
Aus dem

Charité Centrum für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin

mit Perinatalzentrum und Humangenetik (CC17)

Klinik für Neonatologie

Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Christoph Bühner

HABILITATIONSSCHRIFT

DIE BEDEUTUNG VON

CYCLOOXYGENASEHEMMERN UND ANGIOGENESEFAKTOREN

BEIM DUCTUSVERSCHLUSS FRÜHGEBORENER

Zur Erlangung der Venia Legendi

für das Fach Kinderheilkunde

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät

Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Petra Koehne

geboren am 06.07.1967 in Berlin

eingereicht: im November 2011

Dekanin: Frau Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Herr Professor Gerhard Jorch, Universitätsklinikum Magdeburg

2. Gutachter: Herr Professor Helmut Hummler, Universitätsklinikum Ulm

Meinen Kindern

Jonas und Johanna Rosen

und

In memoriam meinem lieben Vater

Peter Koehne

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1. EINLEITUNG	
1.1 Pathophysiologie des persistierenden Ductus arteriosus	7
1.1.1 Anatomie, Funktion und Verschluss während der postnatalen Adaptation	7
1.1.2 Rolle der Cyclooxygenasen	12
1.1.3 Funktion von VEGF und dessen Rezeptoren	15
1.1.4 Klinische Bedeutung beim Frühgeborenen	17
1.1.5 Mögliche Komplikationen	18
1.1.6 Einfluss auf die spätere neurologische Entwicklung von Frühgeborenen	19
1.2 Diagnose und Therapie des persistierenden Ductus Frühgeborener	20
1.2.1 Echokardiographie	20
1.2.2 Biochemische Marker	21
1.2.3 Medikamentöser Verschluss - Indometacin	21
1.2.4 Medikamentöser Verschluss - Ibuprofen	22
1.2.5 Ductusligatur	24
1.3 Modellsysteme zur Untersuchung des Ductusverschlusses bei Frühgeborenen	25
1.3.1 Zellkultur	25
1.3.2 Histologische Untersuchungen an humanen post mortem Präparaten	26
1.3.3 Klinische Modelle	27
2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	28
3. VERZEICHNIS DER ZUR KUMULATIVEN HABILITATION ZUSAMMENGEFASSTEN PUBLIKATIONEN	30
4. FRAGESTELLUNGEN UND ERGEBNISSE IN DEN VORGESTELLTEN ORIGINALARBEITEN ZUM THEMA	31

4.1 Histologische Untersuchung der entwicklungsabhängigen Expression von COX-1, COX-2, VEGF und dessen Rezeptoren im humanen Ductusgewebe	31
4.1.1 Histologische Untersuchung der entwicklungsabhängigen Expression von Cyclooxygenasen und deren EP4 Rezeptor im humanen Ductusgewebe	32
4.1.2 Histologische Untersuchung der entwicklungsabhängigen Expression von VEGF und dessen Rezeptoren im humanen Ductusgewebe	40
4.2 Steuerung der Ductusintervention bei Frühgeborenen mittels BNP und Echokardiographie	48
4.2.1 Vorhersage der Ductusintervention bei Frühgeborenen mit einem Gestationsalter < 28 Wochen mittels brain-type natriuretischem Peptid	49
4.2.2 Vorhersage des Ductusverschlusses unter Ibuprofentherapie bei Frühgeborenen mit einem Gestationsalter < 28 Wochen mittels Echokardiographie	56
4.3 Komplikationen nach medikamentöser und chirurgischer Ductusintervention bei sehr untergewichtigen Frühgeborenen	64
4.3.1 Komplikationen nach Ductusintervention	65
4.3.2 Ibuprofen erhöht die Bilirubintoxizität in Neuronenkulturen der Ratte	75
4.3.3 Einfluss der Cyclooxygenasehemmer auf den Frühgeborenenikterus	82
4.4 Neurologische Entwicklung Frühgeborener nach medikamentöser Ductusintervention mit Cyclooxygenasehemmern	91
5. DISKUSSION DER ERGEBNISSE UND AUSBLICK	99
5.1 Diskussion der ex vivo und in vitro Ergebnisse	99
5.2 Diskussion der klinischen Ergebnisse bei Frühgeborenen	106
6. ZUSAMMENFASSUNG	119
7. LITERATURVERZEICHNIS	121
8. DANKSAGUNG	137
9. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG gemäß § 4 Abs. 3 der HabOMed der Charité	140

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ANP	atriales natriuretisches Peptid
BNP	brain-type natriuretisches Peptid
BPD	bronchopulmonale Dysplasie
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CI	Konfidenzintervall
COX	Cyclooxygenase
CYP	Cytochrom P450 Komplex
DA	Ductus arteriosus
ET-1	Endothelin-1
EP	Prostaglandin E ₂ Rezeptor
GA	Gestationsalter
GG	Geburtsgewicht
hsPDA	hämodynamisch signifikanter persistierender Ductus arteriosus
IVH	intraventrikuläre Hirnblutung
LDH	Laktatdehydrogenase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
NEC	nekrotisierende Enterokolitis
NNT	Anzahl der notwendigen Behandlungen (number needed to treat)
NO	Stickstoffmonoxid

PDA	persistierender Ductus arteriosus
PG	Prostaglandin
PGE	Prostaglandin E
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGI ₂	Prostazyklin
PVL	periventrikuläre Leukomalazie
ROC	Grenzwertoptimierungsmethode (receiver operating characteristic)
ROP	Frühgeborenenretinopathie
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RR	relatives Risiko
SSW	Schwangerschaftswoche
TBC	Gesamtbilirubinkonzentration
UB	ungebundenen (freies) Bilirubin
UCB	unkonjugiertes Bilirubin
VEGF	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor
VEGF-R	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor
VLBW	sehr untergewichtig (very low birth weight)

1. EINLEITUNG

1.1 Pathophysiologie des persistierenden Ductus arteriosus

Erstmals wurde die fetale Struktur, die wir heute Ductus arteriosus (DA) Botalli¹ nennen, von Galen beschrieben². Die funktionelle Bedeutung wurde jedoch erst erkannt, als Harvey im 17. Jahrhundert den Blutkreislauf entdeckte³. Virchow beschrieb als erster den histologischen Unterschied zwischen dem DA und anderen großen Arterien sowie dessen klinische Bedeutung für den postnatalen Verschluss⁴. Die sorgfältige Untersuchung und das Verständnis der physiologischen Reifeprozesse sowie deren genaue zeitliche Abläufe ist maßgebliche Voraussetzung zur optimalen Behandlung Frühgeborener und zur Entwicklung neuer pharmakologischer Interventionen. Im Folgenden werden fokussiert einige Besonderheiten des Ductusverschlusses, wichtige Ursachen und Auswirkungen der Ductuspersistenz bei Frühgeborenen sowie verschiedene Therapieoptionen dargestellt. Diese sind auch Gegenstand der vorliegenden experimentellen und klinischen Arbeiten.

1.1.1 Anatomie, Funktion und Verschluss während der postnatalen Adaptation

Der DA ist eine fetale Gefäßverbindung zwischen dem Pulmonalarterienstamm und dem absteigenden Teil des Aortenbogens. Embryonal geht der DA aus der sechsten Pharyngealbogenarterie der linken Seite hervor⁵. Bereits die frühe Entwicklung des DA ist genetisch anders programmiert und führt dazu, dass er im Gegensatz zu den umliegenden elastischen großen Arterien eine muskuläre Gefäßwand entwickelt⁶. Die ausgeprägte Media des DA ist aus longitudinal und spiralförmig angeordneten Schichten glatter Muskelzellfasern aufgebaut, die inmitten von konzentrischen Schichten elastischen Gewebes verlaufen⁷. Im fetalen Blutkreislauf leitet der DA unter Umgehung der Lunge einen Großteil des in der Plazenta mit Sauerstoff angereicherten Blutes direkt vom rechten Herzen in den großen Kreislauf (Abb. 1). Ein Offenbleiben des DA in utero ist für den Fetus ebenso wichtig wie sein Verschluss postnatal für das nun selbständig atmende Neugeborene. Der relativ niedrige Sauerstoffpartialdruck und hohe fetale Serumspiegel verschiedener Prostaglandine (PGE₂ und PGI₂) halten durch ihre vasodilatatorische Wirkung den DA während der Schwangerschaft offen. Der bereits im Verlauf der Schwangerschaft in Vorberitung auf seinen Verschluss nach der Geburt einsetzende vorprogrammierte Umbau des Gefäßes ist eine weitere Besonderheit des DA. Morphologische Veränderungen der Ductusarchitektur zeigen sich ab zweitem Trimenon der Schwangerschaft. Bis zu diesem Zeitpunkt ist der DA eine muskuläre Arterie mit einer gut ausgebildeten Media und einer prominenten, stellenweise zweischichtigen Lamina elastica interna, die von einer dünnen Intima ausgekleidet wird⁸⁻¹⁰ (Abb. 2A).

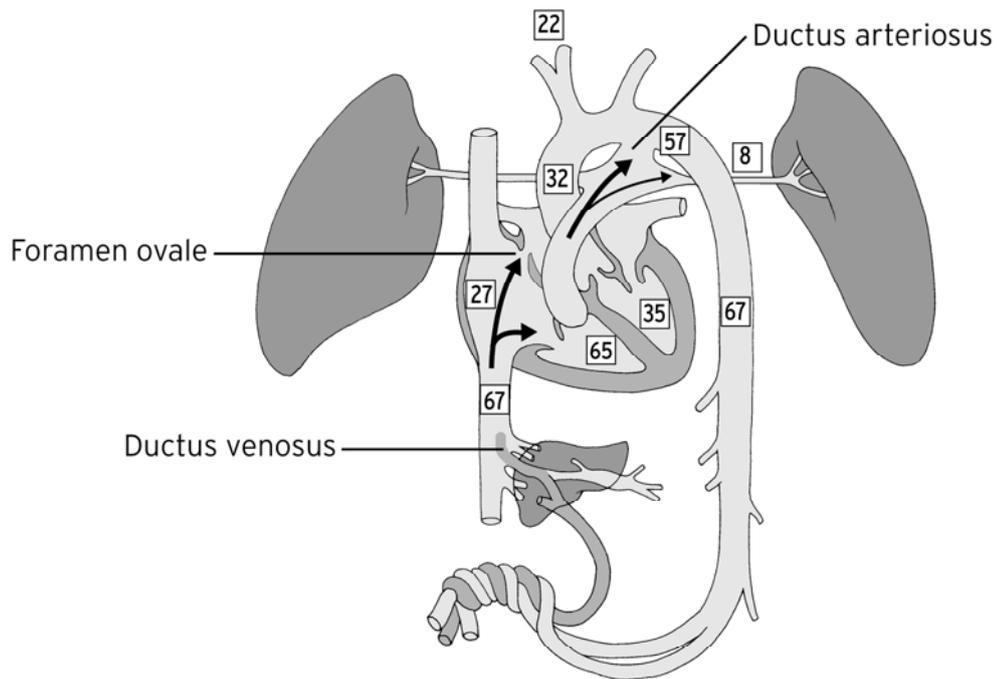


Abb. 1: Fetaler Kreislauf mit Angabe der prozentualen Beteiligung am kardialen Output:

Im fetalen Blutkreislauf fließt ein Drittel des Herzzeitvolumens über das Foramen ovale vom rechten in den linken Vorhof, um anschließend über die Aorta ascendens einen großen Teil der zerebralen Versorgung zu übernehmen. Von den zwei Dritteln des Herzzeitvolumens, die in den Truncus pulmonalis ausgeworfen werden, gelangen lediglich 8% in die Lunge. Der überwiegende Teil des Blutvolumens wird über den DA in die Aorta descendens geleitet, die zu diesem Zeitpunkt den gleichen Gefäßdruck wie der Pulmonalarterienstamm aufweist.

Im Rahmen seines Reifungsprozesses kommt es durch Migration glatter Muskelzellen aus der Media in die Intima und infolge der Proliferation luminaler Endothelien zur Ausbildung von neointimalen Kissen, die eine zunehmende Verdickung der innersten Gefäßschicht bewirken^{11, 12} (Abb. 2B). Der Verschluss des DA nach der Geburt verläuft in zwei Phasen. Nach der initialen Phase des funktionellen Verschlusses folgt der dauerhafte anatomische Umbau zum Ligamentum arteriosum. Im Rahmen der postnatalen Adaptation bewirkt die Unterbrechung des Plazentakreislaufs einen Anstieg des systemischen Gefäßwiderstands, einen Wegfall der plazentar produzierten Prostaglandine PGE₂ und PGI₂¹³ und eine Erhöhung des CO₂-Partialdruckes. Die infolgedessen einsetzende Atmung führt über einen Anstieg des Sauerstoffpartialdruckes zu einer Erweiterung der Pulmonalarterien und zu einem Abfall des Widerstands im Lungengefäßbett, wodurch der pulmonale Blutfluss zunimmt. Parallel hierzu reduziert sich der rechts-links Shunt über das Foramen ovale und den DA erheblich (Abb. 3).

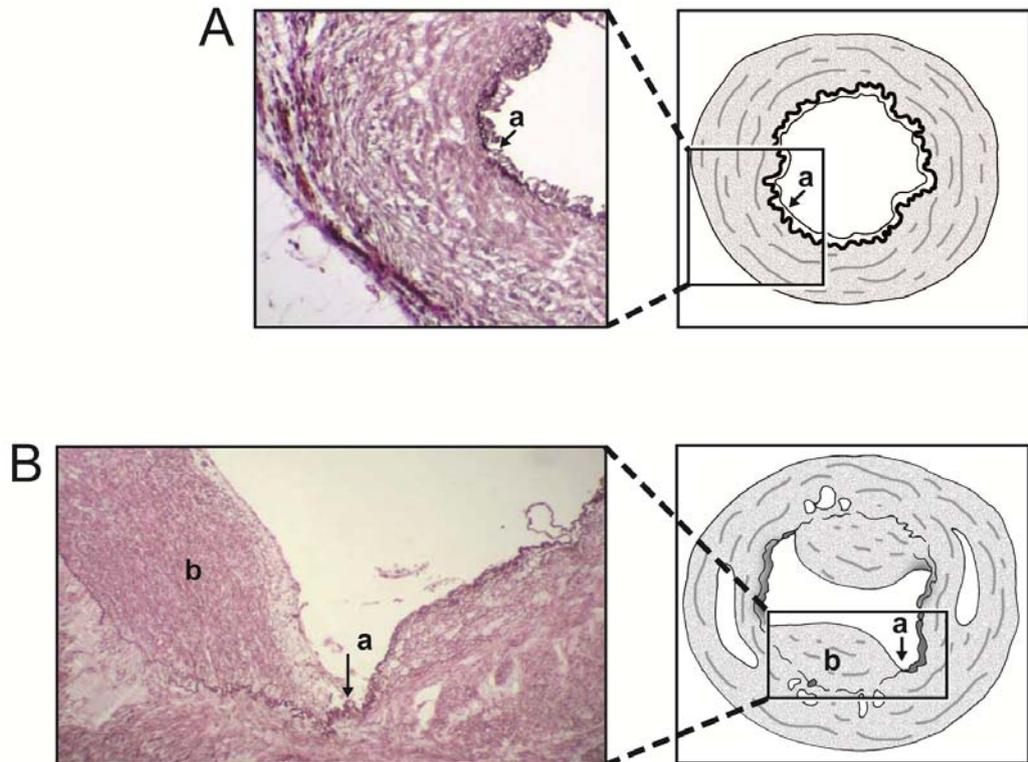


Abb. 2: Schematische und histologische Darstellung des morphologischen Umbaus des humanen DA im Rahmen seines Reifungsprozesses:

Die oberen Bilder zeigen die charakteristische Morphologie eines unreifen DA mit palisadenartig angeordnetem Endothel, intakter Lamina elastica und fehlenden Intimakissen. In der unteren Reihe Bilder eines DA im fortgeschrittenen Reifestadium mit flachem Endothel, fragmentierter Lamina elastica und deutlich ausgebildeten neointimalen Kissen. Histologische Gewebeschnitte des DA nach Elastika van Gieson und Hämatoxylin-Eosin Färbung in 10- und 40-facher Vergrößerung. a, Lamina elastica interna; b, Intimakissen.

Die erhöhte Clearance zirkulierender Prostaglandine in der neonatalen Lunge trägt postnatal zum weiteren Absinken der Prostaglandinspiegel bei¹⁴. Der endgültige Ductusverschluss resultiert aus der Interaktion von lokal gebildeten und zirkulierenden Faktoren (Abb. 4) sowie der einzigartigen Ductusstruktur¹⁵. Die glatten Muskelzellen des DA fungieren dabei als Sauerstoffsensor, wohingegen das Ductusendothel vasoaktive Substanzen freisetzt, die für die Modulation des ductalen Gefäßtonus wichtig sind. Nach der Geburt sind der steigende Sauerstoffpartialdruck und die sinkende Konzentration zirkulierender Prostaglandine die wichtigsten Faktoren, die synergistisch innerhalb von 10 bis 72 Stunden postnatal bei reifen Neugeborenen eine Kontraktion der glatten Muskelzellen des DA bewirken und somit zum funktionellen Ductusverschluss führen¹⁶. Der Mechanismus, durch den Sauerstoff eine Kontraktion des DA induziert, ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen¹⁷⁻¹⁹.

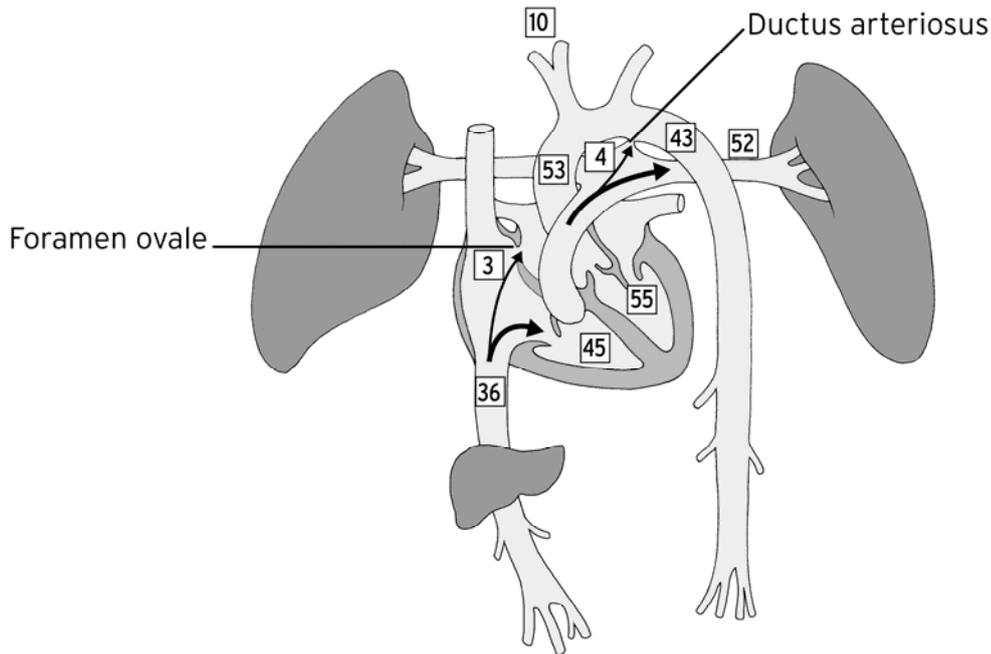


Abb. 3: Postnatale Kreislaufzirkulation mit Angabe der prozentualen Beteiligung am kardialen Output:

Im Rahmen der postnatalen Adaptation führen sinkender pulmonaler und steigender systemischer Gefäßwiderstand zu einer Abnahme des rechts-links Shuntflusses über das Foramen ovale und über den DA auf 3-4% des Herzzeitvolumens.

Infolge des erhöhten Sauerstoffpartialdruckes kommt es zu einer Membrandepolarisation der glatten Muskelzellen des DA, die über einen Kalziumeinstrom die Kontraktion der Zellen auslöst²⁰. Entwicklungsabhängig regulierte Kaliumkanäle ermöglichen ihrerseits durch die Öffnung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen einen gesteigerten Kalziumeinstrom²¹. Zusätzlich kann über Freisetzung mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und nachfolgender Aktivierung des Rho/Rho-Kinase Signalwegs eine Kalziumsensibilisierung induziert werden, wodurch eine dauerhafte Gefäßkonstriktion als Folge anhaltender Phosphorylierung von Myosin-Leichtketten auftritt^{22, 23}. Außerdem führt Sauerstoff am Ductus zur vermehrten Freisetzung des potenten Vasokonstriktors Endothelin-1, der intrazelluläres Kalzium G-Protein vermittelt steigert^{24, 25}. Durch die erfolgreiche Kontraktion der glatten Muskelzellen bildet sich in der Ductuswand eine lokale „Hypoxiezone“, in der die Zellen weder über die ebenfalls kontrahierten Vasa vasorum noch durch Diffusion aus dem Lumen ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden. Folglich dehnt sich die innere avaskuläre Zone des DA auf nahezu die gesamte Gefäßwand aus und führt zum Zelltod unterversorgter Glattmuskelzellen. Ferner hemmt die Gewebhypoxie die lokale Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) und PGE₂²⁶. Die resultierende anhaltende Hypoxie ist der

entscheidende Auslöser für die zweite Phase des anatomischen Ductusumbaus¹⁰. In dieser Phase induziert die verstärkte Bildung Hypoxie-abhängig regulierter Wachstumsfaktoren wie VEGF und Transforming Growth Factor- β (TGF- β) durch Dedifferenzierung und Proliferation von Glattmuskelzellen den Gefäßumbau des DA zum Ligamentum arteriosum²⁷. Der komplette anatomisch-morphologische Verschluss des DA ist erst 2-3 Wochen postnatal abgeschlossen²⁸.

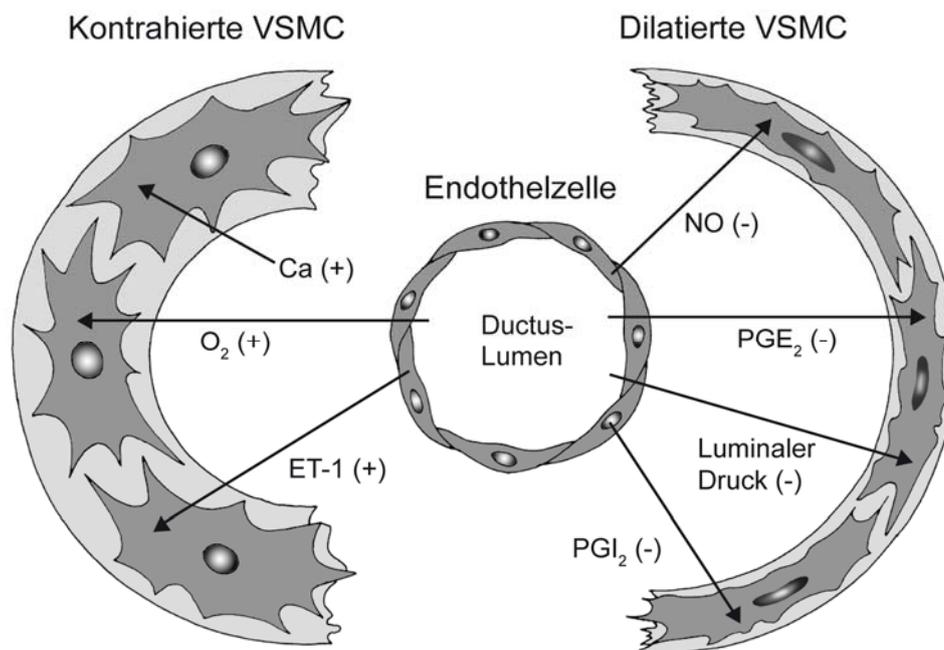


Abb. 4: Faktoren, die den funktionellen Ductusverschluss beeinflussen:

Neben den Prostaglandinen PGE₂ und PGI₂ sind Stickstoffmonoxid (NO) und der im Blutgefäß herrschende Druck wichtige Mediatoren für eine Ductusdilataion. Im Gegensatz dazu bewirken Endothelin-1 (ET-1), Kalzium (Ca²⁺) und ein steigender Sauerstoffpartialdruck eine aktive Konstriktion der Ductusgefäßwand.

Dass auch Thrombozyten eine wichtige Rolle beim Ductusverschluss spielen, wurde erst kürzlich durch die Arbeitsgruppe von Echter aufgedeckt²⁹. Mittels intravitraler konfokaler Mikroskopie ist es bei neonatalen Mäusen gelungen, die Akkumulation von Thrombozyten im Ductuslumen während der Verschlussphase nachzuweisen. Im Modell von Echter (Abb. 5) bewirkt die unvollständige und reversible Kontraktion des DA zunächst eine Veränderung der luminalen Auskleidung des DA. Durch Aktivierung von Endothelzellen, Ablagerung des vonWillebrand Faktors und Fibrin bekommt das DA Lumen ein prothrombotisches Erscheinungsbild. Schließlich führt die Ablösung von Endothelzellen von der Lamina elastica interna zur Freilegung von Kollagen. Dieser Prozess triggert die Akkumulation von Thrombozyten, die im Restlumen des DA zirkulieren. Der entstehende Thrombozytenpfropf verschließt das Restlumen des kontrahierten DA und unterstützt zusammen mit anderen Faktoren den nachfolgenden

Ductusumbau. Echtler und Mitarbeiter konnten auch zeigen, dass eine induzierte Dysfunktion der Thrombozytenadhäsion ebenso wie transgene Defekte der Thrombopoese ($Nfe^{-/-}$ [Nuclear Factor (erythroid-derived 2)] Mäuse) mit dem Auftreten eines PDA assoziiert sind.

