respondern besteht. Auch Durrmeyer et al haben sich bereits 2010 mit dieser Fragestellung beschäftigt, allerdings umfasste ihre Kohorte lediglich 111 VLBW-Kinder (116). In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass nur das gleichzeitige Auftreten von CYP2C8 und CYP2C9 Polymorphismen eine veränderte Enzymantwort der CYP-P450-Enzyme hervorruft (98). Daher untersuchten Durrmeyer et al zusätzlich zu CYP2C8 auch das CYP2C9-Gen auf Polymorphismen. Sie konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen den CYP2-Polymorphismen und einem veränderten Therapieerfolg nachweisen (116). Auch in der deutlich größeren Studienpopulation dieser Studie konnte der Zusammenhang zwischen dem CYP2C8*3-Polymorphismus und dem Ansprechen auf die medikamentöse Therapie des PDA nicht bestätigt

werden. Allerdings wurde ein statistisch nicht signifikanter, aber deutlicher, Trend beobachtet, dass Frühgeborene mit steigender Anzahl mutierter Allele immer besser auf die COX-Hemmer-Therapie ansprechen. Bei homozygot Mutierten mit vier aberranten Allelen zeigt sich das beste Therapieansprechen (insgesamt 7 Responder und nur 1 Non-Responder).

An erwachsenen Patienten hat es bereits zahlreiche Untersuchungen bezüglich des CYP2C8*3-Polymorphismus und einer langsameren Verstoffwechselung vor allem von Ibuprofen gegeben. Hiermit einher gingen eine höhere AUC sowie eine längere Plasmahalbwertszeit. Zudem kam es zu einer erniedrigten Clearance von Ibuprofen bei Trägern des Polymorphismus. Dies führte insgesamt zu einer erhöhten Wirkstoffkonzentration (70, 98). Da bei den Studienpatienten keine pharmakokinetischen Daten während der COX-Hemmer-Therapie erhoben wurden, lässt sich nur vermuten, dass es mit steigender Anzahl mutierter Allele im CYP2C8*3-Polymorphismus auch zu einer erhöhten Wirkstoffkonzentration von Ibuprofen und ggf. auch Indometacin gekommen ist. Warum aber diese höheren COX-Hemmer-Konzentrationen dennoch nicht zu einer statistisch signifikant besseren Wirksamkeit im Rahmen der Ductustherapie Frühgeborener führten, kann mehrere Gründe haben.

Einerseits ist es vorstellbar, dass auch eine erhöhte Wirkstoffkonzentration beim sehr unreifen Frühgeborenen nicht zu einem verbesserten Ansprechen auf die Therapie führt. In Studien wurde jedoch nachgewiesen, dass Hochdosisregime von COX-Hemmern zu einem besseren Therapieansprechen bei gleichbleibenden Nebenwirkungsraten führen (53, 61). Obwohl in diesen Studien ebenfalls keine Wirkstoffkonzentrationen im Blut bestimmt wurden, legt die hohe Erfolgsrate trotzdem nahe, dass die Wirkstoffkonzentration eine bedeutende Rolle für das Therapieansprechen spielt. Daher kann dieser Punkt eher nicht die ursächliche Erklärung darstellen.

Andererseits könnte es sein, dass das Vorhandensein von CYP2C8*3, anders als bei Erwachsenen, bei Frühgeborenen keine Auswirkung auf den Metabolismus der COX-Hemmer hat und somit nicht zu einer veränderten Wirkstoffkonzentration führt. Dies wäre in pharmakologischen Studien erneut zu untersuchen. Allerdings erscheint diese Annahme bei einer deutlichen, wenn auch statistisch nicht signifikanten, Tendenz des besseren Therapieansprechens bei steigender Anzahl mutierter Allele in dieser Studienpopulation unwahrscheinlich. Letztlich könnte auch die unterschiedliche Metabolisierung der beiden Enantiomere R- (-)- Ibuprofen und S- (+)- Ibuprofen durch CYP2C8 eine mögliche Erklärung sein.

Aufgrund der Ergebnisse von Durrmeyer et al, die keine Auswirkung von CYP2C9-Polymorphismen auf den PDA-Verschluss darstellen konnten, wurde darauf verzichtet, das CYP2C9 Gen zusätzlich zu betrachten. Allerdings ist bekannt, dass es einen dezenten

Unterschied in der Metabolisierung der COX-Hemmer gibt. Während Ibuprofen hauptsächlich von CYP2C8 metabolisiert wird, findet bei Indometacin ein größerer Teil der Verstoffwechselung über CYP2C9 und nur ein geringerer Teil über CYP2C8 statt.

4.5 Wirksamkeit der COX-Hemmer-Therapie unter Berücksichtigung von Ethnizität und Mehrlingsgeburten

Es ist bekannt, dass Unterschiede bezüglich der ethnischen Herkunft eine große Rolle bei Krankheiten und dem Krankheitsverlauf des Neugeborenen spielen.

So wurde in den USA in Studien gezeigt, dass afro-amerikanische Frühgeborene im Vergleich zu kaukasischen Frühgeborenen eine geringere Mortalität aufweisen (142). Eine mögliche Erklärung hierfür liegt darin, dass die Inzidenz für ein RDS bei VLBW-Frühgeborenen weißer Hautfarbe höher ist als bei afro-amerikanischen (143, 144). Dies wird auch dadurch bestätigt, dass die Mortalität der weißen VLBW-Frühgeborenen nach Einführung der Surfactant-Therapie stärker rückläufig war (145). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass zusätzlich zu Umweltfaktoren auch die Ethnizität für die Entwicklung eines RDS verantwortlich ist (116). Dies könnte auch für die Inzidenz eines PDA und den erfolgreichen PDA-Verschluss gelten.

In der Studienpopulation kam es bei 42,7% der deutschen Kinder zu einem Therapieversagen, während bei Kindern anderer Ethnizität ein statistisch signifikant geringeres Therapieversagen von nur 26,6% zu beobachten war. Geht man davon aus, dass die deutschen Kinder dieser Studie ähnlicher Abstammung sind wie die kaukasischen Kinder in der Studie von Durrmeyer et al. in Frankreich, so kann dessen Beobachtung bestätigt werden. In seiner Studie wurde die Ethnizität der Mutter betrachtet. So kam es bei Kindern kaukasischer Mütter in 44,9% der Fälle zu einem Therapieversagen, während dies nur bei 22,6% der Kinder von Müttern anderer Ethnizität auftrat (116). Es lässt sich also insgesamt ein Einfluss der Ethnizität auf den Therapieerfolg der COX-Hemmer-Therapie annehmen, sodass weitere Studien zum ethnienangepassten Therapiekonzept durchgeführt werden sollten.

In bisherigen Zwillingsstudien konnte eine genetische Prädisposition für einen hsPDA bei Zwillingsfrühgeborenen nachgewiesen werden (146, 147). In beiden Studien wurde eine Konkordanzrate des PDA bei Zwillingen (monozygot und dizygot) gezeigt, wobei jedoch die Gewichtung der Ursachen unterschiedlich ist. Lavoie et al. gehen eher von einer genetischen Prädisposition aus, wobei Bhandari et al. vor allem die gemeinsamen Umwelteinflüsse als ursächlich ansehen.

Auch die Zwillingspaare dieser Arbeit zeigen eine hohe Konkordanz bezüglich der Allele von CYP2C8*3. Es lagen jedoch keine Informationen darüber vor, ob es sich bei den

Zwillingspaaren um mono- oder dizygote Zwillinge handelte. Da sich die Konkordanz jedoch über alle Zwillingspaare erstreckte, somit auch über die dizygoten Zwillinge mit deutlich unterschiedlicherem Genmaterial als die monozygoten, liegt die Vermutung eines hohen Anteils der gemeinsamen Umweltfaktoren am Vorhandensein eines PDA nahe.

4.6 Stärken und Schwächen der Arbeit

Die retrospektive Analyse der klinischen Daten sowie der gesammelten Blutproben dieser Arbeit führte zu einigen Einschränkungen im Studiendesign und in der Auswertung. Zum einen gab es keine zuverlässige Information über den genauen Lebenstag, an dem die Blutproben für das Stoffwechselscreening entnommen wurden. Dies könnte mögliche Auswirkungen des CYP2C8*3-Polymorphismus verfälschen, da bereits gezeigt werden konnte, dass der CYP2C-Gehalt und die katalytische Aktivität vom postnatalen Alter abhängig sind (141, 148).

Die Betrachtungen der klinischen Daten sowie der Laborparameter erfolgten nicht nach Ethnien getrennt. Es ist jedoch bekannt, dass CYP2C8*3 am häufigsten bei der weißen Bevölkerung auftritt, CYP2C8*1 und *2 hingegen sind typischerweise bei der afro-amerikanischen und asiatischen Bevölkerung zu finden (149). Daher könnte man vermuten, dass die Angaben dieser Studie zur Allelfrequenz verfälscht sein könnten. Dennoch ist die bestimmte Allelfrequenz von 10,9% in der Gesamtpopulation mit den 11-23%, die bereits in anderen Studien erhoben wurden, vergleichbar (91, 92, 98, 99). Die höhere Allelfrequenz der Studienpopulation mit hsPDA lässt sich, wie bereits zuvor erwähnt, potentiell mit dem Zusammenhang zwischen CYP2C8*3 und dem Auftreten eines hsPDA erklären und stimmt ungefähr mit den 17% überein, welche Durrmeyer et al. 2010 feststellen konnten (116).

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit die Nebenwirkungen der COX-Inhibitoren, wie zum Beispiel gastrointestinale Blutungen, als indirekte Parameter für eine potentielle pharmakologische Relevanz des CYP2C8*3-Polymorphismus außer Acht gelassen. Sowohl Blanco et al. als auch Agundez et al. konnten jedoch einen Zusammenhang zwischen den CYP2C8-Genotypen und dem Risiko für gastrointestinale Blutungen darlegen (108, 150). Daher sollte dieser Aspekt in weiteren Studien erneut beleuchtet werden.

Ebenso fehlte in der aktuellen Studie die Einbeziehung anderer Ibuprofenmetabolite als Einflussfaktoren auf das Therapieansprechen, sodass es sich empfiehlt, hierzu noch weitere pharmakologische Betrachtungen durchzuführen.

Ein weiteres Problem der Arbeit stellte sich bei der Vervollständigung fehlender klinischer Daten und Laborwerte heraus. So konnten bei sehr weit zurück liegendem Geburtsdatum in den 1990er-Jahren fehlende klinische Daten nicht mehr erhoben werden, da sich die Kinder zum

Zeitpunkt der Betrachtung bereits nicht mehr in der Betreuung der Klinik für Neonatologie der Charité oder kooperierender Institute befanden und somit eine nachträgliche Erhebung nicht dokumentierter Daten unmöglich war.

Zudem war durch das Alter einiger Blutproben auch die DNA-Gewinnung deutlich erschwert. Aus alten Guthrie-Filterkarten konnte zum Teil durch DNA-Extraktion nicht genug DNA-Material gewonnen werden, um die sich anschließenden PCR- und RFLP-Untersuchungen durchzuführen. Dies betraf insgesamt 173 Proben.

Die Schwächen dieser Arbeit konnten jedoch zu einem wesentlichen Teil mit den Stärken aufgewogen werden, die die Betrachtung einer so großen Kohorte an einer einzelnen Einrichtung mit sich bringt. Dazu gehört zum einen das gleichbleibende Therapieregime mit einheitlichen Parametern zur Therapieindikation eines hsPDA an der Klinik für Neonatologie der Charité. Lediglich der Wechsel des hauptsächlich zur PDA-Behandlung eingesetzten Medikamentes von Indometacin zu Ibuprofen stellt eine Veränderung der Therapie dar. Allerdings ist dieser Paradigmenwechsel gut anhand der in großen Metaanalysen belegten vergleichbaren Wirkung beider COX-Hemmer nachvollziehbar und daher lediglich von untergeordneter Bedeutung (52). Die kontinuierliche Zusammenarbeit der Klinik für Neonatologie mit der Klinik für Kinderkardiologie garantiert eine engmaschige echokardiographische Überwachung der Frühgeborenen zur Ermittlung des Therapieerfolges. Und nicht zuletzt stellten die bereits vorhandenen Blutproben auf Guthrie-Filterkarten die Möglichkeit dar, eine besonders große Kohorte zu untersuchender Kinder zu rekrutieren, was andernfalls unmöglich gewesen wäre.