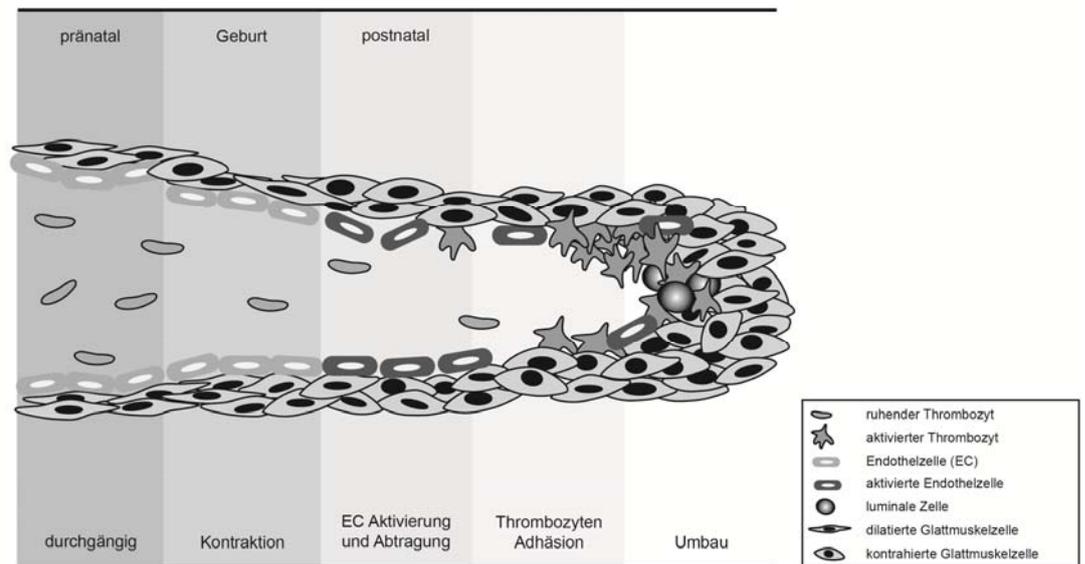


Abb. 5: Rolle der Thrombozyten beim Umbau des kontrahierten Ductus arteriosus: Das Schema skizziert die von Echtler et al. postulierte Abfolge der Ereignisse. Thrombozyten tragen durch thrombotische Okklusion des kontrahierten Ductuslumens zum postnatalen Ductusumbau und -verschluss bei²⁹.

Im Gegensatz zu Reifgeborenen weist der vorab beschriebene Verlauf der Umbauprozesses des DA bei Frühgeborenen einige Besonderheiten auf, die mögliche Erklärungsansätze für die klinisch beobachtete höhere Inzidenz eines PDA sowie die gesteigerte Tendenz zur Wiedereröffnung eines echokardiographisch bereits als geschlossen beurteilten DA bei dieser Population liefern (siehe 1.1.4)³⁰.

1.1.2 Rolle der Cyclooxygenasen

Die Cyclooxygenasen (COX) sind die geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme der Prostaglandinsynthese und katalysieren den ersten wesentlichen Schritt der Umwandlung von Arachidonsäure (Abb. 6). Die beiden Isoenzyme haben ein nahezu identisches aktives Zentrum, unterscheiden sich aber hinsichtlich ihrer Regulation. COX-1 wird als Produkt eines nicht-regulierten Gens konstitutiv exprimiert. COX-2 dagegen ist induzierbar und hat im Vergleich zu COX-1 eine 10-fach höhere Aktivität. Die induzierbare COX-2 wird in zahlreichen Zelltypen exprimiert und durch physiologische sowie pathologische zelluläre Stressreaktionen mit kurzfristig gesteigertem Bedarf an Prostanoiden, wie bspw. Entzündungen und Wehentätigkeit, aktiviert.

Arachidonsäure

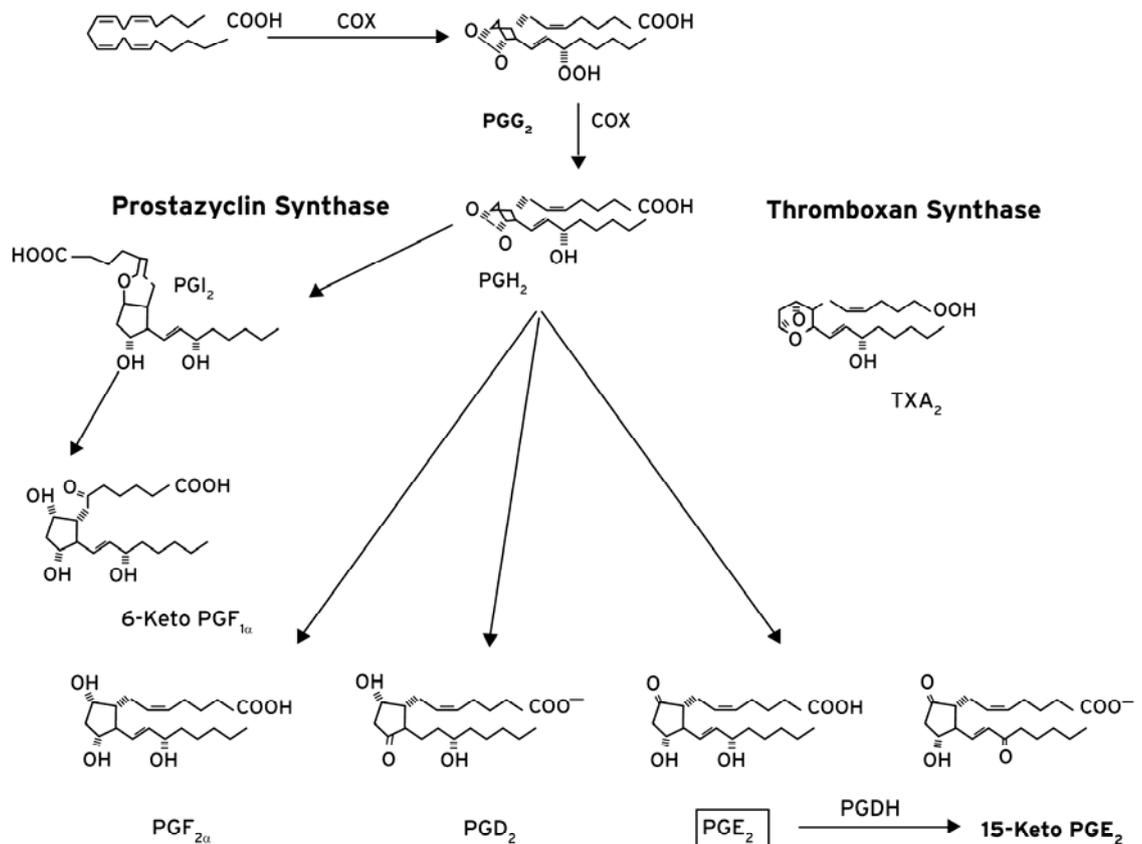


Abb. 6: Biosynthese und Metabolismus der Prostaglandine beim Menschen:

Die allen Prostaglandinen gemeinsame chemische Grundstruktur leitet sich von der Prostansäure ab, einer C-20 Carbonsäure mit einem Cyclopentanring. Die Arachidonsäure ist nicht nur der Vorläufer für Prostaglandine, sondern auch für andere biologisch hoch aktive Stoffe, wie Prostazyklin, Thromboxane und Leukotriene. Die ersten beiden Schritte des zyklischen Arachidonsäure-Stoffwechsels werden durch die Cyclooxygenase (COX; häufig auch Prostaglandin-H-Synthase genannt) katalysiert, die Arachidonsäure zu Prostaglandin Endoperoxiden (PGG₂ und PGH₂) umsetzt. Auf der Stufe des PGH₂ verzweigt sich der Arachidonsäure-Stoffwechsel schließlich zu den unterschiedlichen Prostanoiden. Welche Endprodukte jeweils gebildet werden, wird von den zellspezifischen relativen Aktivitäten der Enzyme der Folgeschritte bestimmt. Für jedes Prostanoid steht dabei ein eigenes terminales Enzym zur Verfügung, z.B. Prostaglandin E₂-Synthase. Von den verschiedenen synthetisierten Prostaglandinen spielt Prostaglandin E₂ (PGE₂) eine wichtige Rolle. PGE₂ wird durch das Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺)-abhängige Enzym 15-Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase (PDGH) katalytisch in das biologisch inaktive 15-Keto PGE₂ umgewandelt und anschließend weiter abgebaut. Für eine vollständige Darstellung der Zusammenhänge und die Wechselbeziehung zwischen den einzelnen Stoffwechselprodukten sei auf Campbell und Halushka verwiesen³¹. TXA₂, Thromboxan; PGI₂, Prostazyklin; PGD₂, Prostaglandin D₂; PGF_{2α}, Prostaglandin F_{2α}.

Im Rahmen von Entzündungsprozessen kommt es zur Induktion einer ganzen Kaskade inflammatorischer und ant-inflammatorischer Mediatoren, die die Genexpression und Aktivität der COX-2 beeinflussen und zu erhöhten Plasmakonzentrationen von PGE₂ führen. Unter den verschiedenen bekannten Prostaglandinen ist PGE₂ vor mehr als 30 Jahren als der wichtigste Mediator für die Ductusrelaxation identifiziert worden³². PGE₂ ist für das Offenhalten des DA in utero unverzichtbar. Erst wesentlich später wurden die spezifischen G-Protein gekoppelten Rezeptoren zur Vermittlung der Prostaglandinwirkung entdeckt (Abb. 7)³³. Der foetale DA exprimiert die PGE₂-Rezeptoren EP2, EP3 und EP4.

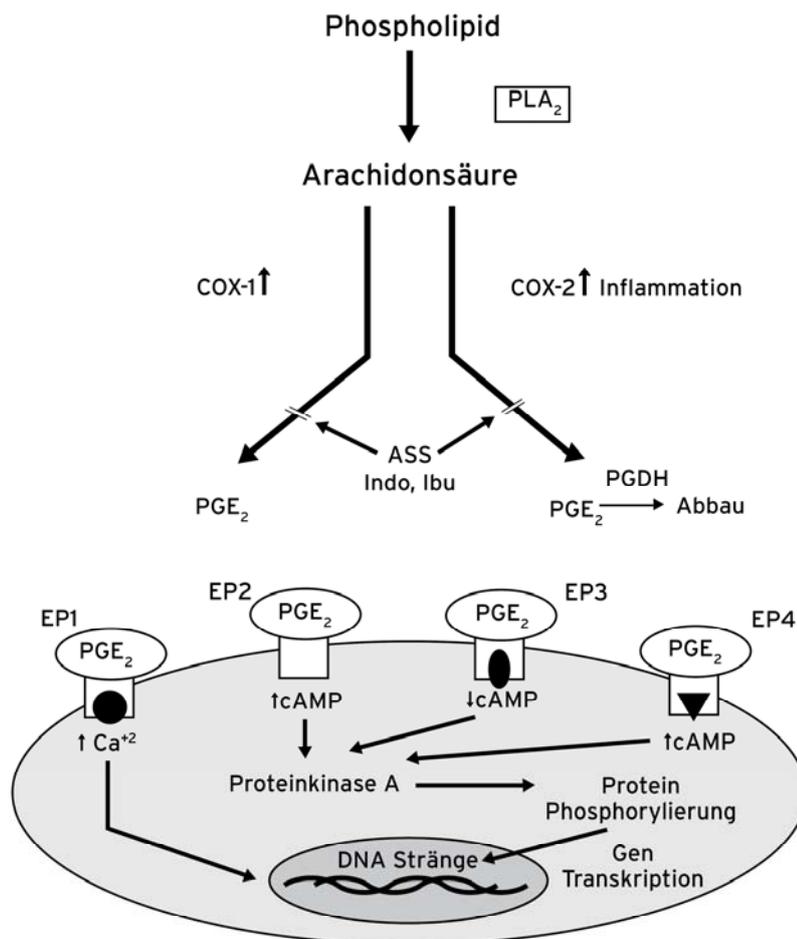


Abb. 7: Prostaglandin E₂ (PGE₂) Synthese und Rezeptorbindung:

Die Umsetzung der Arachidonsäure mit Bildung von PGE₂ erfolgt enzymatisch durch die Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2). Die Aktivität der Phospholipase A₂ (PLA₂), die die Arachidonsäure aus Phospholipiden freisetzt, reguliert die Prostaglandinproduktion. Die zahlreichen unterschiedlichen Wirkungen entfaltet PGE₂ über die Bindung an vier Unterformen von G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren EP1 - EP4. Die Interaktion mit diesen Rezeptoren senkt (EP3) oder steigert (EP2 und EP4) die intrazellulären zyklischen Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) Spiegel oder erhöht die intrazelluläre Calcium (Ca) Konzentration (EP1). PDGH, 15-Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase; ASA, Aminosalicylsäure; Indo, Indometacin; Ibu, Ibuprofen.

Der EP4-Rezeptor ist der stärkste Vermittler einer PGE₂ abhängigen Vasodilatation am fetalen DA^{34, 35}. Die Signaltransduktion dieses Rezeptors wird über den intrazellulären Anstieg von zyklischem Adenosinmonophosphat vermittelt, der zur Relaxation von Glattmuskelzellen führt³⁶. Welche entscheidende Funktion den Prostaglandinen für das Offenhalten des DA zukommt, verdeutlichen der verzögerte Ductusverschluss bei COX-2 defizienten Mäusen³⁷ und das Ausbleiben des Ductusverschlusses bei Knockout-Mäusen, bei denen beide Cyclooxygenase Gene deaktiviert wurden³⁸. Die Verstoffwechslung von PGE₂ durch die 15-Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase (PDGH) trägt maßgeblich zum charakteristischen Abfall der PGE₂-Spiegel nach der Geburt bei, der für den Ductusverschluss äußerst wichtig ist. Auch wenn hierfür der Beweis beim Menschen noch aussteht, ist es möglich, dass andere Mediatoren, die mit dem Prostaglandinstoffwechsel interagieren und ebenfalls an der Regulation des Tonus sowie den Umbauprozessen des DA beteiligt sind, wie bspw. NO und VEGF, sich infolge einer Hemmung der Prostaglandine verändern. Aus pharmakologischer Sicht ist daher ein besseres Verständnis der Prostaglandin abhängigen Signalwege und deren Interaktion mit anderen Stoffwechselwegen erforderlich, um die medikamentöse Therapie eines PDA gezielt zu verbessern.

1.1.3 Funktion von VEGF und dessen Rezeptoren

VEGF wurde erstmals 1983 als vascular permeability factor identifiziert³⁹. Produziert wird VEGF von Makrophagen, aktivierten T-Zellen, Glattmuskelzellen, aber auch Endothelien, wobei die Genexpression hauptsächlich sauerstoffabhängig über den durch Hypoxie induzierbaren Transkriptionsfaktor 1 (HIF-1) reguliert wird⁴⁰. Neben Hypoxie können auch andere Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Östrogen und NO die Genexpression beeinflussen^{41, 42}. Die Bezeichnung VEGF charakterisiert eine Gruppe von homologen Proteinen, die man inzwischen als VEGF-A, -B, -C, -D, -E, PlGF (Placental derived Growth Factor) und svVEGF (snake venom VEGF) kennt⁴³⁻⁴⁶. Besonders hervorzuheben ist das VEGF-A, von welchem bisher neun verschiedene Subtypen bekannt sind, die aufgrund unterschiedlichen Gensplittings entstehen⁴⁷. Benannt nach der Länge ihrer Aminosäureketten, sind heute VEGF 121, 145, 148, 162, 165, 183, 189 und 206 bekannt. VEGF 165 ist zusammen mit dem VEGF 121 und 189 das potenteste und am häufigsten exprimierte VEGF Protein⁴⁸. Es besitzt einen zusätzlichen Subtyp, das VEGF 165b, das als endogene Form hemmend auf VEGF 165 wirkt⁴⁹. VEGF ist ein starkes Mitogen speziell für mikro- und makrovaskuläre Endothelzellen⁵⁰. Es sorgt für die Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen und Proliferation sowie Migration im Rahmen der Angiogenese und Vaskulogenese⁵¹.

Es ist essentiell für die gesamte Embryonalentwicklung und kann bereits wenige Tage nach der Implantation in den Trophoblasten nachgewiesen werden⁵². Im Rahmen der Embryonalentwicklung fördert VEGF über die Induktion bestimmter Adhäsionsmoleküle die Zellmigration und -kommunikation ebenso, wie die geregelte Bildung von Blutgefäßen, Endotheldifferenzierung und Organformation. Außerdem vermittelt VEGF morphologische Veränderungen des Endothelzellverbandes wie Fenestrierung und Kanalbildung mit der Folge einer erhöhten Gefäßpermeabilität⁵³. Darüber hinaus regt es die Produktion und Sekretion von gerinnungsfördernden Mediatoren (vWF, Gewebsthromboplastin) an, vermittelt dem Endothel vasokonstriktorische und vasodilatatorische Einflüsse, wirkt chemotaktisch auf Monozyten und beeinflusst die Expression von Plasminogen-Aktivatoren^{54, 55}. Beim Erwachsenen tritt VEGF nur im Rahmen des regelmäßig wiederkehrenden weiblichen Zyklus auf und ist ansonsten bei pathologischen Prozessen, wie Entzündungen oder Tumorerkrankungen, erhöht. Die vielfältigen Eigenschaften des VEGF werden über verschiedene Rezeptoren vermittelt (Abb. 8).

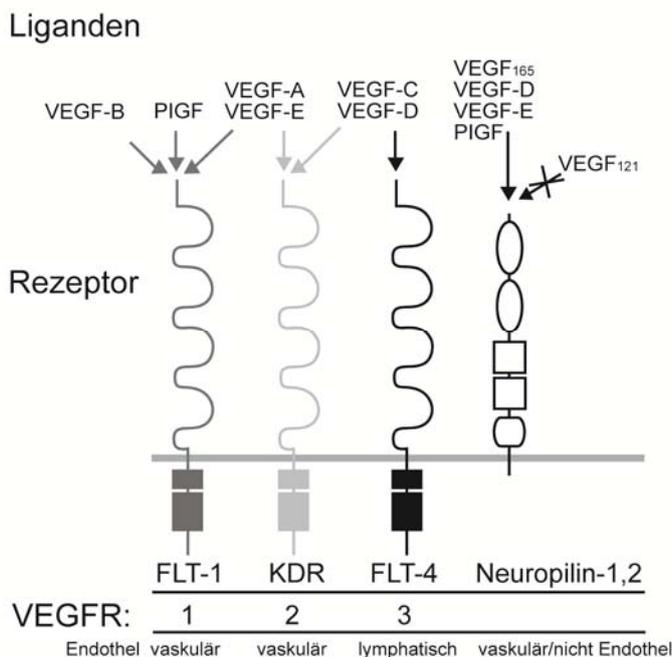


Abb. 8: Rezeptoren des VEGF, ihre Liganden und ihre Lokalisation im Gewebe

VEGF-R1 (Flt-1, fms-like tyrosine kinase), ist auf vaskulären Endothelien, Makrophagen, Monozyten und hämatopoetischen Stammzellen lokalisiert und bindet vor allem VEGF-A, -B und PlGF⁵⁶. In der frühen Entwicklung wirkt er limitierend auf das Gefäßwachstum, indem er die Wirkung seines Liganden hemmt (sog. Decoy Rezeptor)^{57, 58}.

Der VEGF-R2 (Flk-1 oder KDR, kinase insert domain containing receptor) gehört zur Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren und bindet alle Splicevarianten des VEGF-A⁵⁹. Der Rezeptor ist vor allem auf Endothelien, aber auch auf hämatopoetischen Stammzellen

nachweisbar⁶⁰. Er ist der wichtigste positive Regulator für Endothelzellproliferation und -differenzierung, vermittelt Mitogenese, Angiogenese und Permeabilitätssteigerung. Im Rahmen der Angiogenese kommt es am Rezeptor 2 zur Interaktion mit Korezeptoren, den so genannten Neuropilinen, die wichtig für die neuronale Aussprossung während der Neurogenese sind. Neuropilin-1 wird mit dem Rezeptor 2 koexprimiert und verstärkt die Bindung von VEGF 165 zum Rezeptor.

Der VEGF Rezeptor 3 (Flt-4, fms-like tyrosine kinase) bindet ausschließlich VEGF-C und -D. Seine Aufgabe besteht in der Vermittlung der Lymphangiogenese und dem Schutz lymphatischer Zellen vor Apoptose. Alle Rezeptoren werden durch VEGF selbst, durch verschiedene Zytokine und vor allem sauerstoffabhängig reguliert.

Im Rahmen der zweiten Phase des Duktusverschlusses ist VEGF ein entscheidender Mediator für den Gefäßumbau. Infolge der durch Duktuskonstriktion entstandenen Hypoxie kommt es zur Ausschüttung von VEGF, Zytokinen und anderen Wachstumsfaktoren. VEGF bewirkt durch Proliferation und Permeabilitätsänderung der Endothelien die neointimale Hyperplasie und reguliert die Einsprossung der Vasa vasorum⁶¹. Wird die VEGF-Wirkung gehemmt, ist eine geringere Einsprossung der Vasa vasorum, sowie ein Abfall der Endothelzellproliferation und Endothelzellakkumulation in der Neointima zu verzeichnen⁶². Ohne die Wirkung des VEGFs auf den DA ist kein vollständiger Umbau zum Ligamentum arteriosum möglich. Eine weitere typische Erkrankung sehr unreifer Frühgeborener ist die Frühgeborenenretinopathie (ROP), bei deren Entstehung der Wachstumsfaktor VEGF ebenfalls eine entscheidende Rolle spielt. Die vulnerable Phase der Retinopathieentstehung und der Zeitpunkt einer medikamentösen Duktusintervention überschneiden sich häufig. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass Studien an der Retina neugeborener Ratten zeigen, dass hohe Dosen von Ibuprofen die VEGF-Wirkung unterdrücken und dass dieser Effekt im Vergleich zu Indometacin wesentlich stärker ist⁶³. In der gleichen Studie wurde eine Hemmung des VEGF-R2 durch Ibuprofen, jedoch nicht durch Indometacin gezeigt.

1.1.4 Klinische Bedeutung beim Frühgeborenen

Beim reifen Neugeborenen verschließt sich der DA normalerweise innerhalb der ersten 24 bis 72 Lebensstunden funktionell. Bei Frühgeborenen ist der Spontanverschluss des Ductus häufig verzögert oder bleibt aus⁶⁴. Ein dauerhafter spontaner Duktusverschluss wird lediglich bei ca. 1/3 der Frühgeborenen < 1000 g 2 bis 6 Tage postnatal beobachtet, erfolgt jedoch bei der Mehrzahl der Frühgeborenen < 1500g während des ersten Lebensjahres^{65, 66}. Die niedrige Sauerstoffspannung und höhere Spiegel der zirkulierenden Prostaglandine wurden als Hauptrisikofaktoren für eine unzureichende

Duktuskontraktion bei Frühgeborenen identifiziert. Zusätzlich können bei Frühgeborenen die funktionellen aber auch die anatomischen Verschlussmechanismen unausgereift sein und den Verschluss des DA verzögern⁶⁷. Im Tiermodell geht die Unreife sowohl der Kalium- als auch der Kalziumkanäle mit einem Versagen der sauerstoffabhängig vermittelten Kontraktion des Ductus bei frühgeborenen Kaninchen einher⁶⁸. Die gesteigerte Sensitivität des DA gegenüber Prostaglandinen, NO und vermutlich auch Endothelin-1 trägt ebenso wie höhere Plasmaspiegel von NO zu einer erhöhten Prävalenz und einer erschwerten Behandlung des DA bei sehr kleinen Frühgeborenen bei^{15, 61, 69, 70}. Im fetalen Schafmodell konnte eine entwicklungsabhängig zunehmende Aktivität der Phosphodiesterasen, derjenigen Enzyme, die für den Abbau der durch PGE₂ und NO vermittelten Ausschüttung der Botenstoffe cAMP und cGMP verantwortlich sind, nachgewiesen werden⁷¹. Auch die Bildung mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies, welche für die Aktivierung der Rho/Rho-Kinase Signaltransduktion essentiell sind, kann im Ductus Frühgeborener vermindert sein²². Durch die unzureichende Duktuskontraktion unterbleibt die erfolgreiche Ausbildung der lokalen „Hypoxiezone“ in der Ductuswand Frühgeborener, wodurch es folglich auch zu einer Beeinträchtigung des anatomischen Gefäßumbaus kommt⁷². Darüber hinaus scheinen Frühgeborene anfälliger für eine Wiedereröffnung des funktionell geschlossenen DA zu sein, bspw. infolge proinflammatorischer Zytokine, die im Rahmen systemischer Infektionen zu einer gesteigerten Freisetzung von PGE₂ führen⁷³. Insbesondere bei Frühgeborenen mit Atemnotsyndrom aufgrund eines Surfactantmangels ist ein PDA häufig^{28, 74}. Statistisch ist das Ausbleiben des Ductusverschlusses mit einer sehr unreifen Lunge, einem schweren RDS sowie einer aggressiveren Beatmung assoziiert⁷⁵⁻⁷⁷. Aufgrund der gestiegenen Überlebenschancen sehr kleiner Frühgeborener ist ein hsPDA von zunehmender klinischer Bedeutung. Die Inzidenz eines hsPDA schwankt zwischen 30 – 70% nach dem 3. Lebenstag in dieser Patientengruppe und verhält sich umgekehrt proportional zum GA⁷⁸⁻⁸². Bei bis zu zwei Dritteln der Kinder <1000 g wird der links-rechts Shunt über den PDA als hämodynamisch bedeutsam und therapiebedürftig eingeschätzt.