Zusammenfassend kann man sagen, dass diese Studie einen Zusammenhang zwischen dem CYP2C8*3-Polymorphismus und dem Auftreten eines hsPDA nicht abschließend bestätigen konnte. Auch konnte keine endgültige Aussage zur Korrelation von diesem Polymorphismus und dem Ansprechen auf die COX-Hemmer-Therapie getroffen werden. Da sich aber eine deutliche Tendenz zeigt, scheinen weitere Betrachtungen zu diesem Thema sinnvoll, die gegebenenfalls die Auswirkung anderer Faktoren auf den PDA-Verschluss umfassender mitberücksichtigen.

5 Literaturverzeichnis

1. Galenus. Opera Omnia IV. 131 a.D.
2. French RK. The thorax in history. 6. Circulation of the blood. Thorax 1978;33:714-27.
3. Gräper L. Die anatomischen Verhältnisse kurz nach Geburt. III. Ductus Botalli. Z Anat Entwicklungsgesch 1921;61:312-29.
4. Hamrick SE, Hansmann G. Patent ductus arteriosus of the preterm infant. Pediatrics 2010;125:1020-30.
5. Obladen M, Maier RF. Neugeborenenintensivmedizin: Evidenz und Erfahrung. 7. Auflage. Heidelberg, Deutschland: Springer Medizin Verlag; 2006.
6. 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. Circ Res 1996;78:790-8.
7. Schneider DJ, Moore JW. Patent ductus arteriosus. Circulation 2006;114:1873-82.
8. Clyman RI, Mauray F, Roman C, Rudolph AM. PGE2 is a more potent vasodilator of the lamb ductus arteriosus than is either PGI2 or 6 keto PGF1alpha. Prostaglandins 1978;16:259-64.
9. Coceani F, Kelsey L, Ackerley C, Rabinovitch M, Gelboin H. Cytochrome P450 during ontogenic development: occurrence in the ductus arteriosus and other tissues. Can J Physiol Pharmacol 1994;72:217-26.
10. Hornblad PY. Embryological observations of the ductus arteriosus in the guinea-pig, rabbit, rat and mouse. Studies on closure of the ductus arteriosus. IV. Acta Physiol Scand 1969;76:49-57.
11. Skinner J. Diagnosis of patent ductus arteriosus. Semin Neonatol 2001;6:49-61.
12. Clyman RI. Ibuprofen and patent ductus arteriosus. N Engl J Med 2000;343:728-30.
13. The Vermont-Oxford Trials Network: very low birth weight outcomes for 1990. Investigators of the Vermont-Oxford Trials Network Database Project. Pediatrics 1993;91:540-5.
14. 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;117:1113-21.
15. Richards J, Johnson A, Fox G, Campbell M. A second course of ibuprofen is effective in the closure of a clinically significant PDA in ELBW infants. Pediatrics 2009;124: e287-93.

16. Hammerman C, Kaplan M. Comparative tolerability of pharmacological treatments for patent ductus arteriosus. Drug Saf 2001;24:537-51.
17. Herrman K, Bose C, Lewis K, Laughon M. Spontaneous closure of the patent ductus arteriosus in very low birth weight infants following discharge from the neonatal unit. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2009;94:F48-50.
18. Crichton CA, Smith GC, Smith GL. alpha-Toxin-permeabilised rabbit fetal ductus arteriosus is more sensitive to Ca2+ than aorta or main pulmonary artery. Cardiovasc Res 1997;33:223-9.
19. Hermes-DeSantis ER, Clyman RI. Patent ductus arteriosus: pathophysiology and management. J Perinatol 2006;26 Suppl 1:S14-8; discussion S22-3.
20. Clyman RI, Mauray F, Heymann MA, Roman C. Influence of increased pulmonary vascular pressures on the closure of the ductus arteriosus in newborn lambs. Pediatr Res 1989;25:136-42.
21. Momma K, Toyono M. The role of nitric oxide in dilating the fetal ductus arteriosus in rats. Pediatr Res 1999;46:311-5.
22. 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. Pediatr Res 2006;60:270-5.
23. Thorburn GD. The placenta, PGE2 and parturition. Early Hum Dev 1992;29:63-73.
24. Clyman RI, Mauray F, Heymann MA, Roman C. Effect of gestational age on pulmonary metabolism of prostaglandin E1 & E2. Prostaglandins 1981;21:505-13.
25. Clyman RI. Mechanisms regulating the ductus arteriosus. Biol Neonate 2006;89:330-5.
26. 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. Pediatr Res 1999;45:19-29.
27. Hammerman C. Patent ductus arteriosus. Clinical relevance of prostaglandins and prostaglandin inhibitors in PDA pathophysiology and treatment. Clin Perinatol 1995;22:457-79.
28. Kaapa P, Seppanen M, Kero P, Saraste M. Pulmonary hemodynamics after synthetic surfactant replacement in neonatal respiratory distress syndrome. J Pediatr 1993;123: 115-9.

29. Reller MD, Ziegler ML, Rice MJ, Solin RC, McDonald RW. Duration of ductal shunting in healthy preterm infants: an echocardiographic color flow Doppler study. J Pediatr 1988;112:441-6.
30. Slomp J, Gittenberger-de Groot AC, Glukhova MA, Conny van Munsteren J, Kockx MM, Schwartz SM, Koteliansky VE. Differentiation, dedifferentiation, and apoptosis of smooth muscle cells during the development of the human ductus arteriosus. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997;17:1003-9.
31. Echtler K, Stark K, Lorenz M, Kerstan S, Walch A, Jennen L, Rudelius M, Seidl S, Kremmer E, Emambokus NR, von Bruehl ML, Frampton J, Isermann B, Genzel-Boroviczeny O, Schreiber C, Mehilli J, Kastrati A, Schwaiger M, Shivdasani RA, Massberg S. Platelets contribute to postnatal occlusion of the ductus arteriosus. Nat Med 2010;16:75-82.
32. Boo NY, Mohd-Amin I, Bilkis AA, Yong-Junina F. Predictors of failed closure of patent ductus arteriosus with indomethacin. Singapore Med J 2006;47:763-8.
33. Seidner SR, Chen YQ, Oprysko PR, Mauray F, Tse MM, Lin E, Koch C, Clyman RI. Combined prostaglandin and nitric oxide inhibition produces anatomic remodeling and closure of the ductus arteriosus in the premature newborn baboon. Pediatr Res 2001;50:365-73.
34. Van Overmeire B, Chemtob S. The pharmacologic closure of the patent ductus arteriosus. Semin Fetal Neonatal Med 2005;10:177-84.
35. Levin M, McCurnin D, Seidner SR, Yoder B, Waleh N, Goldbarg S, Roman C, Liu BM, Boren J, Clyman RI. Postnatal constriction, ATP depletion, and cell death in the mature and immature ductus arteriosus. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2006;290:R359-64.
36. Clyman RI, Waleh N, Black SM, Riemer RK, Mauray F, Chen YQ. Regulation of ductus arteriosus patency by nitric oxide in fetal lambs: the role of gestation, oxygen tension, and vasa vasorum. Pediatr Res 1998;43:633-44.
37. Amorim MM, Santos LC, Faundes A. Corticosteroid therapy for prevention of respiratory distress syndrome in severe preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 1999;180:1283-8.
38. Deeg KH, Gerstner R, Bundscherer F, Harai G, Singer H, Gutheil H. [Doppler sonographic detection of reduced flow velocity in the celiac trunk of the newborn infant with patent ductus arteriosus Botalli compared to a healthy control group]. Monatsschr Kinderheilkd 1987;135:24-9. Dopplersonographischer Nachweis erniedrigter

Flussgeschwindigkeiten im Truncus Coeliacus beim offenen Ductus Arteriosus Botalli des Fruhgeborenen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe.

39. Cassady G, Crouse DT, Kirklin JW, Strange MJ, Joiner CH, Godoy G, Odrezin GT, Cutter GR, Kirklin JK, Pacifico AD, et al. A randomized, controlled trial of very early prophylactic ligation of the ductus arteriosus in babies who weighed 1000 g or less at birth. N Engl J Med 1989;320:1511-6.
40. Osborn DA, Evans N, Kluckow M. Hemodynamic and antecedent risk factors of early and late periventricular/intraventricular hemorrhage in premature infants. Pediatrics 2003;112:33-9.
41. Kluckow M, Evans N. Ductal shunting, high pulmonary blood flow, and pulmonary hemorrhage. J Pediatr 2000;137:68-72.
42. McGrath RL, McGuinness GA, Way GL, Wolfe RR, Nora JJ, Simmons MA. The silent ductus arteriosus. J Pediatr 1978;93:110-3.
43. Deeg KH, Rupprecht T. [Pulsed Doppler sonographic determination of normal values of blood flow velocities in the anterior cerebral artery in premature and newborn infants]. Klin Padiatr 1988;200:307-15. Gepulste dopplersonographische Bestimmung von Normalwerten der Flussgeschwindigkeiten in der A. cerebri anterior beim Fruh- und Neugeborenen.
44. Kluckow M, Evans N. Early echocardiographic prediction of symptomatic patent ductus arteriosus in preterm infants undergoing mechanical ventilation. J Pediatr 1995;127: 774-9.
45. Evans N, Iyer P. Assessment of ductus arteriosus shunt in preterm infants supported by mechanical ventilation: effect of interatrial shunting. J Pediatr 1994;125:778-85.
46. Davis P, Turner-Gomes S, Cunningham K, Way C, Roberts R, Schmidt B. Precision and accuracy of clinical and radiological signs in premature infants at risk of patent ductus arteriosus. Arch Pediatr Adolesc Med 1995;149:1136-41.
47. Czernik C, Metze B, Muller C, Buhrer C. Urinary NT-proBNP and ductal closure in preterm infants. J Perinatol 2013;33:212-7.
48. Friedman WF, Hirschklau MJ, Printz MP, Pitlick PT, Kirkpatrick SE. Pharmacologic closure of patent ductus arteriosus in the premature infant. N Engl J Med 1976;295:526-9.
49. 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. J Pediatr 1983;102:895-906.

50. Herrera C, Holberton J, Davis P. Prolonged versus short course of indomethacin for the treatment of patent ductus arteriosus in preterm infants. Cochrane Database Syst Rev 2004:CD003480.
51. Fowlie PW, Davis PG. Prophylactic intravenous indomethacin for preventing mortality and morbidity in preterm infants. Cochrane Database Syst Rev 2002:CD000174.
52. Ohlsson A, Walia R, Shah SS. Ibuprofen for the treatment of patent ductus arteriosus in preterm and/or low birth weight infants. Cochrane Database Syst Rev 2010:CD003481.
53. Sperandio M, Beedgen B, Feneberg R, Huppertz C, Brussau J, Poschl 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;116:1361-6.
54. Rennie JM, Doyle J, Cooke RW. Early administration of indomethacin to preterm infants. Arch Dis Child 1986;61:233-8.
55. Edwards AD, Wyatt JS, Richardson C, Potter A, Cope M, Delpy DT, Reynolds EO. Effects of indomethacin on cerebral haemodynamics in very preterm infants. Lancet 1990;335:1491-5.
56. McCormick DC, Edwards AD, Brown GC, Wyatt JS, Potter A, Cope M, Delpy DT, Reynolds EO. Effect of indomethacin on cerebral oxidized cytochrome oxidase in preterm infants. Pediatr Res 1993;33:603-8.
57. van Bel F, Guit GL, Schipper J, van de Bor M, Baan J. Indomethacin-induced changes in renal blood flow velocity waveform in premature infants investigated with color Doppler imaging. J Pediatr 1991;118:621-6.
58. Coceani F, White E, Bodach E, Olley PM. Age-dependent changes in the response of the lamb ductus arteriosus to oxygen and ibuprofen. Can J Physiol Pharmacol 1979;57: 825-31.
59. Patel J, Marks KA, Roberts I, Azzopardi D, Edwards AD. Ibuprofen treatment of patent ductus arteriosus. Lancet 1995;346:255.
60. Desfrere L, Zohar S, Morville P, Brunhes A, Chevret S, Pons G, Moriette G, Rey E, Treluyer JM. Dose-finding study of ibuprofen in patent ductus arteriosus using the continual reassessment method. J Clin Pharm Ther 2005;30:121-32.
61. 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. Clin Pharmacol Ther 2012;91:590-6.

62. Van Overmeire B, Follens I, Hartmann S, Creten WL, Van Acker KJ. Treatment of patent ductus arteriosus with ibuprofen. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 1997;76:F179-84.

63. 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. J Pediatr 2007;150:229-34, 34 e1.

64. Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. Lancet 2002;360:1155-62.