1.1.5 Mögliche Komplikationen

Ein PDA findet sich vor allem bei sehr kleinen und kranken Frühgeborenen, also einer Gruppe mit hoher Mortalität. Dies bedingt eine statistische Assoziation von PDA und Mortalität⁸³. Die hämodynamischen Auswirkungen eines PDA wurden mit verschiedenen Folgeerkrankungen kleiner Frühgeborener, wie der bronchopulmonalen Dysplasie⁸⁴, nekrotisierenden Enterocolitis^{76, 85}, Hirnblutung (IVH)⁸⁶⁻⁸⁸ und periventrikulären Leukomalazie (PVL) in einen kausalen Zusammenhang gebracht, ohne dass es hierfür

eine gute Datenlage gibt. Eine Metaanalyse randomisierter Studien zeigt jedoch, dass ein frühzeitiger pharmakologischer Ductusverschluss innerhalb der ersten 24 Lebensstunden keinen Einfluss auf Mortalität, nekrotisierende Enterokolitis oder bronchopulmonale Dysplasie hat^{89, 90}. Unter der Annahme, dass ein Ductusverschluss in jedem Falle von Vorteil ist, war in den bisherigen Studien zur Ductustherapie auch jeweils der Kontrollgruppe die Möglichkeit einer Rescue-Therapie zugänglich, so dass es keine Vergleichsdaten einer unbehandelten Kontrollgruppe gibt. In dieser Hinsicht ist die retrospektive Analyse einer Population von Frühgeborenen mit einem GA < 28 SSW, bei der aufgrund geographischer Isolation in Westaustralien eine Ductusligatur nicht als Therapieoption nach erfolgloser medikamentöser Therapie möglich war, von Interesse. Sie hat gezeigt, dass ein solches Vorgehen zwar mit einer höheren Mortalität einhergeht, jedoch die respiratorische Morbidität der Überlebenden nicht zu beeinflussen scheint⁹¹. Ob die erhöhte Mortalität am nicht operierten PDA lag ist unklar.

1.1.6 Einfluss auf die spätere neurologische Entwicklung von Frühgeborenen

Frühgeborene repräsentieren 5% aller Geburten, aber 50% aller Kinder mit frühkindlichen Hirnschädigungen⁹². Die sehr kleinen Frühgeborenen unter 1000g Geburtsgewicht haben ein besonders hohes Risiko für die Entwicklung motorischer und kognitiver Defizite, die die spätere Überlebensqualität dieser Kinder entscheidend verschlechtern⁹³⁻⁹⁶. Die Schädigung der weißen Substanz ist beim Frühgeborenen die wesentliche Ursache eines neurologischen Folgeschadens⁹⁷. Eine Vielzahl von Faktoren kann bei Frühgeborenen zur Entstehung solcher Schäden führen. Neben einer Hypoxie scheinen auch die im Verlauf der frühen extrauterinen Entwicklung wechselnden Sauerstoffkonzentrationen, aber auch die relative postnatale Hyperoxie (verglichen mit dem intrauterinen Sauerstoffpartialdruck von 25 mmHg) eine wesentliche Rolle in der Genese der Hirnschädigung zu spielen⁹⁸⁻¹⁰⁰. Wichtige Vorhersagewerte für die spätere neurologische Entwicklung sind neben neonatologischen Erkrankungen wie BPD und Retinopathie (ROP) insbesondere das Auftreten einer schweren IVH und PVL¹⁰¹⁻¹⁰⁴.

Bisher ist nur wenig über den Einfluss eines PDA oder dessen Behandlung mit Cyclooxygenase Hemmern auf die Langzeitentwicklung von Frühgeborenen bekannt. In einer Tierstudie wurden motorische Einschränkungen sowie verhaltensneurologische Veränderungen nach Indometacin Behandlung festgestellt¹⁰⁵. Vergleichbare Untersuchungen zu Ibuprofen existieren nicht. Während insbesondere prophylaktisches Indometacin mit einer Senkung der Rate hochgradiger PVL und IVH assoziiert ist, geht es jedoch gleichzeitig mit einer Einschränkung des zerebralen Blutflusses bzw. des zerebralen Blutvolumens einher¹⁰⁶. Die Minderdurchblutung kann zu einer reduzierten

intrazellulären Sauerstoffversorgung führen, die in Tierstudien mit Indometacin nicht ausreichend kompensiert werden konnte¹⁰⁷⁻¹¹⁰. So ergab sich in einer großen prospektiven Multicenterstudie nach Indometacin Prophylaxe bezüglich der neurosensorischen Langzeitentwicklung kein signifikanter Vorteil gegenüber der Kontrollgruppe¹⁰⁶. Ibuprofen hingegen führte im Tierversuch sowohl zu einem geringeren Blutflussverlust als auch zu einer Steigerung der zerebralen Autoregulation, wodurch eine bessere zerebrale Sauerstoffversorgung gewährleistet wird¹¹¹⁻¹¹⁴.

1.2 Diagnose und Therapie des persistierenden Ductus Frühgeborener

Insbesondere in der Population der sehr unreifen Frühgeborenen ist die klinische Diagnose eines PDA erschwert und hat zudem eine geringe Sensitivität, so dass hier die echokardiographische Diagnose im Vordergrund steht. Die zusätzliche Serumbestimmung von Biomarkern kann bei der Indikationsstellung zur Behandlung eines PDA hilfreich sein. Die medizinischen Interventionen zielen darauf ab, einen hämodynamisch wirksamen PDA zu verschließen, um mögliche negative Folgen eines großen Links-rechts-Shunts zu vermeiden bzw. abzumildern. Zur medikamentösen Ductustherapie werden die beiden COX Hemmern Indometacin und Ibuprofen eingesetzt.

1.2.1 Echokardiographie

Die Echokardiographie ist die Methode der Wahl, um in der Routine die Diagnose eines PDA sicher zu stellen und gleichzeitig ein ductusabhängiges Vitium auszuschließen. Die Folgen eines PDA sind abhängig vom Shuntausmaß, welches durch Länge und Größe des PDA einerseits und die kardiale und pulmonale Reaktion andererseits beeinflusst wird¹¹⁵⁻¹¹⁸. Auch bei der Beurteilung des Shuntausmaßes spielt die Echokardiographie eine wesentliche Rolle. Bei Auftreten eines großen Shunts kann es durch das sogenannte „ductal steal“ Phänomen zu einer reduzierten postductalen Organperfusion kommen, die sich dopplersonographisch hauptsächlich an den mesenterialen, renalen und zerebralen Gefäßen quantifizieren lässt^{119, 120}. Trotz der Vielzahl von Echoparametern, die uns zur Diagnose eines PDA zur Verfügung stehen, beschäftigt die Neonatologen das Dilemma, welcher Messwert am besten für die Einstufung eines PDA als „hämodynamisch relevant“ und somit für die Indikationsstellung zur Behandlung geeignet ist. In Ermangelung eines „Goldstandards“ ist daher die Beurteilung mehrerer Echoparameter zur Einschätzung der hämodynamischen Relevanz eines PDA gängige Praxis. Einen Konsens, bei Vorliegen welcher Kriterienkombination ein PDA als therapiebedürftig einzustufen ist, gibt es allerdings nicht. Zu den echokardiographischen Diagnosekriterien eines PDA zählen der Nachweis eines Shuntflusses, der Durchmesser des PDA, das Verhältnis zwischen Durchmesser des linken Vorhofs und der Aortenwurzel (LA:Ao Ratio), der diastolische

Fluss in der Aorta descendens, das linksventrikuläre Schlagvolumen sowie der Fluss in der Vena cava superior^{117, 121, 122}. Die Vorlasterrhöhung durch einen PDA führt bei Frühgeborenen aber auch zu charakteristischen Veränderungen echokardiographischer diastolischer Funktionsparameter, wie der isovolumetrischen Relaxationszeit, die am ehesten durch eine diastolische Funktionsstörung des linken Ventrikels mit linksatrialer Volumenbelastung zu erklären sind^{123, 124}. Das Erkennen dieser Funktionsstörung ist für die Indikationsstellung zum PDA Verschluss ebenfalls von Bedeutung. Mit Hilfe der echokardiographischen Methoden kann ein bedeutsamer PDA im Mittel 1,8 Tage vor Auftreten klinischer Symptome nachgewiesen werden¹²⁵.

1.2.2 Biochemische Marker

B-Typ natriuretisches Peptid (BNP) wird von Herzmuskelzellen als Prohormon mit einer Länge von 108 Aminosäuren als Antwort auf zunehmende Volumen- und Druckbelastung gebildet. Das BNP-Pro-Hormon wird in BNP und den N-terminalen Molekülrest (NT-proBNP) gespalten. BNP reguliert das extrazelluläre Flüssigkeitsvolumen sowie den Blutdruck durch Natriurese, Diurese, Vasodilatation und Antagonismus des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems. Bei Erwachsenen kann eine erhöhte BNP- bzw. NT-proBNP Konzentration im Blut Zeichen für das Vorliegen einer Herzinsuffizienz sein und auch Aufschluss über deren Schweregrad geben^{126, 127}. BNP wird durch die membrangebundene neutrale Endopeptidase gespalten und renal ausgeschieden. Die Plasmahalbwertszeit des aktiven Hormons BNP ist kürzer (20 min.) als die des biologisch inaktiven NT-proBNP (120 min.). Dies spiegelt sich auch in höheren Serumkonzentrationen von NT-proBNP und einer großen Schwankungsbreite insbesondere innerhalb der ersten Lebenstage wieder¹²⁸⁻¹³⁰. Auch die hämodynamische Belastung durch einen PDA führt zu einer erhöhten kardialen Freisetzung natriuretischer Peptide. Serumbestimmungen von BNP und seinem N-terminalen Fragment könnten sich daher auch als neue biochemische Marker für ein besseres Management von Frühgeborenen mit PDA erweisen. Neben den natriuretischen Peptiden scheint auch das kardiale Troponin T (cTNT) als Screeningparameter in der Ductusdiagnostik geeignet¹³¹. Im Vergleich zur echokardiographischen Untersuchung haben Biomarker den Vorteil, dass sie unabhängig vom Untersucher sind und die Wahl ihres "Grenzwertes" zur Vorhersage eines hämodynamisch relevanten PDA anhand von ROC-Analysen optimiert wird.

1.2.3 Medikamentöser Verschluss - Indometacin

Indometacin wird seit den 70er Jahren zur Behandlung des PDA eingesetzt und war für diese Indikation bis Ende der 90er Jahre das Medikament der ersten Wahl^{167, 132, 133}.

Indometacin ist in Deutschland im Gegensatz zu Ibuprofen nicht zugelassen und die Anwendung zum Ductusverschluss bei Frühgeborenen daher mit einem „off-label-use“ verbunden. Als ein nicht-steroidales Antiphlogistikum (NSAID) blockiert Indometacin durch nicht-selektive Hemmung der COX-1 und 2 die Prostaglandinsynthese. Die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Indometacin unterliegen einer großen individuellen Schwankungsbreite^{134, 135}. Die Serumhalbwertszeit beträgt 20 Stunden¹³⁶. Nebenwirkungen der Behandlung sind eine Verminderung des zerebralen, mesenterialen und renalen Blutflusses, die in der Folge zur Reduktion der zerebralen intrazellulären Oxygenierung, gastrointestinalen Blutungen oder Beeinträchtigung der Nierenfunktion führen können^{107, 110, 137-139}. Ferner wird ein Einfluss auf die Entstehung der NEC vermutet, der bisher aber nicht abschließend geklärt ist^{140, 141}. Die Verringerung der Rate schwerer Hirnblutungen nach prophylaktischer Anwendung von Indometacin innerhalb der ersten 12 Lebensstunden ist als direkte Folge der Hemmung der lokalen Prostaglandinsynthese in der germinalen Matrix zu sehen¹⁴². Zur therapeutischen Anwendung von Indometacin nach dem ersten Lebenstag existiert eine Vielzahl von unterschiedlichen Dosierungsregimen. Kontrollierte, randomisierte Studien, welche diese Dosierungen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit vergleichen, fehlen jedoch. Es sind daher keine generellen Empfehlungen bezüglich einer optimalen Dosierung von Indometacin möglich. In methodisch hochwertigen Studien wurde Indometacin meistens in 3 Gaben verabreicht, wobei sich sowohl die Dosierung als auch das Intervall zwischen den Gaben unterschieden. Die meisten Studien verwendeten jeweils 0,2 mg/kg im 12-Stunden Intervall. Betrachtet man die Anzahl der untersuchten Patienten, so wurden die meisten Patienten mit jeweils 0,1 mg/kg im 24-Stunden Intervall behandelt. Die Effektivität von Indometacin bei der Behandlung des PDA wurde in zahlreichen prospektiv randomisierten Studien und Metaanalysen belegt^{102, 135, 143}. In 70-90% der Fälle sprechen Frühgeborene auf eine Indometacin Behandlung an¹⁴⁴. Allerdings sinkt die Erfolgsrate unter 60% und die Gefahr der Wiederöffnung steigt auf über 20% bei Frühgeborenen mit einem GA <26 SSW oder einem GG <1000g¹⁵.

1.2.4 Medikamentöser Verschluss – Ibuprofen

Seit Mitte 2004 ist Ibuprofen (Pedea®) in Europa zur Behandlung eines hsPDA bei Frühgeborenen mit einem Gestationsalter unter 34. SSW zugelassen. Zwei Metaanalysen haben die Effektivität und die Nebenwirkungen von Ibuprofen allein sowie im Vergleich zu Indometacin bei der medikamentösen Therapie Frühgeborener mit klinisch oder echokardiographisch diagnostiziertem PDA analysiert (Abb. 9)^{102, 135}. Hinsichtlich des erfolgreichen medikamentösen Ductusverschlusses hat sich Ibuprofen als ebenso effektiv

erwiesen (Verschlussraten zwischen 60 – 80%) und scheint im Vergleich zu Indometacin mit weniger transienten Nebenwirkungen einherzugehen. Nach Gabe von Ibuprofen fallen der antidiuretische Effekt und der Anstieg des Serum-Kreatinins geringer aus. Zudem hat Ibuprofen im Gegensatz zu Indometacin keine ungünstigen Effekte auf die mesenteriale, renale und zerebrale Perfusion sowie die zerebrale Oxygenierung^{111, 112, 114, 145}. In Tierversuchen zeigte Ibuprofen eine neuroprotektive Wirkung^{113, 146}, andere Studien wiesen eine erhöhte zerebrale Autoregulation nach Ibuprofenbehandlung nach^{147, 148}.

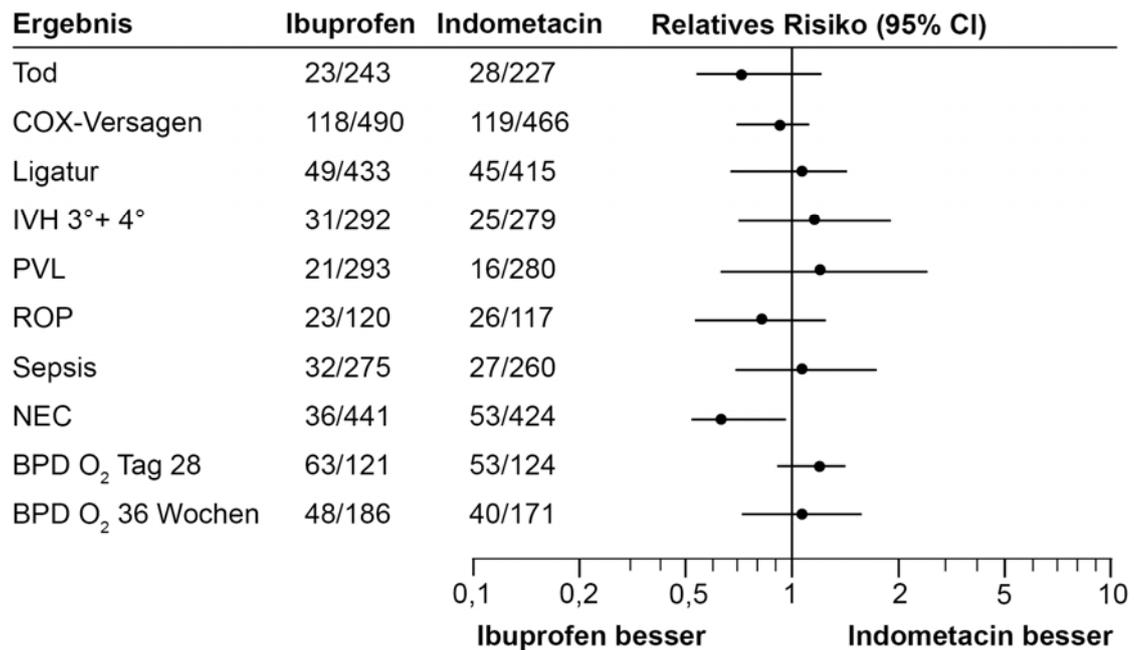


Abb. 9: Metaanalyse von Ohlsson et al. zum Vergleich der Wirksamkeit und der kurzfristigen Ergebnisse nach therapeutischer Anwendung von Indometacin oder Ibuprofen zum Ductusverschluss¹⁰².

In die Bewertung wurden 1092 Frühgeborene aus 20 randomisierten, kontrollierten Studien eingeschlossen. CI, Konfidenzintervall; COX, Cyclooxygenase; IVH, intraventrikuläre Hirnblutung; PVL, periventrikuläre Leukomalazie; ROP, Frühgeborenenretinopathie; NEC, nekrotisierende Enterokolitis; BPD, bronchopulmonale Dysplasie; O₂, Sauerstoff.

Die Hauptursache für die pharmakologischen Unterschiede zwischen Indometacin und Ibuprofen ist ihre unterschiedlich stark ausgeprägte COX-1 und COX-2 Hemmung¹⁴⁹. Im Gegensatz zu Indometacin basiert das derzeit empfohlene Ibuprofen Dosierungsschema (10 – 5 – 5 mg/kg Körpergewicht im Abstand von jeweils 24 Stunden) auf spärlichen pharmakokinetischen Daten¹⁵⁰. Der nicht-steroidale Entzündungshemmer Ibuprofen gehört zur Gruppe der Propionsäurederivate und ist ein Racemat aus gleichen Teilen S(+)- und R(-)-Enantiomer. Die erwünschte pharmakologische Wirkung wird hauptsächlich durch das S(+)-Enantiomer vermittelt¹⁵¹. Bei Erwachsenen zeigt die Pharmakokinetik von Ibuprofen eine deutliche Stereoselektivität mit bevorzugter Umwandlung des R(-)-

Enantiomers in das S(+)-Enantiomer¹⁵². Anfängliche pharmakokinetische Studien bei Neugeborenen wurden lediglich zum Ibuprofen Racemat durchgeführt^{153, 154}. Das limitierte Wissen zur Pharmakokinetik der vergleichsweise neuen medikamentösen Therapie des PDA bei Frühgeborenen mittels Ibuprofen hat uns inspiriert, ein physiologie-basiertes pharmakokinetisches Modell von R- und S- Ibuprofen für diese Population zu entwickeln^{155, 156}. Anhand unseres Modells ergab sich ein drastischer Abfall der Halbwertszeit von R-Ibuprofen (8 Stunden am 1. Lebenstag) innerhalb der ersten Lebenstage, wohingegen die Halbwertszeit von S-Ibuprofen (34 Stunden am 1. Lebenstag) unverändert blieb. Durch Berücksichtigung altersabhängiger Veränderungen der Nierenfunktion und der einseitigen Verstoffwechslung von R-Ibuprofen zu S-Ibuprofen ermöglicht unser Modell mittels pharmakokinetischer Simulationen auch die Vorhersage von Serumspiegeln beider Enantiomere unter Anwendung höherer Dosierungen des Medikaments. Unser pharmakokinetisches Modell kann daher auch zur optimalen Steuerung der Ibuprofentherapie im Rahmen der zukünftigen Etablierung von adaptierten Dosierungsregimen bei diesen Frühgeborenen eingesetzt werden. Dieses Vorgehen berücksichtigt die Tatsache, dass infolge der Ausreifung des hepatischen Cytochrom-P450-Systems (CYP 450) mit wachsendem postnatalen Alter der Metabolismus der COX Hemmer schneller erfolgt und daher höhere Dosierungen zur Erzielung einer gleichbleibenden Wirksamkeit sinnvoll erscheinen¹⁵⁷. Bekannt ist außerdem, dass die Verschlussrate unter Verwendung des Standard-Ibuprofen-Dosierungs-Regimes mit abnehmendem Reifealter der Frühgeborenen sinkt.

1.2.5 Ductusligatur

Am 26. August 1938 führte Robert Gross die erste erfolgreiche chirurgische Korrektur eines kongenitalen Herzdefektes durch und ligierte einen PDA bei einem 7 Jahre alten Kind am Boston Children's Hospital¹⁵⁸. Bis zur Einführung der Pharmakotherapie im Jahr 1976 war die Ligatur die einzige Behandlungsmöglichkeit für einen PDA¹³³. Heute ist die Ligatur des PDA bei Frühgeborenen das Therapieverfahren der zweiten Wahl und wird in der Regel nur nach erfolgloser medikamentöser Therapie oder beim Vorliegen von Kontraindikationen gegen diese eingesetzt^{159, 160}. Hohe Versagerraten der medikamentösen Therapie werden mit abnehmendem Reifealter oder fortgeschrittenem postnatalen Alter (Therapiebeginn \geq 10. Lebenstag) der Frühgeborenen für beide COX Hemmer beobachtet^{30, 134, 161, 162}. Demzufolge wird bei Frühgeborenen mit einem GA $<$ 28 SSW über Ligaturraten in bis zu 40% der Fälle nach erfolgloser medikamentöser Ductusintervention berichtet¹⁶³. Der operative Ductusverschluss erfolgt in der Regel über eine Thorakotomie. Das thorakoskopische Vorgehen ist bisher nur aus einzelnen Zentren

berichtet worden und kommt nur für größere Säuglinge in betracht^{164, 165}. Im Vergleich zur medikamentösen Behandlung ist die Verschlussrate eines PDA mittels Ligatur zwar signifikant höher (RR 0,04: 95%CI 1,12 – 12,93; NNT 9), es treten jedoch insbesondere bei extrem kleinen und unreifen Frühgeborenen vermehrt schwere Komplikationen auf, wie bspw. Pneumothoraces (RR 2,68; 95%CI 1,45 – 4,93; NNT 4) und Recurrensparesen¹⁶⁶⁻¹⁷⁰. Eine prophylaktische Ductusligatur innerhalb der ersten 24 Lebensstunden senkt die Rate chirurgischer Darmerkrankungen (NEC, fokale intestinale Perforation), hat aber keinen Einfluss auf die Hirnblutungsrate und ist zudem mit einer erhöhten BPD Inzidenz assoziiert^{85, 171}. Eine retrospektive Kohortenstudie hat die Ligatur eines symptomatischen PDA nach erfolgloser prophylaktischer Indometacintherapie bei Frühgeborenen mit einem Gestationsalter < 28 Wochen als einen unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung einer bronchopulmonalen Dysplasie (RR 1,91; 95%-CI 1,02-3,57) identifiziert¹⁷². Die Ligatur eines symptomatischen PDA nach erfolgloser medikamentöser Therapie ist mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten einer bronchopulmonalen Dysplasie (RR 1,81; 95%-CI 1,19-3,03), einer schweren ROP (RR 2,20; 95%-CI 1,18-3,30) und einem neurologischen Entwicklungsdefizit im korrigierten Alter von 18 Monaten (RR 1,98; 95%-CI 1,18-3,30) verbunden¹⁷³. Bislang ist allerdings unklar, ob die Ductusligatur die direkte Ursache oder nur ein Marker für das ungünstige Langzeitergebnis ist.

1.3 Modellsysteme zur Untersuchung des Ductusverschlusses bei Frühgeborenen

Es gibt zahlreiche experimentelle und klinische Ansätze zur Untersuchung unterschiedlicher Aspekte des Ductusverschlusses Frühgeborener. Generell sind jedoch die Möglichkeiten der Beantwortung klinischer Fragestellungen bei Kindern aus ethischen Gründen sehr limitiert. Deshalb werden häufig experimentelle Modelle zur Untersuchung eingesetzt. Im Folgenden soll auf die für diese kumulative Habilitationsschrift relevanten experimentellen und klinischen Untersuchungsansätze näher eingegangen werden.

1.3.1 Zellkultur

Zellkulturmodelle sind ideal zur detaillierten Überprüfung möglicher Schädigungsmechanismen einzelner Wirkstoffe in vitro, insbesondere wenn keine anderen Modelle zur Verfügung stehen. Die Aussagekraft von Zellkulturmodellen ist allerdings durch die begrenzte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf in vivo Systeme limitiert. In unseren Experimenten zur Untersuchung einer Beeinflussung des Bilirubinstoffwechsels durch Ibuprofen wurde nicht mit einer kommerziell erhältlichen Zelllinie, sondern mit primären Neuronenkulturen gearbeitet. Die neuronalen Zellen wurden aus dem Kortex von embryonalen Wistar Ratten (E16-E19) isoliert¹⁷⁴. So konnte

die potentiell neurotoxische Wirkung von Ibuprofen allein und in Kombination mit unkonjugiertem Bilirubin (UCB) überprüft werden. Zudem ermöglicht der nachfolgende Einsatz entsprechender Inhibitoren (bspw. eines Caspaseninhibitors) durch Modulation der Signaltransduktion die Identifizierung geeigneter neuroprotektiver Angriffspunkte. Die Proben aus der Zellkultur wurden mittels Laktatdehydrogenase (LDH) Bestimmung, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assay, ELISA Technik und Western Blotting auf molekulare Mechanismen der apoptotischen Stoffwechsellkaskade untersucht. Nach einer Wachstumsdauer von 14 bis 16 Tagen handelt es sich bei den in unseren Versuchen eingesetzten Zellen um ausgereifte Neuronen. Die zugrundeliegenden biochemischen Abläufe adulter und unreifer Nervenzellen ähneln sich zwar prinzipiell, in vielen experimentellen Modellen wird jedoch das Ausmaß einer Schädigung deutlich vom Alter beeinflusst^{175, 176}. Daher sollten unsere Ergebnisse zunächst an unreifen Neuronen (4-5 Tage Kultivierung) überprüft werden, bevor an Möglichkeiten zur Übertragung auf ein geeignetes tierexperimentelles Modell gedacht werden kann. Im Tiermodell könnten weitere Rückschlüsse über die Wirkung von Ibuprofen und UCB auf die anderen im ZNS residenten Zellen getroffen werden. Tierexperimentell arbeitende Gruppen, die sich mit dem Ductusverschluss beschäftigen, verwenden für ihre Untersuchungen Tiermodelle verschiedener Spezies (Maus, Ratte, Meerschwein, Kaninchen, Ferkel, Lamm, Pavian)^{10, 37, 177-181}.

1.3.2 Histologische Untersuchungen an humanen post mortem Präparaten

Die Mehrzahl der histologischen Studien zum Ductusverschluss wurde in unterschiedlichen Tiermodellen durchgeführt. Für den humanen Ductus liegen dazu nur wenige Daten vor. Um histologische Untersuchungen an humanem Gewebe durchführen zu können, muss in der Regel auf Archivmaterial von verstorbenen Kindern zurückgegriffen werden. Das hat den Nachteil, dass nicht jeder Fall die gleiche Fixationsdauer aufweist, wie es bei der histologischen Aufarbeitung von Tierexperimenten der Fall ist. Dies kann sich unter Umständen negativ auf die Bandbreite der Möglichkeiten der immunhistochemischen Techniken auswirken¹⁸². Zudem ist das Material gängigen Analysetechniken wie RT-PCR, in-situ Hybridisierung und Western Blotting nicht zugänglich. Zur Validierung der tierexperimentellen Erkenntnisse zum Ductusverschluss am Menschen haben wir humanes fetales Ductusgewebe von medizinisch indizierten Schwangerschaftsabbrüchen und spontanen Aborten zwischen der 11. und der 38. SSW verwendet. Das mittlere Gestationsalter der Präparate betrug 21 SSW mit 2 Häufigkeitsgipfeln in der 13. und 22. SSW, die den Zeitpunkten der regulären sonographischen Feindiagnostik während der Schwangerschaft entsprechen. Die

reifebedingten histologischen Veränderungen während des Ductusumbaus wurden anhand von Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Präparaten charakterisiert, um einen entsprechenden Reifescore des Gefäßes zu etablieren. Autopsiefälle mit Herzfehler oder schwerer Inflammationsreaktion wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Im nächsten Schritt wurden die reifebedingten Veränderungen der Expression bestimmter Wachstumsfaktoren und der Schlüsselfaktoren des Prostaglandin Stoffwechsels an unseren Autopsiepräparaten mittels Immunhistochemie untersucht. Der Zweck dieser Arbeiten war die Überprüfung, ob sich die gängigen im Tiermodell identifizierten Signalwege auch im Menschen nachweisen lassen und die Identifizierung möglicher Gründe für ein späteres Ausbleiben des Ductusverschlusses.

1.3.3 Klinische Modelle

Zur Beantwortung relevanter Fragestellungen zum Ductusverschluss bei sehr unreifen Frühgeborenen, d.h. in einem klinischen Umfeld mit begrenzten Mitteln (limitierte Materialgewinnung, kurze Untersuchungsdauer instabiler Patienten), wurden unterschiedliche Modellsysteme gewählt. In einer longitudinalen Beobachtungsstudie wurde mittels Echokardiographie das Auftreten einer pulmonalen Hypertension sowie die Veränderung verschiedener Echoparameter in Abhängigkeit vom Therapieverlauf unter Ibuprofen zum Ductusverschluss (Responder versus Non-Responder) analysiert.

Blutproben zu sammeln und aufzuarbeiten hat sich in der Vergangenheit als minimal invasive Methode etabliert um bei pathologischen Prozessen empfindliche biochemische Verlaufsparemeter von prädiktivem oder diagnostischem Wert zu erhalten. Im Rahmen einer prospektiven, geblindeten, monozentrischen Studie haben wir das natriuretische Peptid BNP als sogenannten Biomarker im Serum mittels ELISA Technik untersucht, um das Ausmaß der kardialen Belastung durch einen PDA bei unseren Frühgeborenen näher charakterisieren zu können.

Die drei retrospektiven klinischen Arbeiten hatten einerseits die Identifizierung von Nebenwirkungen der unterschiedlichen Ductusinterventionen und andererseits die Analyse der psychomotorischen Entwicklung unserer Patienten im Alter von 2 Jahren nach Ductustherapie zum Ziel. Die Ergebnisse einer retrospektiven Auswertung klinischer Daten haben zwar nicht annähernd die Evidenzstärke prospektiver Studien, sind aber eine wichtige Vorarbeit auf dem Weg zur Entwicklung neuer prospektiver Fragestellungen.

2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Frühgeborene unter 1500g Geburtsgewicht repräsentieren im Durchschnitt 1,5% aller Lebendgeburten in Europa¹. Das entspricht einer Zahl von ungefähr 75.000 Kindern jährlich. Obwohl die Überlebensraten dieser Kinder in den letzten Jahren ständig gestiegen sind, hat sich die Chance ohne Behinderung zu überleben kaum verändert^{183, 184}. Es ist wohlbekannt, dass verschiedene Risikofaktoren, wie bspw. Ausmaß der Unreife, männliches Geschlecht, niedriger Sozialstatus, Auftreten einer intraventrikulären Hirnblutung (IVH), einer periventrikulären Leukomalazie (PVL) oder einer bronchopulmonalen Dysplasie (BPD) mit einem beeinträchtigten neurologischen Langzeitergebnis assoziiert sind¹⁸⁵. Trotz einer Vielzahl von Studien zur Wirksamkeit unterschiedlicher Ductusinterventionen ist bislang jedoch unklar, welche Bedeutung ein PDA und dessen Therapie für die spätere Lebensqualität dieser sehr untergewichtigen Frühgeborenen haben. Dies ist maßgeblich dem Umstand zuzuschreiben, dass alle Interventionsstudien eine spätere „Rescue“-Therapie der Kontrollgruppe zugelassen haben und kaum Langzeitergebnisse erhoben wurden. Ein Ausbleiben des physiologischen Spontanverschlusses des DA während der ersten 3 Lebenstage ist bei über 30% der Frühgeborenen < 1500g Geburtsgewicht und ca. 50-70% der Frühgeborenen < 1000g Geburtsgewicht zu beobachten^{78, 82, 186, 187}. Infolge der resultierenden Volumenbelastung von Herz und Lungen einerseits sowie der Minderperfusion von Gehirn und Darm andererseits führt ein PDA möglicherweise zu Organschäden^{89, 90}. Die andauernde Debatte zum „optimalen Management“ eines PDA bei Frühgeborenen wird durch neue Einblicke in die Pathophysiologie des PDA, die sich verändernde klinische Evidenz und das Hinzukommen neuer ante- und postnataler Therapien während der letzten Dekade (z.B. Zulassung von Ibuprofen zur medikamentösen Ductusintervention im Jahr 2004) in Gang gehalten. Aufgrund steigender Überlebensraten der extrem untergewichtigen Frühgeborenen und der hohen Inzidenz eines PDA in dieser Patientenpopulation, beschäftigt die Therapiestrategie auch heute weiterhin jeden Neonatologen. Eine weitere Besonderheit stellt die Unzugänglichkeit humanen Ductusgewebes für pathophysiologische Untersuchungen dar. Aufgründessen wurden die zum Ductusverschluss führenden Mechanismen bisher hauptsächlich an Tiermodellen untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es nicht eine neue Therapieempfehlung zu generieren, sondern durch die Untersuchung verschiedener Teilaspekte des Ductusverschlusses zu einem besseren Verständnis dieses komplexen Problems beizutragen. Im Einzelnen wurde folgenden Fragestellungen nachgegangen: So sollte anhand der durchgeführten ex vivo Untersuchungen an humanen Ductuspräparaten neben der Etablierung eines verbesserten Verfahrens zur

histologischen Reifealterbestimmung auch die Übertragbarkeit der tierexperimentellen Erkenntnisse über die maßgeblich am spontanen Ductusverschluss beteiligten Faktoren auf den Menschen überprüft werden. Die potentielle Nebenwirkung der vergleichsweise neuen medikamentösen Therapie des PDA bei Frühgeborenen mittels Ibuprofen auf den Bilirubinstoffwechsel wurde gezielt im Zellkulturmodell und anhand der Auswertung klinischer Daten untersucht. Im Rahmen von prospektiven klinischen Studien wurden der Biomarker BNP und echokardiographische Parameter hinsichtlich ihrer Eignung zur Steuerung der Ductustherapie bei Frühgeborenen überprüft. Ferner wurden die Komplikationen der medikamentösen und chirurgischen Ductusintervention am eigenen Patientenkollektiv sehr untergewichtiger Frühgeborener über einen Zeitraum von mehr als 10 Jahren evaluiert. Die Auswirkung der unterschiedlichen Therapieoptionen zum Ductusverschluss auf die Langzeitentwicklung des eigenen Patientenkollektivs wurde im korrigierten Alter von zwei Jahren analysiert. Eine noch detailliertere Ausführung zu den im Einzelnen untersuchten Fragestellungen ist der vorangestellten Kurzfassung der jeweiligen Veröffentlichung zu entnehmen.

3. VERZEICHNIS DER ZUR KUMULATIVEN HABILITATION ZUSAMMENGEFASSTEN PUBLIKATIONEN

1. Rheinlaender, C., Weber, S.C.T., Sarioglu, N., Strauß, E., Obladen, M., **Koehne, P.** Changing expression of cyclooxygenases and prostaglandin receptor EP4 during development of the human ductus arteriosus. *Pediatric Research* 60, 2006, 270-275
2. Weber, S.C., Rheinlaender, C., Sarioglu, N., Peiser, C., Rüdiger, M., Obladen, M., **Koehne, P.S.** The expression of VEGF and its receptors in the human ductus arteriosus. *Pediatric Research* 64, 2008, 340-345
3. Czernik, C., Lemmer, J., Metze, B., **Koehne, P.S.**, Mueller, C., Obladen, M. B-type natriuretic peptide to predict ductus intervention in infants <28 weeks. *Pediatric Research* 64, 2008, 286-290
4. Pees, C., Walch, E., Obladen, M., **Koehne, P.** Echocardiography predicts closure of patent ductus arteriosus in response to ibuprofen in infants less than 28 weeks gestational age. *Early Human Development* 86, 2010, 503-508
5. **Koehne, P.S.**, Bein, G., Alexi-Meskishvili, V., Weng, Y., Bühner, C., Obladen, M. Patent ductus arteriosus in very low birthweight infants: complications of pharmacological and surgical treatment. *Journal of Perinatal Medicine* 29, 2001, 327-334
6. Berns, M., Toennesen, M., **Koehne, P.**, Altmann, R., Obladen, M. Ibuprofen augments bilirubin toxicity in rat cortical neuronal culture. *Pediatric Research* 65, 2009, 392-396
7. Rheinlaender, C., Helfenstein, D., Walch, E., Berns, M., Obladen, M., **Koehne, P.** Total serum bilirubin levels during cyclooxygenase inhibitor treatment for patent ductus arteriosus in preterm infants. *Acta Paediatrica* 98, 2009, 36-42
8. 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 Human Development* 86, 2010, 87-92

4. FRAGESTELLUNGEN UND ERGEBNISSE IN DEN VORGESTELLTEN ORIGINALARBEITEN ZUM THEMA

4.1 Histologische Untersuchung der entwicklungsabhängigen Expression von COX-1, COX-2, VEGF und dessen Rezeptoren im humanen Ductusgewebe

Hintergrund

Der Ductusverschluss ist durch mehrere Phasen charakterisiert: 1. Verdickung und Umbau der Intima, 2. perinatale Kontraktion und 3. endgültiger postnataler Verschluss durch Obliteration. Der programmierte proliferative Umbau des DA beginnt bereits während der Fetalzeit und zeigt eine große entwicklungsabhängige Schwankungsbreite, die nicht unbedingt mit dem Reifealter korreliert. Unklar ist bisher durch welche Faktoren dieser gefäßspezifische Umbauprozess ausgelöst wird und wie das Zusammenspiel von funktionellem und proliferativem Gefäßverschluss im Detail funktioniert. Höchstwahrscheinlich wird dieser Vorgang durch verschiedene Signalwege gesteuert, wobei dem Prostaglandin- und VEGF-System eine zentrale Bedeutung zugeschrieben wird. Insbesondere PGE₂ und Prostazyklin sind für die Regulation des Ductustonius während der Schwangerschaft verantwortlich. Veränderungen der Konzentration von Prostanoiden und der Ansprechbarkeit des DA auf diese scheinen den funktionellen Ductusverschluss zu vermitteln. COXs katalysieren den ersten Schritt der PG Synthese. Zahlreiche Studien haben die Expression der beiden COX Isoformen und der vier PGE Rezeptorsubtypen in verschiedenen Säugetierarten untersucht und sowohl interspezies als auch entwicklungsabhängige Unterschiede festgestellt. In Tierstudien wurden die Bildung neointimaler Kissen und die Einsprossung von Vasa vasorum während der dritten Phase des Ductusverschlusses als VEGF-abhängige Prozesse identifiziert. Untersuchungen zum Prostaglandin- und VEGF-System an einem großen Kollektiv von humanem Ductusgewebe lagen bisher nicht vor.

4.1.1 Histologische Untersuchung der entwicklungsabhängigen Expression von Cyclooxygenasen und deren EP4 Rezeptor im humanen Ductusgewebe

Fragestellung

Etablierung eines verbesserten Auswertungsverfahrens zur Bestimmung des histologischen Reifealters des sich entwickelnden humanen DA und Versuch des Nachweises der Schlüsselfaktoren des PG Stoffwechsels (beide COX Isoformen und EP4 Rezeptor) im humanen fetalen DA. Ferner sollte geklärt werden, ob sich die Expression dieser Faktoren während der fetalen Entwicklung verändert.

Methodik

An 80 Autopsiepräparaten des humanen DA wurde zur Bestimmung der Korrelation von histologischem Reifealter des DA und dokumentiertem Gestationsalter (11 – 38 SSW) eine Elastika-van-Gieson Färbung durchgeführt. Die Expression von COX-1, COX-2 und des EP4-Rezeptors wurde immunhistochemisch bestimmt.

Ergebnisse

Die typischen histologischen Entwicklungsveränderungen des DA korrelieren nur schwach mit dem Gestationsalter. Folgende Unterschiede in der Expression der Schlüsselfaktoren des PG Stoffwechsels wurden gefunden: eine schwache COX-2 Expression während der gesamten Fetalzeit, wohingegen die Expression von COX-1 und EP4-Rezeptor während der fetalen Entwicklung kontinuierlich zunahm.

Zusammenfassung

Die histologische Reifealterbestimmung ist für die Untersuchung entwicklungsabhängig regulierter Prozesse im fetalen DA notwendig. Unsere Ergebnisse bestätigen Tierstudien, in denen COX-1 die vorrangige Funktion im DA während der gesamten Fetalzeit und dem EP4-Rezeptor das aktive Offenhalten des DA im letzten Trimenon der Schwangerschaft zugeschrieben wurde.

Changing expression of cyclooxygenases and prostaglandin receptor EP4 during development of the human ductus arteriosus.

Rheinlaender C, Weber SC, Sarioglu N, Strauss E, Obladen M, Koehne P.

Pediatric Research 60, 2006, 270-275

<http://dx.doi.org/10.1203/01.pdr.0000233066.28496.7c>

Die vorangehende Arbeit hatte wichtige Erkenntnisse zur Expression der maßgeblich am funktionellen Ductusverschluss beteiligten Schlüsselfaktoren des PG Stoffwechsels im humanen Ductusgewebe während der Fetalzeit vermittelt. Die nachfolgende Arbeit sollte demgegenüber Informationen zum VEGF-System liefern, dem eine essentielle Rolle v.a. während der letzten Phase des Ductusverschlusses zugeschrieben wird.

4.1.2 Histologische Untersuchung der entwicklungsabhängigen Expression von VEGF und dessen Rezeptoren im humanen Ductusgewebe

Fragestellung

Untersuchung der entwicklungsabhängigen Expression von VEGF und dessen Rezeptoren in humanem Ductusgewebe. Die Annahme, dass die Expression dieser Faktoren in der Gefäßwand des DA bei Foeten trotz übereinstimmendem GA und morphologischem Alter schwankt, könnte das Ausbleiben eines spontanen Ductusverschlusses bei einigen Frühgeborenen erklären.

Methodik

Immunhistochemischer Nachweis der Proteinexpression von VEGF und den drei VEGF-Rs an 63 Autopsiepräparaten des humanen fetalen DA mit einem GA 11 – 38 SSW.

Ergebnisse

Eine perinukleäre VEGF-Expression war in allen Gefäßschichten des DA gleichbleibend über die verschiedenen Entwicklungsstadien nachzuweisen. Die VEGF-R1 und VEGF-R3 Expression war besonders deutlich im Endothel in den frühen Reifestadien zu finden und nahm im Verlauf der Fetalzeit ab. Dagegen dominierte die VEGF-R2 Expression in der Media während der späteren Fetalzeit.

Zusammenfassung

Unsere Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von VEGF als Mediator im Rahmen des programmierten proliferativen Umbaus des DA. Ferner unterstützen sie die Vermutung, dass VEGF-R1 und VEGF-R3 für die normale Gefäßentwicklung während der Embryogenese verantwortlich sind, wohingegen VEGF-R2 die VEGF-abhängigen strukturellen Ductusveränderungen während der späteren Fetalzeit zu vermitteln scheint.

The Expression of VEGF and its Receptors in the Human Ductus Arteriosus

Sven C Weber, Cornelia Rheinlaender, Nanette Sarioglu, Christian Peiser, Mario

Rüdiger, Michael Obladen and Petra S Koehne¹

Pediatr Res. 2008;64:340-5

<http://dx.doi.org/10.1203/PDR.0b013e318180a375>

Die vorangehende Arbeit hatte wichtige Erkenntnisse zur Expression der maßgeblich am programmierten proliferativen Ductusumbau beteiligten Faktoren des VEGF Stoffwechsels im humanen Ductusgewebe während der Fetalzeit vermittelt. Aus Tierexperimenten ist bekannt, dass die postnatale VEGF-Expression in den Glattmuskelzellen des DA nur durch eine ausgeprägte Hypoxie hervorgerufen werden kann. Hierzu ist eine ausreichende Kontraktion der Gefäßwand Voraussetzung, ohne die der endgültige postnatale Verschluss des DA ausbleiben würde. Die beiden nicht-selektiven COX Hemmer Indometacin und Ibuprofen werden bei Frühgeborenen mit PDA zur Erzielung eines funktionellen Ductusverschlusses durch Gefäßkontraktion eingesetzt. Zur besseren Steuerung der Ductustherapie ist neben der Optimierung der Dosierungsregime mit Erzielung ausreichender Wirkspiegel der COX Hemmer auch die zeitnahe Identifizierung derjenigen Frühgeborenen wichtig, die am ehesten von einer Ductusintervention profitieren. Biochemische Marker könnten bei der Diagnosestellung, Therapieentscheidung und –steuerung eine sinnvolle Ergänzung zur Echokardiographie darstellen.

4.2 Steuerung der Ductusintervention bei Frühgeborenen mittels BNP und Echokardiographie

Hintergrund

Die Echokardiographie ist für die Diagnosestellung eines PDA unerlässlich. Zur Einschätzung der hämodynamischen Bedeutung eines PDA ist kein Echokardiographiekriterium alleine geeignet, sondern vielmehr die gemeinsame Beurteilung mehrerer Kriterien in Zusammenschau mit der klinischen Symptomatik notwendig. Es gibt keine Studien, die tatsächlich unterschiedliche Kombinationen von Parametern hinsichtlich ihrer Eignung für die Diagnosestellung eines hämodynamisch bedeutsamen PDA untersucht haben, so dass auch kein validierter „Score“ zur Schweregradeinteilung oder einer sich hieraus ableitenden Indikation zur medikamentösen bzw. chirurgischen Therapie existiert. Eine Reihe von Studien haben Echokardiographiekriterien auf ihren Wert als prädiktiven Parameter zur frühen Vorhersage eines als hämodynamisch wirksam erachteten PDA überprüft. Kein Echoparameter zeichnet sich durch eine so hohe Sensitivität und Spezifität aus, dass er alleine als verlässlicher Wert für die Vorhersage eines später als hämodynamisch wirksam erachteten PDA geeignet wäre. An dieser Stelle könnte der Einsatz von Biomarkern helfen, eine diagnostische Lücke zu schließen. Die kardiale Belastung durch einen PDA spiegelt sich in einer erhöhten Freisetzung der natriuretischen Peptide ANP und BNP wieder. Das vorwiegend in der Herzkammer als Antwort auf zunehmende Volumenbelastung durch Dehnung der kardialen Myozyten gebildete BNP ist ein direktes Maß für die physiologische Antwort des Herzens auf hämodynamische Belastung. Daher könnte sich BNP bei isoliertem Vorliegen eines PDA zur Quantifizierung der hämodynamischen Auswirkungen eines PDA und zur Vorhersage eines als behandlungsbedürftig eingestuftes PDA eignen.

4.2.1 Vorhersage der Ductusintervention bei Frühgeborenen mit einem Gestationsalter <28 Wochen mittels brain-type natriuretischem Peptid

Fragestellung

Es sollte festgestellt werden, ob sich der Biomarker BNP als Screeningparameter zur Vorhersage eines behandlungsbedürftigen PDA bei Frühgeborenen mit einem GA unter 28 SSW eignet.

Methodik

Im Rahmen dieser prospektiven geblindeten Studie wurden die BNP Plasmaspiegel von 67 Frühgeborenen im Alter von 24-48 Lebensstunden mittels eines Chemilumineszenz Immunoassays bestimmt. Die Entscheidung zur Ductustherapie erfolgte bei Vorliegen spezifischer klinischer und echokardiographischer Kriterien. Eine Ductusintervention erfolgte im Verlauf bei 24 Frühgeborenen, wohingegen bei den restlichen 43 keine Ductustherapie erforderlich war.

Ergebnisse

Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren die BNP Konzentrationen in der Interventionsgruppe signifikant höher. BNP Plasmaspiegel und Echoparameter (Ductusdurchmesser und Verhältnis von linkem Vorhof : Aortenwurzel) korrelierten positiv. Der Grenzwert für BNP Plasmaspiegel zur Vorhersage eines als therapiebedürftig eingestuften PDA lag bei beatmeten Frühgeborenen mit einem Gestationsalter < 28 Wochen bei > 550 pg/ml am 2. Lebenstag (Sensitivität 83%, Spezifität 86%).

Zusammenfassung

BNP ist ein geeigneter Screeningparameter mit hoher Sensitivität und Spezifität zur frühen Vorhersage (2. – 3. Lebenstag) eines später hämodynamisch bedeutsam werdenden PDA.