65. Omura T, Sato R. A new cytochrome in liver microsomes. J Biol Chem 1962;237: 1375-6.

66. Porter TD, Coon MJ. Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. J Biol Chem 1991;266:13469-72.

67. Gonzalez FJ, Mackenzie PI, Kimura S, Nebert DW. Isolation and characterization of full-length mouse cDNA and genomic clones of 3-methylcholanthrene-inducible cytochrome P1-450 and P3-450. Gene 1984;29:281-92.

68. Nebert DW, Gonzalez FJ. P450 genes: structure, evolution, and regulation. Annu Rev Biochem 1987;56:945-93.

69. Gueguen Y, Mouzat K, Ferrari L, Tissandie E, Lobaccaro JM, Batt AM, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P, Souidi M. [Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance]. Ann Biol Clin (Paris) 2006;64:535-48. Les cytochromes P450: metabolisme des xenobiotiques, regulation et role en clinique.

70. Lai XS, Yang LP, Li XT, Liu JP, Zhou ZW, Zhou SF. Human CYP2C8: structure, substrate specificity, inhibitor selectivity, inducers and polymorphisms. Curr Drug Metab 2009;10:1009-47.

71. Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, et al. The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. DNA 1987;6:1-11.

72. Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, et al. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. DNA Cell Biol 1993;12:1-51.

73. Guengerich FP. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. AAPS J 2006;8:E101-11.

74. Schuetz EG. Induction of cytochromes P450. Curr Drug Metab 2001;2:139-47.

75. Totah RA, Rettie AE. Cytochrome P450 2C8: substrates, inhibitors, pharmacogenetics, and clinical relevance. Clin Pharmacol Ther 2005;77:341-52.
76. Gray IC, Nobile C, Muresu R, Ford S, Spurr NK. A 2.4-megabase physical map spanning the CYP2C gene cluster on chromosome 10q24. Genomics 1995;28:328-32.
77. Evans WE, Relling MV. Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. Nature 2004;429:464-8.
78. Inoue K, Inazawa J, Suzuki Y, Shimada T, Yamazaki H, Guengerich FP, Abe T. Fluorescence in situ hybridization analysis of chromosomal localization of three human cytochrome P450 2C genes (CYP2C8, 2C9, and 2C10) at 10q24.1. Jpn J Hum Genet 1994;39:337-43.
79. Klose TS, Blaisdell JA, Goldstein JA. Gene structure of CYP2C8 and extrahepatic distribution of the human CYP2Cs. J Biochem Mol Toxicol 1999;13:289-95.
80. de Morais SM, Schweikl H, Blaisdell J, Goldstein JA. Gene structure and upstream regulatory regions of human CYP2C9 and CYP2C18. Biochem Biophys Res Commun 1993;194:194-201.
81. Schoch GA, Yano JK, Wester MR, Griffin KJ, Stout CD, Johnson EF. Structure of human microsomal cytochrome P450 2C8. Evidence for a peripheral fatty acid binding site. J Biol Chem 2004;279:9497-503.
82. Newton DJ, Wang RW, Lu AY. Cytochrome P450 inhibitors. Evaluation of specificities in the in vitrometabolism of therapeutic agents by human liver microsomes. Drug Metab Dispos 1995;23:154-8.
83. Rahman A, Korzekwa KR, Grogan J, Gonzalez FJ, Harris JW. Selective biotransformation of taxol to 6 alpha-hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8. Cancer Res 1994;54:5543-6.
84. Rendic S, Di Carlo FJ. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. Drug Metab Rev 1997;29:413-580.
85. Knupfer H, Schmidt R, Stanitz D, Brauckhoff M, Schonfelder M, Preiss R. CYP2C and IL-6 expression in breast cancer. Breast 2004;13:28-34.
86. Nishimura M, Yaguti H, Yoshitsugu H, Naito S, Satoh T. Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. Yakugaku Zasshi 2003;123:369-75.
87. Kim KA, Park JY, Lee JS, Lim S. Cytochrome P450 2C8 and CYP3A4/5 are involved in chloroquine metabolism in human liver microsomes. Arch Pharm Res 2003;26:631-7.

88. Wang JS, Neuvonen M, Wen X, Backman JT, Neuvonen PJ. Gemfibrozil inhibits CYP2C8-mediated cerivastatin metabolism in human liver microsomes. Drug Metab Dispos 2002;30:1352-6.

89. Hamman MA, Thompson GA, Hall SD. Regioselective and stereoselective metabolism of ibuprofen by human cytochrome P450 2C. Biochem Pharmacol 1997;54:33-41.

90. Martinez C, Garcia-Martin E, Blanco G, Gamito FJ, Ladero JM, Agundez JA. The effect of the cytochrome P450 CYP2C8 polymorphism on the disposition of (R)-ibuprofen enantiomer in healthy subjects. Br J Clin Pharmacol 2005;59:62-9.

91. Dai D, Zeldin DC, Blaisdell JA, Chanas B, Coulter SJ, Ghanayem BI, Goldstein JA. Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. Pharmacogenetics 2001;11:597-607.

92. Solus JF, Arietta BJ, Harris JR, Sexton DP, Steward JQ, McMunn C, Ihrie P, Mehall JM, Edwards TL, Dawson EP. Genetic variation in eleven phase I drug metabolism genes in an ethnically diverse population. Pharmacogenomics 2004;5:895-931.

93. Bahadur N, Leathart JB, Mutch E, Steimel-Crespi D, Dunn SA, Gilissen R, Houdt JV, Hendrickx J, Mannens G, Bohets H, Williams FM, Armstrong M, Crespi CL, Daly AK. CYP2C8 polymorphisms in Caucasians and their relationship with paclitaxel 6alpha-hydroxylase activity in human liver microsomes. Biochem Pharmacol 2002;64:1579-89.

94. Niemi M, Leathart JB, Neuvonen M, Backman JT, Daly AK, Neuvonen PJ. Polymorphism in CYP2C8 is associated with reduced plasma concentrations of repaglinide. Clin Pharmacol Ther 2003;74:380-7.

95. Nakajima M, Fujiki Y, Noda K, Ohtsuka H, Ohkuni H, Kyo S, Inoue M, Kuroiwa Y, Yokoi T. Genetic polymorphisms of CYP2C8 in Japanese population. Drug Metab Dispos 2003;31:687-90.

96. Soyama A, Hanioka N, Saito Y, Murayama N, Ando M, Ozawa S, Sawada J. Amiodarone N-deethylation by CYP2C8 and its variants, CYP2C8*3 and CYP2C8 P404A. Pharmacol Toxicol 2002;91:174-8.