B-type natriuretic peptide to predict ductus intervention in infants < 28 weeks.

Czernik C, Lemmer J, Metze B, Koehne PS, Mueller C, Obladen M.

Pediatr Res. 64(3) 2008: 286-90.

<http://dx.doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181799594>

In der vorangehenden Arbeit war bestätigt worden, dass sich der Biomarker BNP zur Vorhersage eines als behandlungsbedürftig eingestuften PDA eignet und daher eine sinnvolle Ergänzung zur Echokardiographie darstellt. Ein Problem der medikamentösen Ductustherapie ist die mit abnehmendem Reifealter der Frühgeborenen sinkende Verschlussrate. Infolgedessen steigt bei Frühgeborenen mit einem GA unter 28 SSW die Rate chirurgischer Ductusinterventionen. Ob bei Frühgeborenen nach einem erfolglosen medikamentösen Zyklus zur Ductusintervention eher ein zweiter Zyklus COX Hemmer oder aber eine Ligatur die bevorzugte Ductusintervention sein sollte, ist bisher nicht geklärt. Für die weitere Therapieentscheidung ist daher wichtig, diejenigen Frühgeborenen zu identifizieren, bei denen eine wiederholte medikamentöse Therapie Erfolg verspricht. Nebenwirkungen einer unnötigen weiteren medikamentösen Behandlung könnten vermieden oder die ggf. notwendige chirurgische Intervention zeitnah durchgeführt werden. Sinkende Serumwerte der Biomarker im Verlauf sind mit einem Therapieerfolg der Ductusintervention verbunden. Aus den bisher hierzu durchgeführten Studien konnte kein Grenzwert definiert werden, der zuverlässig einen Therapieerfolg erwarten lässt. Der Nutzen von Echoparametern zur Vorhersage eines Therapieerfolges wurde bisher kaum untersucht.

4.2.2 Vorhersage des Ductusverschlusses unter Ibuprofentherapie bei Frühgeborenen mit einem Gestationsalter < 28 Wochen mittels Echokardiographie

Fragestellung

Anhand der Studie sollte festgestellt werden, ob sich Echoparameter zur Vorhersage einer erfolgreichen Ductustherapie mit Ibuprofen bei Frühgeborenen unter 28 SSW mit einem behandlungsbedürftigen PDA eignen.

Methodik

Im Rahmen dieser longitudinalen Beobachtungsstudie wurde das Vorhandensein eines hsPDA mittels Echokardiographie bei 29 Frühgeborenen im Alter von 24-72 Lebensstunden untersucht. Bei Vorliegen eines hsPDA erfolgte eine intravenöse Therapie mit Ibuprofen in Standard Dosierung. Die Ductusparameter wurden im Verlauf anhand serieller Echountersuchungen überwacht.

Ergebnisse

Das Ansprechen auf die 1. Ibuprofendosis (10mg/kg KG) war bei allen 15 Frühgeborenen mit hsPDA durch Abnahme des Ductusdurchmessers oder Zunahme der maximalen Flussgeschwindigkeit über dem Ductus (PDA Vmax) gekennzeichnet. Bei 7 dieser Frühgeborenen war der Ductusverschluss nach Ende des 1. Ibuprofenzyklus erfolgreich (47%). Sieben der 8 Therapieversager erhielten einen 2. Ibuprofenzyklus, der lediglich bei 2 Frühgeborenen erfolgreich war (29%). Bei allen Therapieversagern des 2. Ibuprofenzyklus lag die PDA Vmax \leq 180 cm/s oder der Ductusdurchmesser nahm nach der 3. Ibuprofendosis des 1. Zyklus zu.

Zusammenfassung

PDA Vmax und Ductusdurchmesser am Ende des ersten Ibuprofenzyklus eignen sich folglich zur Vorhersage eines Therapieerfolgs weiterer Ibuprofenbehandlungen.

Echocardiography predicts closure of patent ductus arteriosus in response to ibuprofen in infants less than 28 week gestational age.

Pees C, Walch E, Obladen M, Koehne P

Early Hum Dev. 2010;86:503-8

<http://dx.doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.06.012>

Die vorangehende Arbeit hatte gezeigt, dass sich am Ende des ersten Ibuprofenzyklus aus Echoparametern der zu erwartende Therapieerfolg eines zweiten Ibuprofenzyklus voraussagen lässt. Dies ist zur individuellen Steuerung der weiteren Therapie unerlässlich. Ebenso wichtig ist es, den Nutzen sowie die Risiken der unterschiedlichen Möglichkeiten der Ductusbehandlung für die Therapieentscheidung und –planung im Einzelfall abzuwägen. Voraussetzung hierfür ist die genaue Kenntnis des Nebenwirkungsprofils der beiden COX Hemmer sowie der chirurgischen Ductusintervention.

4.3 Komplikationen nach medikamentöser und chirurgischer Ductusintervention bei sehr untergewichtigen Frühgeborenen

Hintergrund

Seit 1976 existieren aufgrund der langjährigen, weltweiten klinischen Anwendung von Indometacin zum Ductusverschluss bei Frühgeborenen fundierte Kenntnisse über die Nebenwirkungen dieses COX Hemmers. Spärlicher sind die Daten zum Nebenwirkungsprofil des erst seit 1995 in Europa zur medikamentösen Induktion des Ductusverschlusses eingesetzten Ibuprofens. Beim Vergleich der Nebenwirkungen beider COX Hemmer ist die fehlende Beeinflussung der mesenterialen, renalen und zerebralen Perfusion sowie die geringere renale Beeinträchtigung unter Ibuprofentherapie im Gegensatz zu Indometacin hinlänglich bekannt. Dagegen ist die Datenlage zum Einfluss auf den Bilirubinstoffwechsel durch Ibuprofen dürftig. Die Verdrängung von Bilirubin aus der Serumeiweißbindung und der damit verbundene Anstieg des freien Bilirubins könnten zu einem erhöhten Risiko für das Auftreten eines Kernikterus bei Frühgeborenen unter Ibuprofentherapie führen. Dieser Zusammenhang muss v.a. zur Entscheidung über den künftigen Einsatz höherer Ibuprofendosierungen genau abgeklärt werden.

Der chirurgische Verschluss des symptomatischen PDA kommt in der Regel nur nach erfolglosem medikamentösen Ductusverschluss als "Rescue"-Therapie in betracht. Obwohl die chirurgische Ductusligatur bereits 13 Jahre vor Einführung der pharmakologischen Therapie etabliert war, häufen sich Veröffentlichungen zu unerwünschten Nebenwirkungen dieser Therapie insbesondere in jüngster Zeit. Komplikationen der Ductusligatur resultieren v.a. aus der mechanischen Schädigung benachbarter Strukturen und treten häufiger bei extrem kleinen und unreifen Frühgeborenen auf. Probleme nach Ductusligatur beeinflussen eventuell auch die langfristige Lebensqualität Frühgeborener.

4.3.1 Komplikationen nach Ductusintervention

Fragestellung

Analyse der Nebenwirkungen der pharmakologischen (Indometacin) und chirurgischen Ductusintervention (Ligatur und Clip) bei Frühgeborenen < 1500g GG.

Methodik

Im Rahmen dieser retrospektiven Studie wurden die Komplikationen der Ductusintervention bei 156 sehr kleinen Frühgeborenen untersucht, die von Januar 1987 bis Dezember 1998 in der Klinik für Neonatologie der Charité am Campus Virchow-Klinikum aufgrund eines hsPDA behandelt wurden.

Ergebnisse

Im Studienzeitraum wurden insgesamt 931 sehr kleine Frühgeborene in unserer Klinik behandelt. Davon erhielten 156 (16,8%) eine Ductusintervention, die primär pharmakologisch mit Indometacin bei 101 Kindern und chirurgisch bei 55 Kindern erfolgte. Ein sekundärer chirurgischer Ductusverschluss wurde bei 34 Kindern nach erfolgloser Indometacintherapie durchgeführt. Renale Nebenwirkungen traten bei 40 von 101 (40%) Kindern nach medikamentöser Ductustherapie und bei 9 der 55 (16%) primär ligierten Kinder auf. Die häufigste Komplikation nach chirurgischer Ductustherapie war ein Pneumothorax (6 von 89 ligierten Kinder), der in 2 Fällen mit Spannungspneumothorax zum Tod führte. Eine Intention-to-treat Analyse ergab Todesfallraten von insgesamt 16% in der Indometacingruppe und 25% in der Ligaturgruppe.

Zusammenfassung

Der chirurgische Verschluss eines hsPDA sollte bei sehr kleinen Frühgeborenen aufgrund der hohen Komplikationsrate nur sekundär nach erfolgloser medikamentöser Ductustherapie durchgeführt werden.

Patent ductus arteriosus in very low birthweight infants: complications of pharmacological and surgical treatment.

Koehne PS, Bein G, Alexi-Meskishvili V, Weng Y, Bühler C, Obladen M.

J Perinat Med. 2001;29(4):327-34.

Die vorangehende Arbeit hat bestätigt, dass die chirurgische Ductusintervention bei sehr kleinen Frühgeborenen auch bei Durchführung des Eingriffs auf der neonatologischen Intensivstation durch einen geübten Kinderkardiochirurgen trotz Ausschaltung von transportassoziierten Komplikationen noch mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden ist und daher keine primäre Therapieoption sein sollte. Vergleichsweise gering sind dagegen die mit der pharmakologischen Ductusintervention durch Indometacin verbundenen Risiken. Im Nebenwirkungsprofil dieses COX Hemmers überwiegen transiente Nierenfunktionsstörungen. Eine kompetitive Verdrängung von Bilirubin aus der Serumeiweißbindung durch Indometacin ist nicht bekannt. Dagegen steht eine genaue Untersuchung der Beeinflussung des Bilirubinstoffwechsels durch Ibuprofen derzeit noch aus. Dies ist vor allem in Anbetracht der Tatsache, dass sich die Ibuprofentherapie und eine therapiebedürftige Hyperbilirubinämie in der Regel zeitlich überschneiden, notwendig. Erste Erkenntnisse zur Interaktionen von Ibuprofen mit dem Bilirubinstoffwechsel stammen aus *in vitro* Studien.

4.3.2 Ibuprofen erhöht die Bilirubintoxizität in Neuronenkulturen der Ratte

Fragestellung

Anhand dieser experimentellen Studie sollte der Einfluss einer kombinierten Einwirkung von unkonjugiertem Bilirubin (UCB) und Ibuprofen über 48 Stunden an primären neuronalen Zellkulturen der Ratte untersucht werden.

Methodik

Anhand von Methylthiazol Tetrazoliumbromid (MTT)-Reduktion, Lactatdehydrogenase (LDH)-Freisetzung, Caspase 3-Aktivierung und DNA-Fragmentierung wurden sowohl die alleinige als auch die simultane Wirkung von UCB (1 oder 10 μM) und steigenden Ibuprofendosen (7,5 – 1000 $\mu\text{g/ml}$) auf die Lebensfähigkeit neuronaler Zellen untersucht.

Ergebnisse

Die Inkubation der Zellen mit Ibuprofen reduzierte ab einer Konzentration $> 125 \mu\text{g/ml}$ signifikant die Zellvitalität im MTT-Assay und steigerte die LDH-Freisetzung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Die Co-Inkubation mit 10 μM UCB und 250 $\mu\text{g/ml}$ Ibuprofen bewirkte neben einer weiteren Abnahme der Zellvitalität und Zunahme der LDH-Freisetzung auch eine Caspase 3-Aktivierung und DNA-Fragmentierung. Die Vorbehandlung der Zellen mit dem Pan-Caspase Hemmer z-VAD-fmk unterdrückte diesen durch Ibuprofen und UCB hervorgerufenen Effekt.

Zusammenfassung

Die Co-Inkubation mit Ibuprofen in supratherapeutischer Dosierung verstärkt die toxische Wirkung bereits geringer Konzentrationen von UCB auf embryonale kortikale Neuronenkulturen der Ratte. Der zugrunde liegende Mechanismus für den Zelltod der neuronalen Zellen ist Apoptose.

Ibuprofen augments bilirubin toxicity in rat cortical neuronal culture.

Berns M, Toennesen M, Koehne P, Altmann R, Obladen M.

Pediatr Res. 2009 Apr;65:392-6.

<http://dx.doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181991511>

In der vorangehenden Arbeit war nachgewiesen worden, dass unkonjugiertes Bilirubin in geringen Konzentrationen die Lebensfähigkeit von neuronalen Zellen *in vitro* reduziert und dass dieser zytotoxische Effekt durch Ibuprofen verstärkt wird. In wie weit sich diese Ergebnisse aus tierischen Zellkulturen auf das humane System übertragen lassen und welche Bedeutung sie für Frühgeborene haben, die zeitgleich aufgrund einer Hyperbilirubinämie und eines PDA behandelt werden, ist derzeit noch unklar. Zur weiteren Abklärung der möglichen Risiken einer gleichzeitigen Einwirkung von Bilirubin und Ibuprofen waren *in vivo* Untersuchungen zwingend notwendig.

4.3.3 Einfluss der Cyclooxygenasehemmer auf den Frühgeborenenikterus

Fragestellung

Vergleichende Analyse der Bilirubindaten und der neurologischen Ergebnisse im Alter von 2 Jahren nach pharmakologischer Ductusintervention mit Indometacin (87 Patienten) oder Ibuprofen (91 Patienten) bei Frühgeborenen < 1500g GG.

Methodik

Im Rahmen dieser retrospektiven Studie wurden die Daten von insgesamt 178 sehr kleinen Frühgeborenen ausgewertet, die von Januar 1998 bis Dezember 2003 in der Klinik für Neonatologie der Charité am Campus Virchow-Klinikum aufgrund eines hsPDA mit einem Cyclooxygenasehemmer behandelt wurden.

Ergebnisse

Die Frühgeborenen der Indometacin- und Ibuprofengruppe unterschieden sich nicht hinsichtlich ihrer klinischen Ausgangsdaten. Der Serumbilirubinspitzenpegel war in der Ibuprofengruppe mit 10,2 mg/dl deutlich höher als in der Indometacingruppe mit 8,6 mg/dl. Das neurologische Ergebnis im Alter von 2 Jahren unterschied sich nicht zwischen den beiden Gruppen. Eine Einzelfallanalyse identifizierte jedoch 4 Patienten mit ungünstiger neurologischer Entwicklung in der Ibuprofengruppe bei ansonsten unauffälligem klinischen Verlauf. Ob in diesen Fällen tatsächlich ein kausaler Zusammenhang zum hohen Serumbilirubinspitzenpegel infolge der Ibuprofentherapie besteht, bleibt spekulativ.

Zusammenfassung

Bei Frühgeborenen < 1500g GG mit hsPDA ist die Ibuprofentherapie im Vergleich zur Indometacintherapie mit höheren Serumbilirubinspiegeln verbunden. Es wurden keine Unterschiede im neurologischen Langzeitergebnis zwischen beiden Therapiegruppen gefunden.

Total serum bilirubin levels during cyclooxygenase inhibitor treatment for patent ductus arteriosus in preterm infants.

Rheinlaender C1, Helfenstein D, Walch E, Berns M, Obladen M, Koehne P

Acta Paediatr. 2009;98:36-42.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1651-2227.2008.01007.x>

In der vorangehenden Arbeit war durch die bei den mit Ibuprofen behandelten Kindern festgestellten höheren Spitzenwerte von Gesamtbilirubin im Serum ein Einfluss dieses Cyclooxygenasehemmers auf den Bilirubinstoffwechsel indirekt bestätigt worden. Rückschlüsse auf eine parallele Erhöhung des schwer zu messenden, neurotoxischen freien Bilirubins sind allerdings nur anhand von weiteren prospektiven *in vivo* Studien möglich. Die vorherige Arbeit hat trotz höherer Serumbilirubinspitzenpiegel bei den mit Ibuprofen behandelten Kindern keinen Hinweis auf eine schlechtere neurologische Entwicklung dieser Kinder im Alter von 2 Jahren ergeben. Insgesamt ist die Datenlage bezüglich der langfristigen neurologischen Ergebnisse nach Ductusintervention noch dürftig.

4.4 Neurologische Entwicklung Frühgeborener nach medikamentöser Ductusintervention mit Cyclooxygenasehemmern

Hintergrund

Zur Verbesserung der Überlebensqualität sehr kleiner Frühgeborener ist es entscheidend, Faktoren zu identifizieren, die das Langzeitergebnis dieser Hochrisikopopulation beeinflussen. Obwohl sich eine Vielzahl von Studien mit der Wirksamkeit unterschiedlicher Therapiestrategien zum Verschluss eines hsPDA beschäftigt hat, ist die mögliche Auswirkung eines PDA und dessen Behandlung auf das Langzeitergebnis dieser Kinder nicht bekannt. Das ist einerseits der Tatsache zuzuschreiben, dass alle Studien nach erfolgloser Initialtherapie eine Backup Therapie in der Kontrollgruppe zugelassen haben und dass andererseits kaum Daten zur Langzeitentwicklung der Kinder aus diesen Studien vorliegen. Die Mehrzahl der Studien existiert zwar zur therapeutischen Ductusintervention, jedoch umfassen die Studien zum prophylaktischen Einsatz von Cyclooxygenasehemmern die größte Anzahl von Patienten und liefern teilweise auch Daten zur Langzeitentwicklung der Kinder. Dagegen ist die Datenlage zu neurologischen Langzeitergebnissen nach therapeutischer Ductusintervention spärlich. Bisher liegen keine neurologischen Langzeitergebnisse nach therapeutischer Anwendung von Indometacin und Ibuprofen vor. Diese sind aber insbesondere aufgrund des unterschiedlichen kurzfristigen Nebenwirkungsprofils beider Cyclooxygenasehemmer von Interesse. Hinweise auf unerwünschte neurologische Langzeitfolgen nach Ductusligatur stammen aus der TIPP Studie von der Forschergruppe um Barbara Schmidt. In dieser Studie wurde Indometacin prophylaktisch eingesetzt. Ein chirurgischer Ductusverschluss erfolgte bei ausbleibendem medikamentösem Therapieerfolg. Die Nachuntersuchung der Kinder fand im Alter von korrigiert 18 Monaten statt.

Fragestellung

Analyse der neurologischen Ergebnisse im Alter von 2 Jahren nach pharmakologischer (Indometacin oder Ibuprofen) und chirurgischer Ductusintervention (Ligatur) bei Frühgeborenen < 1500g GG.

Methodik

Im Rahmen dieser retrospektiven Studie wurden Daten zur Langzeitentwicklung von 182 sehr kleinen Frühgeborenen ausgewertet, die von Januar 1998 bis Dezember 2003 in der Klinik für Neonatologie der Charité am Campus Virchow-Klinikum aufgrund eines hsPDA behandelt wurden.

Ergebnisse

Im Studienzeitraum erhielten alle 182 Frühgeborenen eine primär pharmakologische Ductusintervention. Der Vergleich zwischen den mit Indometacin (89) und Ibuprofen (93) behandelten Kindern ergab keine Unterschiede hinsichtlich ihrer klinischen Grunddaten, der frühen und späten Morbiditätsdaten, der Ductusverschlussraten und der neurologischen Entwicklung im Alter von 2 Jahren. Ein sekundärer chirurgischer Ductusverschluss erfolgte bei 54 Kindern nach erfolgloser Cyclooxygenasehemmer Therapie. Diese Non-Responder waren im Vergleich zu den erfolgreich pharmakologisch therapierten Kindern unreifer, hatten ein geringeres GG, höhere CRIB Werte und ein erhöhtes Risiko innerhalb der ersten 24 Lebensmonate zu versterben. Dennoch zeigten sich bei den Überlebenden keine Unterschiede bezüglich des neurologischen Ergebnisses im Alter von 2 Jahren.

Zusammenfassung

Die Verwendung von Indometacin oder Ibuprofen zur Therapie eines hsPDA führt nicht zu Unterschieden in der Mortalität oder der Inzidenz einer schwer beeinträchtigten neurologischen Entwicklung im korrigierten Alter von 2 Jahren.

Neurodevelopmental outcome after COX inhibitor treatment for patent ductus arteriosus.

Rheinlaender C1, Helfenstein D, Pees C, Walch E, Czernik C, Obladen M, Koehne P.

Early Hum Dev. 2010;86:87-92

<http://dx.doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2009.12.009>

5. DISKUSSION DER ERGEBNISSE UND AUSBLICK

Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse der einzelnen Studien und deren klinische Relevanz zusammenfassend diskutiert. Für eine detaillierte Diskussion aller Ergebnisse sei auf die jeweilige Originalpublikation verwiesen. Ausgehend vom aktuellen Wissensstand wird ein möglicher Ausblick auf weitere Forschungsschwerpunkte gegeben.

5.1 Diskussion der ex vivo und in vitro Ergebnisse

Die wesentlichen Erkenntnisse zu den maßgeblich am postnatalen Ductusverschluss beteiligten Faktoren stammen aus tierexperimentellen Studien an verschiedenen Säugetierarten (bspw. Lamm, Pavian, Ratte, Kaninchen, Maus und Schwein), da humanes Ductusgewebe in der Regel nicht für pathophysiologische Untersuchungen zur Verfügung steht. Die wenigen Untersuchungen an humanem Ductusgewebe sind durch eine kleine Fallzahl und eine heterogene Patientenpopulation, das Alter, die Pathologie und die Therapie betreffend, gekennzeichnet¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. Aufgrund der häufig angewandten Sauerstoff- und Prostaglandintherapie eignet sich das Ductusgewebe dieser Patienten nicht für systematische funktionelle Fragestellungen. Aus den tierexperimentellen Untersuchungen ist bekannt, dass der komplexe Umbauprozess des DA bereits während der Fetalzeit beginnt und mehrere Signalwege einbezieht, wobei das Cyclooxygenase/Prostaglandin-System und die VEGF-abhängige Angiogenese eine zentrale Rolle zu spielen scheinen^{61, 62, 72, 191-195}. Die Übertragbarkeit tierexperimenteller Ergebnisse auf den Menschen ist jedoch begrenzt, zumal die Expression einzelner Faktoren großen interspezies Schwankungen zu unterliegen scheint^{36, 196, 197}. Dieser Umstand führte dazu, Untersuchungen an einer großen Stichprobe von fetalen Autopsiepräparaten unterschiedlicher Gestationsalter (11 - 38 Wochen) durchzuführen. Die Foeten waren zuvor weder einer Behandlung mit Sauerstoff noch mit Prostaglandinen ausgesetzt. Darüber hinaus wurden Präparate mit bekannter Gefäßfehlbildung oder entzündlichen Veränderungen als möglichem Trigger für eine veränderte Expression relevanter Proteine ausgeschlossen. Aufgrund der erfolgten Routinefixierung mit Paraformaldehyd sind diese post mortem Präparate nur immunhistochemischen Untersuchungsmethoden zugänglich, da die Anwendung molekularbiologischer Techniken natives Gewebe beansprucht. Voraussetzung für die Überprüfung der tierexperimentellen Ergebnisse am humanen Ductusgewebe war zunächst die Optimierung der histologischen Reifealterbestimmung, die seinerzeit von der Arbeitsgruppe um Gittenberger-de Groot etabliert wurde^{9, 198}. Dies war insbesondere vor dem Hintergrund, dass die Expression einzelner Faktoren eine vom Reifealter abhängige Schwankung in den tierexperimentellen Untersuchungen gezeigt hat, wichtig¹⁸¹. Die Zuordnung der Präparate zu einem der fünf

verschiedenen Reifestadien des neuen Reifescorers erfolgte je nach Ausprägung bestimmter charakteristischer histomorphologischer Kriterien. Interessanterweise zeigte sich keine strenge Korrelation von histologischem Reifestadium und rechnerischem Reifealter. Aufgrund der limitierten Probenmenge der jeweiligen Präparate wurden die immunhistochemischen Untersuchungen auf das Prostaglandin- und VEGF-System beschränkt. COX-1 konnte in allen Gefäßschichten des DA nachgewiesen werden. Die stetige Zunahme der COX-1 Expression in allen Gefäßschichten während des Reifungsprozesses trat scheinbar unabhängig von spezifischen reifebedingten morphologischen Veränderungen auf. In allen Reifestadien zeigte das Endothel die stärkste COX-1 Expression. Dagegen blieb die COX-2 Färbung unabhängig vom histologischen Reifegrad und der Gefäßregion des DA unverändert schwach. Die Expression des EP4-Rezeptors, dem stärksten Vermittler einer PGE₂ abhängigen Vasodilatation am fetalen DA, zeigte einen mäßigen Anstieg während des Reifungsprozesses und blieb auf die Intima und Media des DA beschränkt. Die Ergebnisse der durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen zum Prostaglandinstoffwechsel decken sich mit tierexperimentellen Daten insofern, dass dem konstitutiv exprimierten COX-1 die vorrangige Rolle am DA während der Entwicklung zugeschrieben wird¹⁹⁹. In Übereinstimmung mit den hier dargestellten Ergebnissen haben Studien am Lamm und Schwein ein ungleiches Expressionsmuster beider Cyclooxygenasen im DA gezeigt, wobei die COX-1 der COX-2 Expression während der Entwicklung vorausgeht^{181, 197}. Ergebnisse aus Knockout Mausmodellen sprechen dagegen eher dafür, dass beide COX Isoformen perinatal gemeinsam agieren. Doppelte COX1/2-Knockout-Mäuse versterben durch das Offenbleiben des DA, wohingegen der Ductusverschluss bei Mäusen mit Knockout nur einer der beiden Cyclooxygenasen nicht beeinflusst ist²⁰⁰⁻²⁰². Im DA der Maus ist eine vorwiegend perinukleäre Lokalisation beider Cyclooxygenasen festgestellt worden³⁷, die in unseren Präparaten lediglich für COX-2 in allen Reifestadien bestätigt werden konnte. Dagegen ließ sich ein Wechsel im zellulären Expressionsmuster der COX-1 an unseren Präparaten beobachten. Inwiefern der Wandel von einer zunächst perinukleären Lokalisation des Enzyms im Reifestadium I, hin zu einer cytoplasmatischen Anfärbung der COX-1 im Reifestadium III mit strukturellen Veränderungen des DA in Verbindung steht, bleibt Spekulation. Unsere Untersuchungen legen nahe, dass der EP4-Rezeptor besonders für das Offenbleiben des humanen DA im dritten Trimester eine Schlüsselfunktion zu haben scheint. Eine Vergleichsstudie am Schwein hat eine deutliche EP3 und EP4 Rezeptor Expression im fetalen DA jedoch nicht im DA neugeborener Tiere gezeigt²⁰³. Ob dies auch auf den humanen DA übertragbar ist, lässt sich aufgrund der geringen Zahl von reif eingestuftem DA Präparaten (n = 10) in

unserer Studie nicht beantworten. Experimentelle Daten von Mäusen mit Deletionen im EP4 Rezeptor Gen sprechen für eine Doppelfunktion des Prostaglandin-Systems im fötalen DA²⁰⁴. Hiernach vermittelt die PGE₂ Rezeptor Aktivierung nicht nur das Offenhalten des DA, sondern unterstützt nachweislich auch die Entstehung neointimaler Kissen. Die klinische Beobachtung steigender Inzidenzen von chirurgischen Ductusligaturen bei Frühgeborenen mit PDA nach Tokolyse durch Indometacin spricht für die Übertragbarkeit dieser Theorie auf den Menschen^{205, 206}. Als wesentlicher Mechanismus im Hinblick auf den späteren postnatalen Ductusverschluss wird neben dem Verlust von PG Rezeptoren eine sinkende Ansprechbarkeit der PG Rezeptoren auf PGE₂ im Verlauf der Gestation angenommen²⁰⁷. In wie weit es mit wachsendem Reifealter am humanen DA zu einer veränderten Ansprechbarkeit gegenüber Prostanoiden kommt und wodurch diese perinatalen Veränderungen der EP4 Rezeptor Empfindlichkeit ausgelöst werden, läßt sich anhand der durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen nicht beurteilen. Hierzu sind weiterführende funktionelle Untersuchungen erforderlich.

Die Beteiligung der VEGF-abhängigen Angiogenese am permanenten Ductusverschluss ist aus Tierstudien bekannt, in denen die Bildung neointimaler Kissen und die Einsprossung von vasa vasorum im Rahmen des fibrotischen Gefäßumbaus als VEGF-abhängige Prozesse identifiziert wurden⁶². Die Vermutung, dass VEGF in Vorbereitung auf den baldigen postnatalen Ductusverschluss gegen Ende der Fetalzeit ansteigt und ein ausbleibender Ductusverschluss bei einigen Frühgeborenen mit einer geringeren VEGF-Expression zusammen hängen könnte, ist daher naheliegend. Entgegen dieser Annahme zeigten die immunhistochemischen Untersuchungen am humanen DA eine perinukleär lokalisierte und in allen Gefäßschichten gleichbleibende Expression von VEGF während der gesamten Fetalzeit. Die wenigen Studien, die an anderen Säugetierarten durchgeführt wurden, kamen zu übereinstimmenden Resultaten^{10, 61, 194}. Das Expressionsmuster aller VEGF Rezeptoren zeigte dagegen reifeabhängige Unterschiede. Unser Ergebnis einer höheren VEGF-R1 Expression im Endothel des DA in den frühen Reifestadien deckt sich mit der Erkenntnis, dass VEGF-R1 maßgeblich die Neubildung von Blutgefäßen im Rahmen der Embryogenese vermittelt, indem er die konzentrationsabhängige Wirkung von VEGF streng reguliert²⁰⁸. Im Gegensatz dazu überwog der VEGF-R2 in der Media des DA der späteren Reifestadien unserer Präparate. Dies passt zu den eher funktionellen Eigenschaften dieses Rezeptors (bspw. Regulation von Endothelzellmigration, -proliferation und -differenzierung) und den Untersuchungsbefunden am Lamm Modell der Forschergruppe um Clyman et al.^{62, 209}. Infolge einer direkten Verabreichung von VEGF in die Ductuswand von fetalen Lämmern

konnten sie eine deutliche Zunahme von Vasa vasorum in der Gefäßmedia sowie eine Ausweitung der Neointima durch Einwanderung von Glattmuskelzellen feststellen. Obwohl die VEGF-R2 Expression nicht von Clyman et al. untersucht wurde, ist die Vermittlung der beobachteten Veränderungen durch diesen Rezeptor höchstwahrscheinlich.

Immunhistochemische Untersuchungen erlauben zwar keine Rückschlüsse bezüglich der Aktivität oder der Funktionalität eines Proteins, aber die höhere Expression des VEGF-R2 in der Media des DA während der späteren Reifestadien könnte in unseren Präparaten dem ersten Schritt des anatomischen Ductusumbaus entsprechen. Letztlich sind sowohl VEGF-R1 als auch VEGF-R2 für eine normale Entwicklung des Gefäßsystems essentiell, denn die homozygote Deletion eines der beiden Rezeptoren führt zum intrauterinen Tod infolge schwerer Gefäßfehlbildungen^{210, 211}. Die Proteinexpression des VEGF-R3 blieb in unserer Studie abgesehen von einer leichten Abnahme im Endothel der fortgeschrittenen Reifestadien insgesamt moderat. Damit stimmen unsere Beobachtungen mit den bekannten reifeabhängigen Veränderungen dieses Rezeptors, der anfänglich noch von allen embryonalen Endothelzellen exprimiert wird und während der weiteren Entwicklung dann auf das lymphatische Endothel beschränkt bleibt, überein⁴⁵. Inwieweit die postnatale Exposition gegenüber höheren Sauerstoffkonzentrationen zu Veränderungen der Expression von VEGF und dessen Rezeptoren führt, lässt sich anhand unseres Modells, das einen Querschnitt der intrauterinen Entwicklung darstellt, nicht beantworten.

Anhand der hier vorgelegten Untersuchungen am humanen Ductusgewebe konnte erstmals die reifeabhängige differentielle Expression einiger Schlüsselfaktoren des Ductusverschlusses wie COX-1, EP4-Rezeptor sowie der VEGF Rezeptoren während der fetalen Entwicklung des Menschen bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die vermeintlichen Veränderungen des Expressionsprofils der untersuchten Schlüsselfaktoren eher vom morphologischen Reifegrad des DA als vom rechnerischen Reifealter der Präparate abhängig ist. Wichtige Informationen zu den zusätzlich am Ductusverschluss beteiligten Faktoren stammen in jüngster Zeit aus Untersuchungen am neonatalen Mausmodell der Arbeitsgruppe um Echtler²⁹. Durch Einsatz eines mikroskopischen Spezialverfahrens konnten Echtler et al. an lebenden Tieren zeigen, dass Blutplättchen eine entscheidende Rolle beim Ductusverschluss spielen. Durch Thrombozytenaggregation im Lumen des kontrahierten Ductus kommt es zum thrombotischen Gefäßverschluss, der den nachfolgenden strukturellen Umbauprozess des DA wesentlich unterstützt. Zur Assoziation zwischen einer Thrombozytopenie und dem Auftreten eines PDA bei Frühgeborenen gibt es allerdings widersprüchliche klinische Veröffentlichungen²¹²⁻²¹⁴. In Zukunft muss daher genauer untersucht werden, ob sich ein ausbleibender Ductusverschluss tatsächlich nur auf eine numerische Erniedrigung der

Plättchenanzahl zurückführen lässt oder ein Kausalzusammenhang mit einer Plättchenfunktionsstörung besteht.

Trotz der Vielzahl von Studien, die in den letzten vier Dekaden an verschiedenen Tierspezies und in-vitro Modellen durchgeführt wurden, sind der genaue Ablauf der komplexen molekularen Mechanismen, die zur einzigartigen proliferativen Degeneration des DA führen ebenso wie die molekularen Grundlagen eines fehlgeschlagenen Ductusverschlusses bisher nicht vollständig geklärt²¹⁵. Es scheint naheliegend, dass für den reibungslosen Ablauf der beteiligten komplexen Prozesse, wie Ausbildung endothelialer Kissen oder Migration von Glattmuskelzellen besonders differenzierte Fähigkeiten der Glattmuskelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten des DA erforderlich sind. Die unlängst gelungene Etablierung einer reproduzierbaren Methode zur Isolierung und Kultivierung organotypischer Glattmuskelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten aus dem fetalen DA der Ratte, könnte zukünftige funktionelle und molekularbiologische Studien erleichtern²¹⁶. Unter Verwendung einer magnet-aktivierten Zellseparation (MACS-Technik) können Zellkulturen des jeweiligen Zelltyps von hohem Reinheitsgrad (85-94%) und mit guter Lebensfähigkeit gewonnen werden. Im Gegensatz zu bisherigen Studien, in denen das gesamte Ductusgefäß zur Untersuchung molekularer Prozesse herangezogen werden musste, ermöglicht dieses Modellsystem die getrennte Untersuchung gezielter funktioneller Fragestellungen an den unterschiedlichen Zelltypen. Darüber hinaus konnte anhand sinkender ATP-Spiegel, verminderter intrazellulärer Calciumkonzentration und ansteigender VEGF mRNA Expression gezeigt werden, dass die isolierten Glattmuskelzellen in Kultur bis zu 15 Tage nach Isolierung weiterhin auf Sauerstoff reagieren, so dass auch die Untersuchung Sauerstoff abhängiger Prozesse anhand dieses Zellkulturmodells möglich sein wird. Zur Identifizierung weiterer am Ductusverschluss beteiligter Gene, deren tatsächliche Rolle es gilt, zukünftig genauer zu untersuchen (bspw. anhand des zuvor beschriebenen Zellkultursystems), hat eine Chipanalyse der Arbeitsgruppe von Coceani beigetragen²¹⁷. Mittels dieser Analyse wurde einerseits das Expressionsprofil zahlreicher Gene zwischen Ductus und Aorta von unreifen Rattenfoeten (GA 19 Tage) und reifen Ratten (3 Stunden Lebensalter) verglichen. Andererseits wurde der Einfluss von Sauerstoff, als wesentlichem Trigger für den postnatalen Ductusverschluss, auf die differentielle Regulation einer Vielzahl von verschiedenen Genen überprüft und mittels RT-PCR für ausgewählte Gene bestätigt. Die einstige Entdeckung, dass Prostaglandine für das Offenhalten des DA während der Fetalzeit zuständig sind²¹⁸, bildet nach wie vor die Grundlage der heutigen pharmakologischen Therapie eines als behandlungsbedürftig eingestuften PDA. Die beiden zur Verfügung stehenden COX Hemmer Indometacin und Ibuprofen unterscheiden

sich bei gleicher Effektivität hauptsächlich in ihrem Nebenwirkungsprofil^{102, 135}. Infolge der deutlich schlechteren Verschlussraten eines PDA mittels Pharmakotherapie bei den sehr kleinen Frühgeborenen und der laufenden Bestrebungen zur entsprechenden Adaptierung des derzeitigen Dosierungsregimes ist die Beeinflussung des Bilirubinstoffwechsels durch Ibuprofen in den Fokus des Interesses gerückt. Ibuprofen wird zu 95% an Albumin gebunden. Aus in vitro Untersuchungen ist bekannt, dass Ibuprofen in hohen Konzentrationen Bilirubin aus der Eiweißbindung verdrängt²¹⁹⁻²²². Die Ibuprofentherapie könnte folglich mit einem gesteigerten Risiko für eine durch Bilirubin induzierte Neurotoxizität einhergehen. Über eine direkte neuronale Schädigung durch Ibuprofen ist bisher nicht berichtet worden. In unseren Experimenten mit primären embryonalen kortikalen Neuronenkulturen der Ratte reduzierte Ibuprofen ab einer Konzentration > 125 µg/ml maßgeblich die Lebensfähigkeit der Zellen im MTT-Assay und steigerte die LDH-Freisetzung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Die Co-Inkubation mit 250 µg/ml Ibuprofen potenzierte die toxische Wirkung bereits geringer Konzentrationen unkonjugierten Bilirubins (10 µM UCB:humanes Serumalbumin im molaren Verhältnis von 3:1) und bewirkte neben einer weiteren Abnahme der Zellvitalität und Zunahme der LDH-Freisetzung auch eine Caspase 3-Aktivierung und DNA-Fragmentierung. Ähnlich wie bei anderen Autoren ließ sich durch Vorbehandlung unserer neuronalen Zellen mit dem Pan-Caspase Hemmer z-VAD-fmk deren Schädigung verhindern²²³. Unsere Studie hat somit gezeigt, dass die gemeinsam von Ibuprofen und UCB bewirkte Schädigung neuronaler Zellen durch Apoptose hervorgerufen wird.

Die zellspezifische Schädigung neuronaler Zellen durch UCB wurde bereits in anderen in vitro und in vivo Untersuchungen, unter Verwendung von Bilirubin:Albumin in verschiedenen molaren Verhältnissen, beschrieben²²³⁻²²⁸. Verglichen mit in vivo Konzentrationen bei Frühgeborenen (≥ 100 µM) waren die in unserer Studie verwendeten Bilirubinkonzentrationen (1-10 µM UCB) eher niedrig. Dagegen entsprechen die von uns eingesetzten Ibuprofen-Konzentrationen (30-250 µg/ml) den Plasma-Konzentrationen des Medikamentes bei behandelten Kindern. Die bisher im Durchschnitt höchsten Ibuprofen-Plasmaspiegel (180 ± 11 µg/ml; Bereich 107 – 280 µg/ml) wurden eine Stunde nach prophylaktischer Infusion von 10 mg/kg Ibuprofen innerhalb der ersten 3 Lebensstunden gemessen¹⁵³. In den meisten klinischen Studien lagen die Ibuprofen-Konzentrationen zwischen 10 und 70 µg/ml nach der ersten Dosis^{154, 162}. Dennoch könnten unter dem derzeit üblichen Ibuprofen Dosierungsregime (10-5-5 mg/kg alle 24 Stunden i.v.) in seltenen Fällen aufgrund der starken interindividuellen pharmakokinetischen Schwankungsbreite Ibuprofen Spitzenspiegel > 100 µg/ml erreicht werden. Insbesondere bei kranken Frühgeborenen wird die Pharmakokinetik von Ibuprofen durch den klinischen

Zustand (bspw. Säure-Basen-Ungleichgewicht, Flüssigkeitsverschiebungen, sinkende Albuminwerte und steigende Bilirubinspiegel) und die zeitgleiche Therapie mit anderen Medikamenten (bspw. direkte Wechselwirkung der Medikamente, Veränderung der Albuminbindung, Beeinflussung der Ibuprofen Clearance, Induktion des hepatischen Metabolismus) beeinflusst. In diesem Zusammenhang ist unsere Beobachtung, dass Ibuprofen in hohen Konzentrationen unabhängig von der durch die Verdrängung des Bilirubins aus der Albuminbindung verursachten Zellschädigung, neurotoxisch wirkte, von großem Interesse. Lediglich an der BV-2 Mikrogliazelllinie der Maus hat Ibuprofen in Konzentrationen um 500 µg/ml ebenfalls eine Apoptose induziert²²⁹. In anderen neuronalen Schädigungsmodellen (durch Ischämie oder Amyloidproteine im Alzheimermodell vermittelt) wirkt Ibuprofen dagegen in Konzentrationen zwischen 200 – 1000 µg/ml neuroprotektiv^{230, 231}. Der neuroprotektive Effekt von Ibuprofen scheint in diesen Modellen durch Eliminierung von Entzündungszellen und Hemmung der induzierbaren Stickoxidsynthese (iNOS) in aktivierten Mikrogliazellen vermittelt zu sein^{232,233}. Ein Manko unserer Studie ist die fehlende Bestimmung der Konzentration des ungebundenen Bilirubins (UB). Aufgrund der technischen Herausforderungen, die mit der Bestimmung des UB verbundenen sind, haben die meisten in vitro Studien zur Bilirubintoxizität das Ausmaß der Zellschädigung bisher in Bezug auf die UCB Konzentration analysiert. Lediglich in einer Studie wurde die Toxizität des UB im Kulturmedium verschiedener Zelllinien bestimmt²³⁴. In vitro wurde an verschiedenen Gehirnzellen eine UB Konzentration im Bereich von 0,071 - 0,77 µM als neurotoxisch ermittelt²³⁵. Im Serum Neugeborener haben steigende Ibuprofen Konzentrationen durch die zunehmende Verdrängung von Bilirubin aus der Albuminbindung nachweislich zu ansteigenden UB Konzentrationen geführt. Allerdings haben diese in vitro Studien keine einheitlich schlüssigen Ergebnisse geliefert. Dies mag mit der Verwendung unterschiedlicher Methoden zur Bestimmung des UB zusammenhängen. Zuerst haben Cooper-Peel et al. gezeigt, dass es bei Ibuprofen Konzentrationen um 155 µg/ml und Bilirubin:Albumin im molaren Verhältnis von 0,5 zu einem vierfachen Anstieg des UB kommt²¹⁹. Über eine Verdopplung der UB Konzentration im gepoolten Plasma ikterischer Neugeborener haben Ahlfors et al. bei Ibuprofen Konzentrationen von 200 µg/ml berichtet²²⁰. In einer weiteren Studie wurden unterschiedliche molekulare Verhältnisse von Bilirubin:Albumin (0,5, 1, 1,5 und 2) mit Bilirubin Konzentrationen von 5 oder 10 mg/dl und Ibuprofen Konzentrationen zwischen 142,5 – 285 µg/ml getestet²²¹. Eine wesentliche Verdrängung von Bilirubin aus der Albuminbindung wurde lediglich bei der höchsten Ibuprofenkonzentration und dem höchsten molekularen Verhältnis von Bilirubin:Albumin festgestellt. Kürzlich haben Soligard et al. die Verdrängungswirkung von Ibuprofen ab

einer Konzentration von 177 µg/ml sowie eine dosisabhängige lineare Beziehung zwischen Ibuprofen Konzentration und Bilirubinverdrängung bestätigt²²².

Übereinstimmend sprechen alle bisherigen in vitro Studien dafür, dass der Verdrängungseffekt auf die Albuminbindung von Bilirubin erst bei Ibuprofen Konzentrationen einsetzt, die über den mit der Standarddosierung zur Behandlung eines hsPDA normalerweise erreichten Werten bei Frühgeborenen liegen.

Die vorliegenden in vitro Ergebnisse zur Beeinflussung des Bilirubinstoffwechsels durch Ibuprofen und deren tatsächliche Bedeutung für die medikamentöse Ductustherapie von Frühgeborenen mit Ibuprofen, gilt es zukünftig durch entsprechende in vivo Studien genauer zu untersuchen.

5.2 Diskussion der klinischen Ergebnisse bei Frühgeborenen

Die frühzeitige Einschätzung eines PDA als therapiebedürftig ist in den ersten Lebenstagen besonders schwierig. Obwohl eine Vielzahl an Parametern zur Beurteilung der hämodynamischen Relevanz eines PDA zur Verfügung steht, fehlen klinische Zeichen in der Regel noch und auch die echokardiographischen Kriterien sind zu diesem Zeitpunkt umstritten. Die zusätzliche Bestimmung von Biomarkern könnte helfen diese diagnostische Lücke zu schließen und die Ermittlung des optimalen Zeitpunktes der Ductusintervention erleichtern. Um zu testen, ob BNP geeignet ist, die Notwendigkeit einer Ductustherapie vorherzusagen, haben wir bei 67 Frühgeborenen mit einem GA < 28 SSW Plasma BNP am zweiten Lebenstag im Rahmen einer prospektiv geblindeten Studie bestimmt. Darüber hinaus wollten wir die Aussagekraft der BNP Konzentration mit gängigen echokardiographischen Parametern (Ductusdurchmesser und Verhältnis von linkem Vorhof : Aortenwurzel) für die Beurteilung der hämodynamischen Relevanz eines PDA vergleichen. Entgegen anderer Studien waren unsere Kriterien zur Indikationsstellung für eine Ductusintervention strenger (Ductusdurchmesser > 2 mm und künstliche Beatmung)^{116, 117, 236}. Bei 24 Studienkindern erfolgte eine Behandlung aufgrund eines hsPDA (Interventionsgruppe). Die BNP Konzentration war bei diesen Kindern am zweiten Lebenstag signifikant höher als bei den übrigen 43 Patienten, die keiner Ductusintervention bedurften (Kontrollgruppe). Der anhand unserer Studie ermittelte Grenzwert für BNP-Plasmaspiegel zur Vorhersage eines später als therapiebedürftig eingestuften PDA liegt bei beatmeten Frühgeborenen mit einem GA < 28 SSW bei > 550 pg/ml am 2. Lebenstag (Sensitivität 83%, Spezifität 86%). Lediglich 8 der 24 Patienten in der Interventionsgruppe erfüllten unsere Interventionskriterien am zweiten Lebenstag, wohingegen der Ductus bei 16 weiteren Patienten erst im Alter zwischen 62 – 280 Lebensstunden anhand unser Kriterien als interventionsbedürftig eingestuft wurde.