97. Soyama A, Saito Y, Hanioka N, Murayama N, Nakajima O, Katori N, Ishida S, Sai K, Ozawa S, Sawada JI. Non-synonymous single nucleotide alterations found in the CYP2C8 gene result in reduced in vitro paclitaxel metabolism. Biol Pharm Bull 2001;24:1427-30.

98. Garcia-Martin E, Martinez C, Tabares B, Frias J, Agundez JA. Interindividual variability in ibuprofen pharmacokinetics is related to interaction of cytochrome P450 2C8 and 2C9 amino acid polymorphisms. Clin Pharmacol Ther 2004;76:119-27.

99. Lopez-Rodriguez R, Novalbos J, Gallego-Sandin S, Roman-Martinez M, Torrado J, Gisbert JP, Abad-Santos F. Influence of CYP2C8 and CYP2C9 polymorphisms on pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters of racemic and enantiomeric forms of ibuprofen in healthy volunteers. Pharmacol Res 2008;58:77-84.

100. Yasar U, Lundgren S, Eliasson E, Bennet A, Wiman B, de Faire U, Rane A. Linkage between the CYP2C8 and CYP2C9 genetic polymorphisms. Biochem Biophys Res Commun 2002;299:25-8.

101. Davies NM. Clinical pharmacokinetics of ibuprofen. The first 30 years. Clin Pharmacokinet 1998;34:101-54.

102. Geisslinger G, Stock KP, Loew D, Bach GL, Brune K. Variability in the stereoselective disposition of ibuprofen in patients with rheumatoid arthritis. Br J Clin Pharmacol 1993;35:603-7.

103. Villanueva M, Heckenberger R, Strobach H, Palmer M, Schror K. Equipotent inhibition by R(-)-, S(+)- and racemic ibuprofen of human polymorphonuclear cell function in vitro. Br J Clin Pharmacol 1993;35:235-42.

104. Reichel C, Brugger R, Bang H, Geisslinger G, Brune K. Molecular cloning and expression of a 2-arylpropionyl-coenzyme A epimerase: a key enzyme in the inversion metabolism of ibuprofen. Mol Pharmacol 1997;51:576-82.

105. Day RO, Williams KM, Graham GG, Lee EJ, Knihinicki RD, Champion GD. Stereoselective disposition of ibuprofen enantiomers in synovial fluid. Clin Pharmacol Ther 1988;43:480-7.

106. Leemann TD, Transon C, Bonnabry P, Dayer P. A major role for cytochrome P450TB (CYP2C subfamily) in the actions of non-steroidal antiinflammatory drugs. Drugs Exp Clin Res 1993;19:189-95.

107. Hirt D, Van Overmeire B, Treluyer JM, Langhendries JP, Marguglio A, Eisinger MJ, Schepens P, Urien S. An optimized ibuprofen dosing scheme for preterm neonates with patent ductus arteriosus, based on a population pharmacokinetic and pharmacodynamic study. Br J Clin Pharmacol 2008;65:629-36.

108. Blanco G, Martinez C, Ladero JM, Garcia-Martin E, Taxonera C, Gamito FG, Diaz-Rubio M, Agundez JA. Interaction of CYP2C8 and CYP2C9 genotypes modifies the risk for nonsteroidal anti-inflammatory drugs-related acute gastrointestinal bleeding. Pharmacogenet Genomics 2008;18:37-43.

109. Narayanan M, Cooper B, Weiss H, Clyman RI. Prophylactic indomethacin: factors determining permanent ductus arteriosus closure. J Pediatr 2000;136:330-7.

110. Palder SB, Schwartz MZ, Tyson KR, Marr CC. Management of patent ductus arteriosus: a comparison of operative v pharmacologic treatment. J Pediatr Surg 1987;22:1171-4.
111. Trus T, Winthrop AL, Pipe S, Shah J, Langer JC, Lau GY. Optimal management of patent ductus arteriosus in the neonate weighing less than 800 g. J Pediatr Surg 1993;28:1137-9.
112. Evans N. Preterm patent ductus arteriosus: should we treat it? J Paediatr Child Health 2012;48:753-8.
113. Ballabh P. Pathogenesis and prevention of intraventricular hemorrhage. Clin Perinatol 2014;41:47-67.
114. Repa A, Thanhaeuser M, Endress D, Weber M, Kreissl A, Binder C, Berger A, Haiden N. Probiotics (Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum) prevent NEC in VLBW infants fed breast milk but not formula. Pediatr Res 2015;77:381-8.
115. Lin HC, Su BH, Chen AC, Lin TW, Tsai CH, Yeh TF, Oh W. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. Pediatrics 2005;115:1-4.
116. Durrmeyer X, Hovhannisyan S, Medard Y, Jacqz-Aigrain E, Decobert F, Barre J, Alberti C, Aujard Y, Danan C, Baud O. Are cytochrome P450 CYP2C8 and CYP2C9 polymorphisms associated with ibuprofen response in very preterm infants? PLoS One 2010;5:e12329.
117. Horbar JD. The Vermont-Oxford Neonatal Network: integrating research and clinical practice to improve the quality of medical care. Semin Perinatol 1995;19:124-31.
118. Ohlsson A, Walia R, Shah SS. Ibuprofen for the treatment of patent ductus arteriosus in preterm and/or low birth weight infants. Cochrane Database Syst Rev 2013;4:CD003481.
119. Clyman RI, Chorne N. Patent ductus arteriosus: evidence for and against treatment. J Pediatr 2007;150:216-9.
120. Laughon MM, Simmons MA, Bose CL. Patency of the ductus arteriosus in the premature infant: is it pathologic? Should it be treated? Curr Opin Pediatr 2004;16:146-51.
121. Benitz WE. Treatment of persistent patent ductus arteriosus in preterm infants: time to accept the null hypothesis? J Perinatol 2010;30:241-52.
122. Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. Anal Bioanal Chem 2008;392:1093-108.

123. Rheinlaender C, Helfenstein D, Pees C, Walch E, Czernik C, Obladen M, Koehne P. Neurodevelopmental outcome after COX inhibitor treatment for patent ductus arteriosus. Early Hum Dev 2010;86:87-92.

124. Chorne N, Leonard C, Piecuch R, Clyman RI. Patent ductus arteriosus and its treatment as risk factors for neonatal and neurodevelopmental morbidity. Pediatrics 2007;119: 1165-74.

125. Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. Am J Respir Crit Care Med 2001;163:1723-9.

126. Hartel C, Konig I, Koster S, Kattner E, Kuhls E, Kuster H, Moller J, Muller D, Kribs A, Segerer H, Wieg C, Herting E, Gopel W. Genetic polymorphisms of hemostasis genes and primary outcome of very low birth weight infants. Pediatrics 2006;118:683-9.

127. Spiegler J, Gilhaus A, Konig IR, Kattner E, Vochem M, Kuster H, Moller J, Muller D, Kribs A, Segerer H, Wieg C, Nikischin W, von der Wense A, Gebauer C, Herting E, Gopel W. Polymorphisms in the Renin-Angiotensin system and outcome of very-low-birthweight infants. Neonatology 2010;97:10-4.

128. Meller S, Bhandari V. VEGF levels in humans and animal models with RDS and BPD: temporal relationships. Exp Lung Res 2012;38:192-203.

129. Treszl A, Szabo M, Dunai G, Nobilis A, Kocsis I, Machay T, Tulassay T, Vasarhelyi B. Angiotensin II type 1 receptor A1166C polymorphism and prophylactic indomethacin treatment induced ductus arteriosus closure in very low birth weight neonates. Pediatr Res 2003;54:753-5.

130. Dagle JM, Lepp NT, Cooper ME, Schaa KL, Kelsey KJ, Orr KL, Caprau D, Zimmerman CR, Steffen KM, Johnson KJ, Marazita ML, Murray JC. Determination of genetic predisposition to patent ductus arteriosus in preterm infants. Pediatrics 2009;123: 1116-23.

131. Stoller JZ, Demauro SB, Dagle JM, Reese J. Current Perspectives on Pathobiology of the Ductus Arteriosus. J Clin Exp Cardiolog 2012;8.

132. Webler AC, Michaelis UR, Popp R, Barbosa-Sicard E, Murugan A, Falck JR, Fisslthaler B, Fleming I. Epoxyeicosatrienoic acids are part of the VEGF-activated signaling cascade leading to angiogenesis. Am J Physiol Cell Physiol 2008;295:C1292-301.

133. Rifkind AB, Lee C, Chang TK, Waxman DJ. Arachidonic acid metabolism by human cytochrome P450s 2C8, 2C9, 2E1, and 1A2: regioselective oxygenation and evidence for a role for CYP2C enzymes in arachidonic acid epoxygenation in human liver microsomes. Arch Biochem Biophys 1995;320:380-9.

134. Node K, Huo Y, Ruan X, Yang B, Spiecker M, Ley K, Zeldin DC, Liao JK. Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. Science 1999;285:1276-9.
135. Imig JD. Eicosanoid regulation of the renal vasculature. Am J Physiol Renal Physiol 2000;279:F965-81.
136. Daily EB, Aquilante CL. Cytochrome P450 2C8 pharmacogenetics: a review of clinical studies. Pharmacogenomics 2009;10:1489-510.
137. Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I, Busse R. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. Nature 1999;401:493-7.
138. Fleming I, Michaelis UR, Bredenkotter D, Fisslthaler B, Dehghani F, Brandes RP, Busse R. Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. Circ Res 2001;88:44-51.
139. Jarrar YB, Cho SA, Oh KS, Kim DH, Shin JG, Lee SJ. Identification of cytochrome P450s involved in the metabolism of arachidonic acid in human platelets. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2013;89:227-34.
140. Tsantes AE, Ikonomidis I, Papadakis I, Bonovas S, Gialeraki A, Kottaridi C, Kyriakou E, Kokori S, Douramani P, Kopterides P, Karakitsos P, Lekakis J, Kapsimali V. Impact of the proton pump inhibitors and CYP2C19*2 polymorphism on platelet response to clopidogrel as assessed by four platelet function assays. Thromb Res 2013;132:e105-11.
141. Kearns GL, Abdel-Rahman SM, Alander SW, Blowey DL, Leeder JS, Kauffman RE. Developmental pharmacology--drug disposition, action, and therapy in infants and children. N Engl J Med 2003;349:1157-67.
142. Alexander GR, Kogan M, Bader D, Carlo W, Allen M, Mor J. US birth weight/gestational age-specific neonatal mortality: 1995-1997 rates for whites, hispanics, and blacks. Pediatrics 2003;111:e61-6.
143. Farrell PM, Wood RE. Epidemiology of hyaline membrane disease in the United States: analysis of national mortality statistics. Pediatrics 1976;58:167-76.
144. Ranganathan D, Wall S, Khoshnood B, Singh JK, Lee KS. Racial differences in respiratory-related neonatal mortality among very low birth weight infants. J Pediatr 2000;136:454-9.
145. Hamvas A, Wise PH, Yang RK, Wampler NS, Noguchi A, Maurer MM, Walentik CA, Schramm WF, Cole FS. The influence of the wider use of surfactant therapy on neonatal mortality among blacks and whites. N Engl J Med 1996;334:1635-40.

146. Lavoie PM, Pham C, Jang KL. Heritability of bronchopulmonary dysplasia, defined according to the consensus statement of the national institutes of health. Pediatrics 2008;122:479-85.

147. Bhandari V, Zhou G, Bizzarro MJ, Buhimschi C, Hussain N, Gruen JR, Zhang H. Genetic contribution to patent ductus arteriosus in the premature newborn. Pediatrics 2009;123:669-73.

148. Treluyer JM, Gueret G, Cheron G, Sonnier M, Cresteil T. Developmental expression of CYP2C and CYP2C-dependent activities in the human liver: in-vivo/in-vitro correlation and inducibility. Pharmacogenetics 1997;7:441-52.

149. Garcia-Martin E, Martinez C, Ladero JM, Agundez JA. Interethnic and intraethnic variability of CYP2C8 and CYP2C9 polymorphisms in healthy individuals. Mol Diagn Ther 2006;10:29-40.