Rückblickend wäre die Kenntnis der BNP Konzentration bei einem Drittel unserer Kinder nützlich gewesen und hätte zu einer frühzeitigeren Intervention des PDA im präsymptomatischen Stadium bei diesen Kindern beigetragen. Darüber hinaus korreliert BNP in unserer Studie mit dem Ductusdurchmesser und dem Verhältnis von linkem Vorhof : Aortenwurzel. In Kombination mit einem Ductusdurchmesser > 1,5 mm hat BNP eine noch bessere Vorhersagekraft für einen später als therapiebedürftig eingestuften PDA, als BNP oder der Ductusdurchmesser allein. Im Gegensatz zu unserer Studien haben andere Arbeitsgruppen die Wertigkeit erhöhter BNP Konzentrationen zur Diagnose eines hsPDA erst nach dem zweiten Lebenstag bei Frühgeborenen untersucht. Choi und Mitarbeiter haben bspw. gezeigt, dass bei Frühgeborenen mit einem GA zwischen 25 bis 34 SSW ein Plasma-BNP-Spiegel von 1110 pg/ml (Sensitivität 100%, Spezifität 95,3%) am 3. Lebenstag für die Vorhersage eines als behandlungsbedürftig eingestuften PDA geeignet ist²³⁷. Neben BNP eignet sich auch die Bestimmung des N-terminalen Fragments von pro BNP (NT-proBNP) zur Diagnostik eines hsPDA. Für Plasma NT-proBNP liegt der Grenzwert zur Vorhersage eines als therapiebedürftig eingestuften PDA bei Frühgeborenen mit einem GA < 33 SSW bei 10180 pg/ml am 2. Lebenstag (Sensitivität 100%, Spezifität 91%)²³⁸. Am 3. Lebenstag zeigte sich bei Frühgeborenen mit einem GA < 34 SSW ein Grenzwert für Plasma NT-proBNP von 11395 pg/ml (Sensitivität 100%, Spezifität 95%) als prädiktiv für einen als hämodynamisch bedeutsam eingestuften PDA²³⁹. Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich BNP und NT-proBNP bei isoliertem Vorliegen eines PDA mittlerweile in mehreren Studien im Vergleich zur Echokardiographie als geeignete Screeningparameter mit hoher Sensitivität und Spezifität zur frühen Vorhersage (2. – 3. Lebenstag) eines später hämodynamisch bedeutsam werdenden PDA erwiesen haben²⁴⁰⁻²⁴². Trotzdem sind Biomarker nicht als Ersatz für die Echokardiographie zur Diagnose eines PDA zu verstehen, sondern als eine nützliche Ergänzung. Gerade im Hinblick auf die kontroverse Diskussion über die Indikationen zur Ductusintervention und den optimalen Therapiezeitpunkt erscheint die Bestimmung von Biomarkern sinnvoll. Anhand von Biomarkern könnten diejenigen Kinder, bei denen sich der Ductus nicht spontan verschließt frühzeitig identifiziert werden, ohne das Risiko der Übertherapie zu erhöhen. Ferner könnten Biomarker helfen, eine von McNamara propagierte individualisierte Ductustherapie anhand einer Schweregradeinteilung zu etablieren²⁴³. Neben der Quantifizierung der hämodynamischen Auswirkung eines PDA können BNP und NT-proBNP auch als Verlaufparameter zur Beurteilung eines medikamentösen Therapieerfolges (gekennzeichnet durch sinkende Plasmakonzentrationen) dienen. Die frühe, gezielte Intervention eines klinisch wie echokardiographisch als hsPDA beurteilten Ductus entspricht derzeit der bevorzugten Therapiestrategie. Durch dieses

Vorgehen erhofft man sich einerseits, eine Übertherapie von Kindern, bei denen sich der Ductus spontan verschließt, zu vermeiden und andererseits, dass sich die Nebenwirkungen der beiden eingesetzten COX Hemmer mit den möglichen Vorteilen einer Intervention die Waage halten. Vor diesem Hintergrund wurden bislang hauptsächlich verschiedene Echoparameter bezüglich ihrer Eignung zur frühen Vorhersage eines später behandlungsbedürftig erachteten PDA und für dessen Einstufung als hämodynamisch relevant überprüft^{87, 117, 118, 121, 244, 245}. Zur Veränderung von Echoparametern während der pharmakologischen Ductusintervention gibt es dagegen kaum Untersuchungen. Ein Ziel unserer longitudinalen Studie war es daher, das Verschlussmuster von hsPDA während des ersten Ibuprofen Behandlungszyklus bei Frühgeborenen mit einem GA < 28 SSW echokardiographisch zu beobachten. Vorrangig sollte anhand unserer Messungen geklärt werden, ob ein erfolgreicher Ductusverschluss aufgrund der Veränderung bestimmter Echoparameter im Rahmen der initialen Ibuprofen Therapie vorherzusagen ist. Unsere Studie bestand nur aus einer kleinen Anzahl von Patienten, da die serielle Untersuchung von Frühgeborenen mittels Echokardiographie eine logistische Herausforderung darstellt. Von 29 Kindern, die im Alter zwischen 24 – 72 Lebensstunden auf das Vorliegen eines hsPDA wiederholt mittels Echokardiographie untersucht wurden, erhielten 15 Kinder mit hsPDA (Verhältnis von linkem Vorhof : Aortenwurzel > 1,4; Resistance Index der Arteria cerebri anterior > 0,8; Sauerstoffbedarf > 35%) eine intravenöse Ibuprofen Standardtherapie im mittleren Lebensalter von 31 Stunden. Auf die Ibuprofen Startdosis sprachen alle 15 Kinder in Form einer Abnahme des Ductusdurchmessers oder einer Zunahme der maximalen Flussgeschwindigkeit über dem Ductus (PDA V_{max}) an. 7 (47%) von 15 Kindern zeigten ein andauerndes Ansprechen auf die Ibuprofen Erhaltungstherapie und hatten 24 Stunden nach Ende des ersten Zyklus einen geschlossenen Ductus. Von den 8 Non-Respondern erhielten 7 einen zweiten Ibuprofen Zyklus, auf den lediglich 2 Kinder ansprachen (29%). Bei den restlichen 5 Kindern erfolgte eine Ductusligatur. Interessanterweise hatten alle 5 Non-Responder des zweiten Ibuprofen Zyklus eine PDA $V_{max} \leq 180$ cm/s und ansteigende Ductusdurchmesser nach der dritten Ibuprofen Dosis des ersten Behandlungszyklus. Keines unserer Kinder entwickelte unter der frühen Ibuprofen Therapie eine pulmonale Hypertension, die mehrfach als Komplikation nach prophylaktischer Anwendung von Ibuprofen beschrieben wurde^{246, 247}. Abgesehen von der stärkeren Beeinträchtigung der Atmung mit gehäufte Notwendigkeit einer Surfactant Substitution (3 Responder versus alle Non-Responder), gab es keinen klinischen Parameter, der geeignet war, ein Ansprechen oder Versagen auf die Ibuprofen Therapie bei unseren Kindern vorherzusagen. Auch die Plasmaspiegel der S(+) und R(-) Ibuprofen Enantiomere waren bei allen Kindern vergleichbar. Die Ursache

für ein Versagen der Ibuprofen Therapie in einem Drittel der Fälle scheint daher am ehesten in der Erhaltungsdosierung von nur 5 mg/dl Ibuprofen begründet zu sein, zumal auch bei den späteren Non-Respondern zunächst eine Abnahme des ductalen Shuntausmaßes nach der Startdosis von 10 mg/dl Ibuprofen zu beobachten war. Im Jahr 2003 regten Keller et al. an, dass bei allen Frühgeborenen mit einem GA < 28 SSW, die nicht auf den ersten Indometacin Behandlungszyklus ansprechen aufgrund der geringen Erfolgsaussichten eines zweiten Indometacin Zyklus eine Ductusligatur erfolgen sollte²⁴⁸. Bedenkt man die bekannten Risiken einer Ductusligatur, so scheint ein zweiter Ibuprofen Zyklus zumindest für einige Kinder die Therapie der Wahl zu sein. Richards et al. dagegen haben kürzlich über eine vergleichbare Effektivität des ersten und zweiten Ibuprofen Zyklus berichtet und empfehlen dieses Vorgehen anstelle der frühzeitigen Ductusligatur bei allen Frühgeborenen < 1000 g GG²⁴⁹. Die kumulative Verschlussrate von 65% glich unserer, wenngleich in der Studie von Richards keine echokardiographische Erfolgskontrolle stattfand. In einer bezüglich des GA nahezu identischen Patientenpopulation hat die Arbeitsgruppe von Dani über eine Verschlussrate von 50% nach dem ersten Ibuprofen Zyklus berichtet²⁵⁰. Im Einklang mit anderen Arbeitsgruppen halten Dani und Mitarbeiter das GA der Frühgeborenen für den einzig unabhängigen Faktor, der für den Erfolg der medikamentösen Ductusintervention entscheidend ist²⁵¹. Verglichen mit unserer Studie war die von Dani et al. beobachtete Verschlussrate nach dem zweiten Ibuprofen Zyklus deutlich höher (7 von 9 Kindern), was am ehesten mit einer höheren und verlängerten Dosierung zusammenhängen mag^{252, 253}. Wir konnten einen erfolgreichen Ductusverschluss durch einen zweiten Ibuprofen Zyklus nur bei denjenigen Kindern beobachten, die einen Ductusdurchmesser < 1,8 mm und eine PDA $V_{max} > 180$ cm/s nach dem ersten Ibuprofen Zyklus hatten. Unsere bisherigen Studienergebnisse legen daher nahe, dass es anhand der Bestimmung von PDA V_{max} und dem Ductusdurchmesser bereits am Ende des ersten Ibuprofenzyklus möglich ist, zwischen Respondern und Non-Respondern weiterer Ibuprofen Behandlungszyklen zu unterscheiden. Hierdurch könnte zukünftig die individualisierte Therapieplanung eines hsPDA bei extrem kleinen Frühgeborenen erleichtert werden, indem gezielt diejenigen Kinder identifiziert werden, bei denen ein zweiter COX Hemmer Zyklus erfolgversprechend ist, wohingegen ein zeitnaher chirurgischer Ductusverschluss bei den anderen Kindern sinnvoller sein könnte.

Durch den weltweiten Einsatz von Indometacin seit 1976 existieren langjährige klinische und wissenschaftlich fundierte Erfahrungen zur prophylaktischen und therapeutischen Anwendung dieses COX Hemmers bei hsPDA. Seit 1995 wird in Europa zunehmend Ibuprofen zur medikamentösen Induktion des Ductusverschlusses eingesetzt. Dieser

Wandel hat sich aufgrund der geringeren Einschränkung der zerebralen, renalen und mesenterialen Durchblutung bei vergleichbarer Wirksamkeit der Ibuprofen-Therapie vollzogen^{111, 145}. Eine mögliche Nebenwirkung von Ibuprofen ist die Erniedrigung der Albuminbindungskapazität für Bilirubin mit einer infolgedessen erhöhten Neurotoxizität des Bilirubins. Obwohl Indometacin ebenfalls stark an Albumin gebunden wird, verdrängt es Bilirubin nicht aus der Eiweißbindung²⁵⁴. Vor dem Hintergrund, dass auf vielen Neugeborenenintensivstationen die Therapie einer Hyperbilirubinämie und eines hsPDA zeitlich in der ersten Lebenswoche zusammenfallen, bedarf dieser Zusammenhang der genauen Klärung. Die Hyperbilirubinämie des Neugeborenen ist ein vorübergehender Zustand, der in der Regel als unkritisch erachtet werden kann. Durch verbesserte Therapiemöglichkeiten der Hyperbilirubinämie (bspw. Phototherapie und Austauschtransfusion) ist die Inzidenz einer Bilirubinenzephalopathie insbesondere bei Reifgeborenen stark gesunken. Obwohl ein Kernikterus auch bei Frühgeborenen selten ist, gibt es immer wieder Berichte über Bilirubin induzierte Hirnschädigungen in dieser Population. Einige Studien haben sogar das Auftreten eines Kernikterus bei Frühgeborenen mit TBC beobachtet, die zuvor als unbedenklich eingestuft wurden^{255, 256}. Darüber hinaus haben Oh et al. nach Bereinigung um verschiedene demographische und klinische Risikofaktoren einen deutlichen Zusammenhang zwischen Spitzen TBC ($140 \pm 43 \mu\text{M}$) und Tod oder beeinträchtigter neurologischer Entwicklung und eingeschränktem Hörvermögen bei Frühgeborenen mit einem GG < 1000g gefunden²⁵⁷. Diese Berichte haben zusammen mit in vitro Daten zu Bedenken über die mögliche Neurotoxizität von Bilirubin bei Frühgeborenen mit gleichzeitiger Ibuprofen-Therapie geführt. In unserer Vorarbeit an der Zellkultur konnte gezeigt werden, dass Ibuprofen die toxische Wirkung von UCB auf neuronale Zellen verstärkt und durch Aktivierung von Apoptose den Zelltod triggert²⁵⁸. Diese Beobachtungen führten dazu, dass wir in unserer klinischen Studie neben dem Ausmaß der Hyperbilirubinämie auch die entwicklungsneurologischen Daten im korrigierten Alter von 2 Jahren von 178 VLBW Frühgeborenen, die aufgrund eines hsPDA mit einem COX Hemmer behandelt wurden (87 Indometacin, Januar 1998 – März 2001; 91 Ibuprofen, April 2001 – Dezember 2003), berücksichtigt haben. Der Vergleich der mit Ibuprofen oder Indometacin behandelten Kinder ergab, abgesehen von einer höheren Inzidenz klinisch und laborchemisch gesicherter Infektionen in der Indometacin Gruppe, keinen Unterschied hinsichtlich des klinischen Ausgangsprofils beider Gruppen. Bei allen Kindern lag die nachgewiesene TBC oberhalb der Behandlungsgrenze und es erfolgte eine entsprechende Phototherapie²⁵⁹. Keines der Kinder hatte einen hämolytischen Ikterus oder erhielt eine Austauschtransfusion. Bei 70 Kindern (80 %) in der Indometacin Gruppe und bei 74 Kindern (81 %) in der Ibuprofen Gruppe überlappte

sich die Behandlung der Hyperbilirubinämie und des hsPDA. Die mittlere Spitzen TBC war in der Ibuprofen Gruppe (10,2 mg/dl) signifikant höher als in der Indometacin Gruppe (8,5 mg/dl). Vollständige Entwicklungsdaten konnten bei 71 Kindern aus der der Indometacin Gruppe und bei 70 Kindern aus der Ibuprofen Gruppe erhoben werden. Die entwicklungsneurologische Nachuntersuchung unserer Patienten wurde gemeinsam von einem Neonatologen mit Erfahrung in der Entwicklungstestung von Frühgeborenen und einer Kinderpsychologin durchgeführt. Bis Dezember 2003 erfolgte die Nachuntersuchung anhand der Griffiths Entwicklungsskalen und wurde dann gemäß der nationalen Richtlinien auf den Bayley II Test umgestellt^{260, 261}. Die Umstellung der Entwicklungstestung während unseres Studienzeitraums schränkt die Rahmenbedingungen unserer Studie ein. Eine Vergleichsstudie beider Testmethoden bei Frühgeborenen existiert bislang nicht, an anderen Patientenpopulationen konnte gezeigt werden, dass beide Testungen austauschbar eingesetzt werden können^{262, 263}. Zudem wurden in der Übergangsperiode von Januar 2004 und März 2005 11 Kinder unserer Kohorte anhand beider Testmethoden nachuntersucht und deren Entwicklung übereinstimmend entweder als normal (7 Kinder) oder schlecht (4 Kinder) eingestuft. Dies und die Tatsache, dass alle Untersuchungen von denselben Personen durchgeführt wurden, sprechen für die Verlässlichkeit unserer Entwicklungsdaten trotz Verwendung zweier unterschiedlicher Testverfahren. Trotz der höheren TBC in der Ibuprofen Gruppe fanden wir im korrigierten Alter von 2 Jahren keinen Unterschied im entwicklungsneurologischen Testergebnis, im Hör- und Sehvermögen sowie im freien Laufen zwischen beiden COX Hemmer Gruppen. Allerdings wurden anhand einer Einzelfallanalyse 4 Kinder mit beeinträchtigtem entwicklungsneurologischem Ergebnis bei ansonsten unkompliziertem klinischen Verlauf in der Ibuprofen Gruppe identifiziert. Die Diskussion der Zusammenhänge zwischen Ibuprofen, UCB, UB Konzentration und Zellschädigung, ist bereits im Rahmen der in vitro Ergebnisse erfolgt (siehe Punkt 5.1), so dass nachfolgend die Diskussion der klinischen Datenlage im Mittelpunkt steht. Als geeigneter Parameter zur Quantifizierung des Risikos einer Bilirubin induzierten Hirnschädigung steht neben TBC und dem molaren Verhältnis von Bilirubin:Albumin auch das UB zur Debatte. Proportional zur UB Konzentration kann UB die Blut-Hirn-Schranke überwinden und folglich einen Messwert für die mögliche Bilirubinbelastung des Gehirns darstellen²⁶⁴. Allerdings wird die neurotoxische Wirkung des Bilirubins nicht nur von der UB Konzentration bestimmt, sondern hängt u.a. vom Ausmaß der Schädigung der Blut-Hirn-Schranke, der Expositionsdauer und der Empfindlichkeit der Zellen des ZNS für eine durch Bilirubin vermittelte Zellschädigung ab²⁶⁵. Klinische Studien haben bei ikterischen Neugeborenen eine Zunahme pathologischer auditorischer Hirnstammpotentiale in

Zusammenhang mit steigenden UB Konzentrationen festgestellt, nicht jedoch infolge steigender TBC²⁶⁶. Aranda und seine Mitarbeiter sind bisher die einzigen, die über deutlich höhere UB Konzentrationen bei 113 mit Ibuprofen behandelten Frühgeborenen berichtet haben. Allerdings gab es keine Korrelation zwischen den Ibuprofen und den UB Konzentrationen²⁶⁷. Im Rahmen kontrollierter klinischer Studien mit kleiner Fallzahl haben die Arbeitsgruppen von Van Overmeire und Desfrère keine bedeutsamen Veränderungen von UB unter Ibuprofen Behandlung in Standarddosierung und zeitgleicher TBC < 10 mg/dl (171 µmol/l) gefunden^{156, 268, 269}. Keine der beiden Studien liefert Informationen über den Einfluss von Ibuprofen auf UB bei Vorliegen höherer TBC. Dies wäre jedoch insbesondere im Hinblick auf die Tatsache, dass in unserer Untersuchung Spitzen TBC bis 15 mg/dl in beiden Therapiegruppen und bei mehr als der Hälfte der Kinder in der Ibuprofen Gruppe TBC > 10 mg/dl auftraten, interessant. Die Bestimmung des UB ist technisch anspruchsvoll und steht bisher zur Routineanwendung in der Klinik nicht zur Verfügung. In unserer Studie konnten wir daher lediglich die TBC berücksichtigen, die adäquat mit UB korreliert, sofern keine weiteren Substanzen um die Bilirubin-Albumin Bindung konkurrieren und die Bindungskapazität von Albumin nicht durch andere Einflussfaktoren herabgesetzt ist²⁷⁰⁻²⁷³. Legt man die von Ahlfors et al. veröffentlichte TBC:UB Korrelationskurve zugrunde, so wurden bei einer maximalen TBC von 14,6 mg/dl in unserer Ibuprofen Gruppe UB Werte zwischen 0,25 – 0,6 µg/dl erreicht²²⁰. Therapeutische Ibuprofen Plasmaspiegel können in vitro zu einem 1,2 – 3-fachen Anstieg von UB führen. Demzufolge hätten in Abhängigkeit von den individuellen Ibuprofen Plasmaspiegeln relevante UB Werte im Bereich von ungefähr 0,3 – 1,8 µg/dl in unserer Studienpopulation auftreten können. Bereits UB Schwellenwerte ab 0,9 µg/dl waren bei Kindern mit dem Auftreten eines Kernikterus assoziiert^{270, 264}. Theoretisch müsste ein aufgrund der Verdrängung durch Ibuprofen erhöhtes UB mit sinkenden TBC einhergehen. Tatsächlich könnte dieser Effekt aber durch die kompetitive Hemmung der Bilirubin Glucuronidierung in den Lebermikrosomen durch zirkulierendes Ibuprofen aufgehoben werden²⁷⁴. Auch wenn wir keinen Unterschied im entwicklungsneurologischen Ergebnis zwischen beiden COX Hemmer Gruppen in unserer Studie finden konnten, so lässt sich ein durch die Ibuprofen Behandlung in der üblichen Standarddosierung bedingter unerwünschter Einfluss höherer Spitzen TBC nicht vollständig ausschließen. Die Population der sehr kleinen Frühgeborenen, bei denen eine PDA Intervention erforderlich war, zeigt häufig ein beeinträchtigtes Ergebnis. Daher ist es bei diesen Kindern besonders schwer Ursache und Wirkung einzelner Faktoren unabhängig voneinander zu betrachten, zumal durch das Auftreten anderer gravierender Probleme wie einer IVH, BPD, ROP oder CP subtile Effekte bspw. infolge verstärkter Bilirubinexposition leicht verschleiert werden

können. Interessanterweise haben mittlerweile auch andere Arbeitsgruppen von erhöhten TBC infolge der Ibuprofen Behandlung von Frühgeborenen mit PDA berichtet²⁷⁵. Zur vollständigen Klärung des Zusammenhangs zwischen Ibuprofen Therapie, Bilirubinstoffwechsel und entwicklungsneurologischem Ergebnis sollten zukünftige klinische Untersuchungen die serielle simultane Messung der Ibuprofenspiegel, des neurotoxischen UB und des TBC berücksichtigen und Kinder mit einer IVH ausschließen. Dies ist vor allem im Hinblick auf die gewünschte Effizienzsteigerung der Ibuprofen Therapie unter Verwendung höherer Ibuprofen Dosierungen unabdingbar.

Insbesondere bei sehr kleinen Frühgeborenen, bei denen eine schonende und minimal invasive Behandlung im Vordergrund steht, müssen vor einer Therapieentscheidung alle Vor- und Nachteile der Behandlung kritisch gegeneinander abgewogen werden. In diesem Zusammenhang werden die Auswirkungen einer Ductusligatur für Frühgeborene seit einiger Zeit kritisch diskutiert. Dies hat uns motiviert, die mit der Indometacin Behandlung und der chirurgischen Ductusintervention einhergehenden kurzfristigen Komplikationen anhand einer retrospektiven Datenerhebung über einen Zeitraum von 12 Jahren von 1987 – 1998 am eigenen Patientenkollektiv zu analysieren. Im Studienzeitraum erfolgte bei 156 Frühgeborenen < 1500g GG eine Ductusintervention aufgrund eines hsPDA. 101 Kinder wurden primär mit Indometacin behandelt, wobei in 34 Fällen (34%) nach erfolgloser pharmakologischer Therapie ein sekundärer chirurgischer Ductusverschluss durchgeführt wurde. Das restliche Drittel der Kinder erhielt eine primär chirurgische Ductusintervention. Bei 40% der Kinder haben wir transiente renale Nebenwirkungen unter der Indometacintherapie beobachtet. Diese Rate ist deutlich höher als in den großen Metaanalysen, die in ca. 12 – 20% der Fälle renale Nebenwirkungen festgestellt haben^{102,135}. Als häufigste Komplikation trat nach chirurgischer Ductustherapie ein Pneumothorax auf (6 von insgesamt 89 ligierten Kindern), der in 2 Fällen mit Spannungspneumothorax zum Tod führte. Intraoperative Blutungen (2 Kinder), Pneumoperitoneum (1 Kind), linksseitige N. phrenicus Parese (1 Kind) und Wundinfektionen (2 Kinder) wurden von uns als seltenere Komplikationen der chirurgischen Ductustherapie identifiziert. In jüngster Zeit häufen sich aufgrund der bronchoskopischen Nachuntersuchung von Frühgeborenen nach Ductusligatur die Berichte über mechanische Schädigungen des linksseitigen N. recurrens durch diesen Eingriff (Inzidenz 1,7 – 11,5% in allen Altersgruppen, 40 – 67% bei extrem unreifen Frühgeborenen)^{168, 169}. Die Folgen einer einseitigen transienten oder dauerhaften Stimmbandparese sind eine Mikroaspirationsneigung, sowie die verzögerte Entwöhnung von der Magensonde und der mechanischen Beatmung¹⁷⁰. Wir haben unsere ductusligierten Frühgeborenen seinerzeit nicht systematisch auf diese mögliche

Komplikation hin untersucht. Während des gesamten Studienzeitraums wurde die Ductusligatur auf unserer Intensivstation von zwei geübten Kardiochirurgen in einer durchschnittlichen Operationszeit von 20-30 Minuten durchgeführt. Durch dieses Vorgehen wurden transportassoziierte Komplikationen vermieden und eine kontinuierliche intensivmedizinische Betreuung der Kinder mit Konstanzhaltung der Körpertemperatur gewährleistet. Die konstanten Rahmenbedingungen garantieren die Verlässlichkeit unserer Analyse trotz ihres rückblickenden Charakters. Zwar haben retrospektive Analysen nie die gleiche Aussagekraft wie prospektiv randomisierte Studien, aber die aus ihnen gewonnen Erkenntnisse haben dazu beigetragen, den primären Einsatz der Ductusligatur kritisch zu überdenken und therapeutische Alternativen in Betracht zu ziehen. Infolgedessen hat sich an unserem Haus ein Paradigmenwechsel im Algorithmus der Ductustherapie vollzogen. Erfolgt im Zeitraum 1987 – 1998 noch primäre Ductusligaturen bei 55 Frühgeborenen, so wurde dieser komplikationsträchtige Eingriff lediglich noch bei 4 Kindern im Folgezeitraum bis 2003 durchgeführt. Heutzutage wird die Ductusligatur bei uns ausschließlich als „Notbehandlung“ nach erfolgloser medikamentöser Ductustherapie bei beatmeten Frühgeborenen vollzogen.

Die Gruppe der sehr kleinen Frühgeborenen unter 1000 g GG hat ein besonders hohes Risiko für die Entwicklung motorischer und kognitiver Defizite^{93, 94}. Fortschritte im Verständnis der fetalen Physiologie haben die Überlebensraten sehr kleiner Frühgeborener deutlich gesteigert²⁷⁶. Eine aktuelle prospektive Studie an 4446 Frühgeborenen mit einem GA zwischen 22 – 25 SSW hat gezeigt, dass die Gabe antenataler Kortikosteroide zur Lungenreife, weibliches Geschlecht, Einlingsgeburten und ein höheres GG (pro 100 g Zuwachsrate) jeweils mit einer Abnahme des Risikos für Tod und des Auftretens einer entwicklungsneurologischen Beeinträchtigung im korrigierten Alter von 18 – 22 Monaten einhergehen¹⁸⁵. Dennoch ist das Risiko, eine zerebrale Schädigung zu entwickeln, in dieser Patientenpopulation hoch^{277, 278}.