150. Agundez JA, Garcia-Martin E, Martinez C. Genetically based impairment in CYP2C8- and CYP2C9-dependent NSAID metabolism as a risk factor for gastrointestinal bleeding: is a combination of pharmacogenomics and metabolomics required to improve personalized medicine? Expert Opin Drug Metab Toxicol 2009;5:607-20.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der fetale Blutkreislauf 2
Abbildung 2: Einflussfaktoren auf den funktionellen Ductusverschluss 4
Abbildung 3: Intrauteriner Umbauprozess des Ductus arteriosus mit Ausbildung neointimaler Kissen 6
Abbildung 4: Vergleich der Wirkung und der Nebenwirkungen von Ibuprofen und Indometacin 11
Abbildung 5: Struktur des CYP2C8-Gens 16
Abbildung 6: Schematischer Ablauf der Versuche zur Polymorphismenanalyse 22
Abbildung 7: Guthrie-Filterkarte für das Stoffwechselscreening im Rahmen der U2-Vorsorgeuntersuchung 23
Abbildung 8: Darstellung des RFLP von CYP2C8*3 Exon 3 und Exon 8 27
Abbildung 9: EtBr-haltiges 3-prozentiges Agarosegel mit aufgetrennten Patientenproben am Beispiel von Exon 8 29
Abbildung 10: Flow-Chart der Studienpopulation 31
Abbildung 11: Übersicht zur PDA-Intervention. 34
Abbildung 12: Allelfrequenzen der verschiedenen Populationen 38
Abbildung 13: Kein hsPDA (nicht therapiert) und Verschlusszeitpunkt in Abhängigkeit von der Anzahl mutierter Allele 39
Abbildung 14: Verschlusszeitpunkt des Ductus in der Gesamtpopulation in Abhängigkeit von der Anzahl mutierter Allele 40
Abbildung 15: Mutationsverteilung des Polymorphismus und COX-Hemmer-Zyklusbedarf 41
Abbildung 16: Therapieansprechen in Bezug auf das Auftreten mutierter Allele 42
Abbildung 17: Ethnizität der Responder und Non-Responder. 46

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakterisierung der Primer 25
Tabelle 2: Optimierter PCR-Ansatz für Exon 3 und Exon 8 25
Tabelle 3: Optimiertes PCR-Programm für Exon 3 und 8. 26
Tabelle 4: Verdau von Exon 3 und Exon 8 mit BseRI und PdmI. 27
Tabelle 5: Optimierter Verdau-Ansatz für Exon 3 und 8 28
Tabelle 6: Vergleich des klinischen Profils zwischen den Gruppen mit PDA und ohne PDA. 33
Tabelle 7: Vergleich des klinischen Profils der Responder und Non-Responder innerhalb der Therapiegruppe 35
Tabelle 8: Mutationsverteilung des Polymorphismus in der Gesamtpopulation und in den Gruppen ohne PDA bzw. ohne hsPDA. 36
Tabelle 9: Gegenüberstellung von Exon 3 und Exon 8 bezüglich der Mutationsverteilung des Polymorphismus innerhalb der Studienpopulation. 37
Tabelle 10: Kein hsPDA (nicht therapiert) und Verschlusszeitpunkt in Abhängigkeit von der Anzahl mutierter Allele 39
Tabelle 11: Gegenüberstellung des CYP-Polymorphismus in den beiden COX-Hemmer-Gruppen bezüglich des Therapieausgangs 41
Tabelle 12: Gegenüberstellung des CYP2C8*3-Polymorphismus in der gesamten Studienpopulation unter Berücksichtigung des Therapieausgangs 42
Tabelle 13: Vergleich klinisches Profil der CYP-Untergruppen der Gesamtpopulation 44
Tabelle 14: Vergleich klinisches Profil der CYP-Untergruppen der Studienpopulation 45
Tabelle 15: Mutationsverteilung für Exon 3 bei Zwillingspaaren 45
Tabelle 16: Mutationsverteilung für Exon 8 bei Zwillingspaaren 46

8 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Tamara Klippstein, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle des CYP2C8*3-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 (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.
Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Berlin, den 25. August 2015

9 Lebenslauf

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

10 Publikationsliste

Geteilte Autorenschaften sind mit * markiert.

1. Bedeutung des CYP2C8*3 Polymorphismus für den medikamentösen Ductusverschluss mit COX-Hemmern bei sehr kleinen Frühgeborenen.
S Berkmann, S Endesfelder, T Klippstein, C Mayerhofer, T Aydin, C Bührer, P Koehne, 38. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, 2012, Abstract veröffentlicht in: Monatsschrift Kinderheilkunde, September 2012, Supplement 1, Seite 142.

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

3. Platelet counts and prediction of treatment failure in pharmacological ductus arteriosus closure.
H Sallmon, M Cremer, SC Weber, T Klippstein, J Dirks, T Schiffer, A Stein, C Bührer, U Felderhoff-Müser, G Hansmann, P Koehne. Will be submitted September 2015 to the European Journal of Pediatrics.

11 Danksagung

Allen voran möchte ich mich besonders bei Frau PD Dr. Petra Koehne für die Bereitstellung des Promotionsthemas bedanken, bei dessen Bearbeitung sie mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Vielen Dank für die ausgezeichnete Betreuung, die neuen Ratschläge, die konstruktive Kritik bei der Verschriftlichung der Ergebnisse, das offene Ohr für alle Probleme und den ein oder anderen Kaffee. Ohne ihre fortwährende Unterstützung, nicht nur fachlich, sondern auch menschlich, wäre diese Arbeit sicher nicht so zum Ende gekommen.

Die Kosten für den Nachweis des CYP2C8*3-Polymorphismus wurden zum Teil durch Mittel eines Lydia-Rabinowitsch-Stipendiums von Frau PD Dr. Petra Koehne finanziert.

Herrn Prof. Dr. Christoph Bührer danke ich für das stete Interesse am Inhalt und an der Fertigstellung der Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Stefanie Endesfelder für die schnelle und gründliche Einarbeitung in die Methodik dieser Arbeit, für die Hilfe, wenn es doch mal nicht geklappt hat und für die vielen Erklärungen nebenbei. Boris Metze danke ich für die Beratung bei der Auswertung meiner Ergebnisse.

Vielen Dank an alle Freunde, die mich während des Studiums begleitet haben, vor allem an Christina, denn wegen ihr war die Zeit im Labor bei langen PCR-Zyklen oder der Auswertung der Gel-Elektrophoresen sehr viel unterhaltsamer. Und danke, Lisa: Für das Hinsetzen mit mir, um mich zum Schreiben zu motivieren.

Danke an Marius, für die nicht endende Geduld, die Motivation und die Aufmunterungen bei Schwierigkeiten. Und einen riesigen Dank an meine Familie, die immer an mich geglaubt und mich unterstützt hat.