Wesentliche Gründe für neurologische Folgeerkrankungen im unreifen Gehirn sind Hyperoxie, Hirnblutungen, Trauma, Infektionen, metabolische Störungen, Intoxikationen und Fehlbildungen. Die Ergebnisse der großen randomisierten Studien zur prophylaktischen Anwendung von Indometacin sind in diesem Zusammenhang von Interesse. Diese haben gezeigt, dass sich hierdurch insbesondere die Rate schwerer Hirnblutungen signifikant senken lässt⁸⁹. Allerdings hat die Senkung der Hirnblutungsrate nicht zu einer verbesserten neurologischen Langzeitentwicklung geführt^{106, 279-282}. Einzig bei männlichen Frühgeborenen hat die Post-hoc Analyse der Nachsorgedaten der Indometacin Prophylaxe Studie von Laura Ment eine bessere sprachliche Ausdrucksfähigkeit im Alter zwischen 3 bis 8 Jahren ergeben²⁸³. Der dieser Beobachtung

zugrunde liegende Mechanismus ist bislang nicht geklärt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die anti-entzündliche Wirkung von Indometacin insbesondere am Gehirn männlicher Frühgeborener neuroprotektive Einflüsse vermittelt²⁸⁴. Ob die im Vergleich zu Indometacin günstigeren biochemischen und physiologischen Eigenschaften von Ibuprofen irgendwelche langfristigen Vorteile für die neurologische Entwicklung Frühgeborener vermitteln ist nicht bekannt. Zumal bisher für keinen der beiden Cox Hemmer Daten zum entwicklungsneurologischen Langzeitergebnis nach therapeutischer Anwendung vorliegen. Dieser Umstand war für uns Anlass, herauszufinden, ob es in der eigenen Patientenpopulation Unterschiede im entwicklungsneurologischen Ergebnis zwischen Frühgeborenen gibt, bei denen eine Ductusintervention entweder mit Indometacin oder mit Ibuprofen durchgeführt wurde. In einer retrospektiven Studie haben wir die Verschlussraten, die kurzfristigen Ergebnisse und das entwicklungsneurologische Ergebnis im korrigierten Alter von 2 Jahren bei 182 VLBW Frühgeborenen, die in der Klinik für Neonatologie am Campus Virchow Klinikum der Charité aufgrund eines hsPDA mit einem COX Hemmer behandelt wurden (89 Indometacin, Januar 1998 – März 2001; 93 Ibuprofen, April 2001 – Dezember 2003), untersucht. Die üblichen Nachteile und Schwächen der retrospektiven Datenerhebung aus einer historischen Stichprobe werden in unserer Studie durch gleichbleibende Therapiestandards (bspw. unveränderter Algorithmus zur Einstufung eines PDA als hämodynamisch relevant und therapiebedürftig), konstantes medizinisches Betreuungspersonal während des Studienzeitraums und eine hohe Nachuntersuchungsrate teilweise kompensiert. Der Vergleich der mit Ibuprofen oder Indometacin behandelten Kinder ergab, abgesehen von einer höheren Rate von weiblichen Frühgeborenen in der Indometacin Gruppe, keinen Unterschied zwischen beiden Gruppen hinsichtlich des klinischen Ausgangsprofils, der perinatalen Daten oder der frühen und späten Morbiditätskriterien. Die Verschlussraten des Ductus waren in beiden COX Hemmer Gruppen vergleichbar (73% Indometacin, 68% Ibuprofen). Unsere Erfolgsrate der medikamentösen Ductusintervention von ca. 70% ist steigerungsbedürftig, zumal eine höhere Erfolgsquote durch Senkung der Ligaturrate zur Verbesserung der langfristigen Ergebnisse dieser Kinder beitragen könnte. In diesem Zusammenhang wurden unlängst die Wirksamkeit einer Verlängerung der COX Hemmer Therapie sowie von eskalierenden Dosierungsregimen untersucht und diskutiert^{253, 285, 286}. Das in unserer Klinik angewandte verlängerte Indometacin Protokoll (3 Gaben von 0,2 mg/kg im Abstand von 12 Stunden, gefolgt von täglichen Erhaltungsdosen von 0,1 mg/kg für maximal 6 Tage) hat laut unserer Studie jedoch nicht zu einer Steigerung der Rate erfolgreich verschlossener Ductus im Vergleich zur Ibuprofen Gruppe geführt, die mittels der üblichen Standard Dosierung (10-5-5 mg/kg im Abstand von 24 Stunden) therapiert

wurde. Daten zum entwicklungsneurologischen Ergebnis im korrigierten Alter von 2 Jahren lagen bei 141 der 182 VLBW Frühgeborenen mit primär pharmakologischer Ductusintervention vor. In Bezug auf die Mortalität und die Häufigkeit eines schwer beeinträchtigten Ergebnisses fanden wir zwischen den mit Indometacin und den mit Ibuprofen behandelten Kindern keine Unterschiede. Somit lässt sich zumindest für unsere Studienpopulation schlussfolgern, dass die verschiedenen pharmakologischen Eigenschaften und das unterschiedliche Nebenwirkungsprofil beider COX Hemmer keinen nennenswerten Einfluss auf das entwicklungsneurologische Ergebnis im korrigierten Alter von 2 Jahren zu haben scheinen. Dagegen wird der mögliche Einfluss der Ductusligatur auf das langfristige Ergebnis von Frühgeborenen zunehmend kontrovers diskutiert. Neben den unmittelbaren Komplikationen durch den chirurgischen Eingriff ist die Ductusligatur auch gehäuft mit dem Auftreten typischer Erkrankungen von Frühgeborenen, wie BPD und ROP assoziiert^{67, 172}. Unlängst haben retrospektive Analysen von Daten aus der multizentrischen TIPP Studie (Trial of Indomethacin Prophylaxis in Preterm Infants) gezeigt, dass die chirurgische Ductusintervention bei Frühgeborenen < 1000 g GG mit einem beeinträchtigten entwicklungsneurologischen Ergebnis im korrigierten Alter von 18 Monaten einhergeht¹⁷³. Mit der detaillierten Datenanalyse unserer hsPDA Patienten haben wir versucht einen Beitrag zu dieser anhaltenden Diskussion zu leisten. Die primäre Ductusintervention mit COX Hemmern war in 30% unserer Fälle (54 Kinder; 24 nach Indometacin und 30 nach Ibuprofen Therapie) nicht erfolgreich. Abgesehen von 2 Fällen, in denen die Patienten noch vor der Ductusligatur verstarben, erfolgte bei den übrigen Kindern ein operativer Ductusverschluss. Verglichen mit den pharmakologisch erfolgreich therapierten Kindern, waren die sekundär ligierten Kinder wesentlich unreifer, hatten ein geringeres GG, eine höhere CRIB Punktzahl (Clinical Risk Index for Babies) und ein höheres Risiko innerhalb der ersten 24 Lebensmonate zu versterben. Außerdem hatten diejenigen Kinder, bei denen medikamentös kein Ductusverschluss zu erzielen war, häufiger eine BPD und eine ROP und waren länger hospitalisiert. Unsere echokardiographischen Daten sprechen für eine gleichwertige hämodynamische Belastung durch den PDA (maximaler Ductusdurchmesser, Anzahl der Kinder mit einem Ductusdurchmesser > 1,5 mm, einer LA:Ao Ratio $\geq 1,4$ und/oder einem Resistenzindex $\geq 0,85$) vor Therapiebeginn bei den Respondern und Non-Respondern der pharmakologischen Ductusintervention. Aufgrund der offenkundigen Unterschiede bezüglich der klinischen Parameter und der Kurzzeitergebnisse zwischen beiden Gruppen liegt die Vermutung nahe, dass sich das entwicklungsneurologische Ergebnis ebenfalls unterscheidet. Überraschenderweise konnten wir im korrigierten Alter von 2 Jahren keine Unterschiede in den entwicklungsneurologischen Testresultaten und der Fähigkeit, frei zu

laufen, zwischen den Überlebenden mit erfolgreichem pharmakologischen Ductusverschluss und den Überlebenden nach Ductusligatur feststellen. Daran änderte auch der Einschluss des Kriteriums „Tod“ in eine zusammengesetzte Variable zum „schlechten Langzeitergebnis“ nichts, obwohl die Therapieversager der pharmakologischen Ductusintervention zum Zeitpunkt der Geburt durch ein niedrigeres GG und eine höhere CRIB Punktzahl gekennzeichnet waren. Unsere Beobachtungen decken sich mit anderen Berichten, die dem GG und der CRIB Punktzahl eine bessere Vorhersagekraft für die Morbidität und die Mortalität Neugeborener als für deren entwicklungsneurologisches Ergebnis zuschreiben²⁸⁷. Die Arbeitsgruppen von Schmidt und Clyman haben aus prospektiven Studien Daten zum Langzeitergebnis von Frühgeborenen nach Ductusligatur erhoben^{172, 173}. Die perinatalen Daten ihrer und unserer Studien haben übereinstimmend gezeigt, dass eine Ductusligatur nach erfolgloser pharmakologischer Ductusintervention in der Regel die kleinsten und unreifsten Kinder betrifft. In einer retrospektiven Studie fand die Arbeitsgruppe um Noori eine erhöhte Mortalität bei sehr kleinen Frühgeborenen nach frustraner pharmakologischer Ductusintervention⁸³. Ein fehlgeschlagener Ductusverschluss geht auch in unserer Studienpopulation mit einer höheren Morbidität (bspw. gekennzeichnet durch eine längere Hospitalisationsdauer) und gesteigerten Mortalität einher. Die Arbeitsgruppe von Barbara Schmidt hat einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer BPD, einer ROP und einer entwicklungsneurologischen Beeinträchtigung im korrigierten Alter von 18 Monaten bei ELBW Kindern mit Ductusligatur entdeckt und diesen ursächlich der Ligatur zugeschrieben¹⁷³. Dagegen hat die Metaanalyse von Fowlie und Davis trotz deutlicher Senkung der Ligaturreate bei ELBW Kindern nach prophylaktischer Indometacin Therapie kein verbessertes entwicklungsneurologisches Ergebnis ergeben⁸⁹. Bei unseren Kindern, die nach erfolgloser pharmakologischer Ductusintervention eine Ductusligatur erhielten, wurde ebenfalls deutlich häufiger eine BPD oder ROP festgestellt. An ihrer im Vergleich zu unserer doppelt so großen Studienpopulation konnte die Arbeitsgruppe von Clyman zwar keine Auswirkung der Ductusligatur auf das spätere neurologische Ergebnis finden, hat jedoch ein unabhängiges Risiko für das Auftreten einer chronischen Lungenerkrankung aufgezeigt¹⁷². Ob sich eine Ductusligatur tatsächlich negativ auf die langfristige Entwicklung auswirkt lässt sich jedoch nur anhand prospektiver Studien klären⁹¹. Aufgrund des Fehlens von Langzeitdaten aus den bisherigen großen prospektiven Therapiestudien und des Verzichtes auf eine unbehandelte Kontrollgruppe, sind die neuropathologischen Konsequenzen eines hsPDA und dessen Therapie für das sich entwickelnde Gehirn bisher insgesamt unklar. Die Erhebung der langfristigen Ergebnisse, vorzugsweise bis zum Schulalter, stellt daher ein „Muss“ für alle zukünftigen

prospektiven kontrollierten Studien zur Ductusintervention dar.

Seit einiger Zeit steht die genetische Beteiligung am Auftreten eines PDA bei Frühgeborenen im Fokus der Forschung mehrerer Arbeitsgruppen. Die Erkenntnis, dass ein PDA bei Frühgeborenen Zwillingspaaren häufiger beide Geschwister betrifft, spricht für den Einfluß genetischer Faktoren²⁸⁸. Studien bei Frühgeborenen mit PDA haben ein gehäuftes Auftreten von Polymorphismen im TFAP2B Gen ergeben^{289, 290}. Mutationen dieses Gens werden beim Char Syndrom beobachtet, das durch die Symptomentrias aus PDA, Gesichtsdysmorphien und anatomischen Anomalien der Hände charakterisiert ist. Darüber hinaus wurden Sequenzpolymorphismen in verschiedenen anderen Genen bei Frühgeborenen mit PDA gefunden. In diesem Zusammenhang ist auch von Bedeutung, dass genetische Polymorphismen derjenigen zwei Subfamilien des CYP 450 Systems (CYP2C8 und CYP2C9), die hauptsächlich Ibuprofen metabolisieren, für eine interindividuell stark schwankende Ibuprofen Clearance verantwortlich sind²⁹¹. Auch in meiner Arbeitsgruppe beschäftigen wir uns derzeit mit dem Nachweis von Polymorphismen im COX, CYP und VEGF Gen. Zukünftig könnte insbesondere die Genotypisierung pharmakokinetischer Faktoren helfen, eine erfolgreiche pharmakologische Ductusintervention vorherzusagen und weitere therapeutische Entscheidungen zu beeinflussen bzw. zu einer individuellen Optimierung der Ductustherapie eines jeden Frühgeborenen beitragen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel moderner perinataler Intensivmedizin ist die Verbesserung des Überlebens von kleinsten Frühgeborenen bei gleichzeitiger Vermeidung einer Behinderung in dieser Hochrisikopopulation. Daher ist es entscheidend Faktoren zu identifizieren, die das Langzeitergebnis dieser Kinder beeinflussen. In diesem Zusammenhang ist der potentielle Beitrag eines hsPDA und dessen Therapie für ein beeinträchtigtes Langzeitergebnis von Interesse. Die Einzigartigkeit der foetalen Struktur des DA wurde bereits in der Medizin des Altertums von Galen beschrieben. Dennoch dauert die Erforschung der am postnatalen Ductusverschluss beteiligten komplexen molekularen Mechanismen bis heute an. Die Kenntnis der genauen Abläufe der physiologischen Reifeprozesse bis hin zum Ductusverschluss ist jedoch notwendig, um verbesserte Therapiestrategien eines hsPDA zu entwickeln. Motivation der vorgelegten kumulativen Arbeit war es daher, den Erkenntnisgewinn zu verschiedenen Teilaspekten des Ductusverschlusses Frühgeborener anhand von experimentellen und klinischen Untersuchungen zu steigern. Es ist bekannt, dass die programmierte proliferative Degeneration des DA bereits während der Fetalzeit beginnt, großen entwicklungsabhängigen Schwankungen unterliegt und nicht streng mit dem rechnerischen Reifealter korreliert. Daher kann ein verzögerter Spontanverschluss des DA oder ein als therapiebedürftig eingestuftes PDA, der in ca. 50% der sehr untergewichtigen Frühgeborenen auftritt, nur zum Teil durch Unreife erklärt werden. Die wesentliche Voraussetzung für den endgültigen Ductusverschluss scheint vielmehr das ungestörte Zusammenspiel zweier grundlegender Prozesse zu sein: des funktionellen Ductusverschlusses durch Kontraktion und der proliferativen Gefäßobliteration. Die zuvor nur im Tiermodell beschriebene reifeabhängige differentielle Expression einiger Schlüsselfaktoren des Ductusverschlusses hat sich anhand der hier vorgelegten Untersuchungen auch am humanen Ductusgewebe bestätigen lassen. Die Veränderungen des Expressionsprofils von COX-1, EP4 Rezeptor sowie den VEGF Rezeptoren sind eher vom morphologischen Reifegrad des DA als vom rechnerischen Reifealter abhängig. Die Interaktion der untersuchten Schlüsselfaktoren miteinander sowie mit anderen vermeintlich am Ductusverschluss beteiligten Faktoren muss in weiterführenden Studien aufgeklärt werden. Der klinische Teil der Arbeiten hat sich unterschiedlichen diagnostischen und therapeutischen Fragestellungen gewidmet, die maßgeblich durch das Fehlen von Daten zur Pharmakokinetik, zum Nebenwirkungsprofil und Langzeitergebnis der Ibuprofentherapie motiviert wurden. Unsere prospektiven klinischen Studien haben gezeigt, dass neben bestimmten echokardiographischen Parametern auch der Biomarker BNP zur Steuerung der Ductustherapie bei Frühgeborenen geeignet ist. Insbesondere bei der weiteren Therapieplanung nach einem

ersten erfolglosen COX Hemmer Zyklus, d.h. der Entscheidung zwischen einem zweiten medikamentösen Therapieversuch oder der chirurgischen Intervention könnten sich diese Parameter zukünftig als hilfreich erweisen. Anhand der in vitro Untersuchungen am neuronalen Zellkulturmodell haben wir den apoptotischen Schädigungsmechanismus hoher Ibuprofendosen näher charakterisiert. Die Auswertung klinischer Daten hat eine Erhöhung der Serumkonzentration des Gesamtbilirubins unter Ibuprofentherapie ergeben und somit die potentielle Nebenwirkung dieses Medikamentes auf den Bilirubinstoffwechsel in vivo verdeutlicht. Die genaue Analyse der Komplikationen der medikamentösen und chirurgischen Ductusintervention am eigenen Patientenkollektiv sehr untergewichtiger Frühgeborener über einen Zeitraum von mehr als 10 Jahren hat zu einem Paradigmenwechsel im Therapiealgorithmus eines PDA an unserer Klinik geführt. Folglich wird bei extrem frühgeborenen Kindern eine chirurgische Ductusligatur nicht mehr als primäre Therapieoption durchgeführt, sondern nur bei beatmeten Kindern nach erfolgloser medikamentöser Ductusintervention. Die Untersuchung der Langzeitentwicklung des eigenen Patientenkollektivs hat hinsichtlich der beiden verwendeten COX Hemmer keine Unterschiede im korrigierten Alter von zwei Jahren ergeben. Eine negative Auswirkung der chirurgischen Ductusligatur auf das Langzeitergebnis konnte jedoch nicht vollständig ausgeräumt werden.

Zusammenfassend haben die in dieser kumulativen Habilitationsschrift aufgeführten Arbeiten verschiedene Aspekte des Ductusverschlusses Frühgeborener in unterschiedlichen experimentellen und klinischen Modellen beleuchtet. Darüber hinaus haben diese Veröffentlichungen weiterführende Fragestellungen aufgezeigt, die es zukünftig zu bearbeiten gilt. Dies wird dazu beitragen, die Gründe für ein Versagen des Ductusverschluss bei einigen dieser sehr unreifen Frühgeborenen besser zu verstehen und die bisherigen Therapiestrategien entsprechend zu modifizieren. In der übergeordneten Zielsetzung, die langfristige Überlebensqualität sehr unreifer Frühgeborener zu verbessern, könnte sich die optimierte Therapie eines hsPDA somit als ein möglicher Baustein erweisen, Langzeitprobleme Frühgeborener zu senken. Um dies sicher herauszufinden, sollte in allen zukünftigen klinischen Studien eine nicht therapierte Kontrollgruppe eingeschlossen werden und die Langzeitentwicklung der Frühgeborenen evaluiert werden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Valls ISA, Carnielli V, Claris O, et al. [EuroNeoStat: a European information system on the outcomes of care for very-low-birth-weight infants (< 1500 g)]. *Z Geburtshilfe Neonatol* 2008;212:116-8.
2. Galenus. 131 a.D.
3. French R. The thorax in history: circulation of blood. *Thorax* 1978;33:714-27.
4. Gräper L. Die anatomischen Verhältnisse kurz nach Geburt. III. Ductus Botalli. . *Z Anat Entwicklungsgesch* 1921;61:312- 29
5. Congdon E. Transformation of the aortic arch system during development of the human embryo. *Contrib Embr Carnegie Instit Washington* 1922;14:47-110.
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. Silver MM, Freedom RM, Silver MD, Olley PM. The morphology of the human newborn ductus arteriosus: a reappraisal of its structure and closure with special reference to prostaglandin E1 therapy. *Hum Pathol* 1981;12:1123-36.
9. Gittenberger-de Groot AC, van Erbruggen I, Moolaert AJ, Harinck E. The ductus arteriosus in the preterm infant: histologic and clinical observations. *J Pediatr* 1980;96:88-93.
10. Clyman RI, Chan CY, Mauray F, et al. Permanent anatomic closure of the ductus arteriosus in newborn baboons: the roles of postnatal constriction, hypoxia, and gestation. *Pediatr Res* 1999;45:19-29.
11. 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.
12. Gittenberger-de Groot AC, Strengers JL, Mentink M, Poelmann RE, Patterson DF. Histologic studies on normal and persistent ductus arteriosus in the dog. *J Am Coll Cardiol* 1985;6:394-404.
13. Thorburn GD. The placenta, PGE2 and parturition. *Early Hum Dev* 1992;29:63-73.
14. Clyman RI. Mechanisms regulating the ductus arteriosus. *Biol Neonate* 2006;89:330-5.
15. Van Overmeire B, Chemtob S. The pharmacologic closure of the patent ductus arteriosus. *Semin Fetal Neonatal Med* 2005;10:177-84.
16. Hammerman C. Patent ductus arteriosus. Clinical relevance of prostaglandins and prostaglandin inhibitors in PDA pathophysiology and treatment. *Clin Perinatol* 1995;22:457-79.
17. Weir EK, Lopez-Barneo J, Buckler KJ, Archer SL. Acute oxygen-sensing mechanisms. *N Engl J Med* 2005;353:2042-55.
18. Weir EK, Obreztchikova M, Vargese A, Cabrera JA, Peterson DA, Hong Z. Mechanisms of oxygen sensing: a key to therapy of pulmonary hypertension and patent ductus arteriosus. *Br J Pharmacol* 2008;155:300-7.
19. Keck M, Resnik E, Linden B, et al. Oxygen increases ductus arteriosus smooth muscle cytosolic calcium via release of calcium from inositol triphosphate-sensitive stores. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288:L917-23.
20. Nakanishi T, Gu H, Hagiwara N, Momma K. Mechanisms of oxygen-induced contraction of ductus arteriosus isolated from the fetal rabbit. *Circ Res* 1993;72:1218-28.

21. Thebaud B, Michelakis ED, Wu XC, et al. Oxygen-sensitive Kv channel gene transfer confers oxygen responsiveness to preterm rabbit and remodeled human ductus arteriosus: implications for infants with patent ductus arteriosus. *Circulation* 2004;110:1372-9.
22. Kajimoto H, Hashimoto K, Bonnet SN, et al. Oxygen activates the Rho/Rho-kinase pathway and induces RhoB and ROCK-1 expression in human and rabbit ductus arteriosus by increasing mitochondria-derived reactive oxygen species: a newly recognized mechanism for sustaining ductal constriction. *Circulation* 2007;115:1777-88.
23. Hong Z, Hong F, Olschewski A, et al. Role of store-operated calcium channels and calcium sensitization in normoxic contraction of the ductus arteriosus. *Circulation* 2006;114:1372-9.
24. Coceani F, Kelsey L. Endothelin-1 release from lamb ductus arteriosus: relevance to postnatal closure of the vessel. *Can J Physiol Pharmacol* 1991;69:218-21.
25. Coceani F, Liu Y, Seidlitz E, et al. Endothelin A receptor is necessary for O(2) constriction but not closure of ductus arteriosus. *Am J Physiol* 1999;277:H1521-31.
26. Kajino H, Chen YQ, Chemtob S, Waleh N, Koch CJ, Clyman RI. Tissue hypoxia inhibits prostaglandin and nitric oxide production and prevents ductus arteriosus reopening. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;279:R278-86.
27. Slomp J, Gittenberger-de Groot AC, Glukhova MA, et al. Differentiation, dedifferentiation, and apoptosis of smooth muscle cells during the development of the human ductus arteriosus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1003-9.
28. 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.
29. Echter K, Stark K, Lorenz M, et al. Platelets contribute to postnatal occlusion of the ductus arteriosus. *Nat Med* 2010;16:75-82.
30. Weiss H, Cooper B, Brook M, Schlueter M, Clyman R. Factors determining reopening of the ductus arteriosus after successful clinical closure with indomethacin. *J Pediatr* 1995;127:466-71.
31. Campbell WB, Halushka PV. Lipid-derived autoacids: Ecosanoids and platelet-activating factor. In: Hardman JG, Limbird LE, eds. *Godman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 9 ed. New York: McGraw-Hill; 1996:601-16.
32. 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.
33. Hahn EL, Gamelli RL. Prostaglandin E2 synthesis and metabolism in burn injury and trauma. *J Trauma* 2000;49:1147-54.
34. Smith GC, Coleman RA, McGrath JC. Characterization of dilator prostanoid receptors in the fetal rabbit ductus arteriosus. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;271:390-6.
35. Momma K, Toyoshima K, Takeuchi D, Imamura S, Nakanishi T. In vivo constriction of the fetal and neonatal ductus arteriosus by a prostanoid EP4-receptor antagonist in rats. *Pediatr Res* 2005;58:971-5.
36. Wright DH, Abran D, Bhattacharya M, et al. Prostanoid receptors: ontogeny and implications in vascular physiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;281:R1343-60.
37. Baragatti B, Brizzi F, Ackerley C, Barogi S, Ballou LR, Coceani F. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the mouse ductus arteriosus: individual activity and functional coupling with nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 2003;139:1505-15.

38. Loftin CD, Tiano HF, Langenbach R. Phenotypes of the COX-deficient mice indicate physiological and pathophysiological roles for COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68-69:177-85.
39. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-5.
40. Ikeda E, Achen MG, Breier G, Risau W. Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem* 1995;270:19761-6.
41. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992;359:843-5.
42. Plate KH, Warnke PC. Vascular endothelial growth factor. *J Neurooncol* 1997;35:365-72.
43. Persico MG, Vincenti V, DiPalma T. Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (PIGF). *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;237:31-40.
44. Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, et al. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:2576-81.
45. Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, et al. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* 1996;122:3829-37.
46. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:9267-71.
47. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991;266:11947-54.
48. Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 2001;114:853-65.
49. Bates DO, Cui TG, Doughty JM, et al. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2002;62:4123-31.
50. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-76.
51. Carmeliet P, Collen D. Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;237:133-58.
52. Muller PR, James AH, Murtha AP, Yonish B, Jamison MG, Dekker G. Circulating angiogenic factors and abnormal uterine artery Doppler velocimetry in the second trimester. *Hypertens Pregnancy* 2006;25:183-92.
53. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13:9-22.
54. Kroll J, Waltenberger J. A novel function of VEGF receptor-2 (KDR): rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;265:636-9.
55. Ferrara N, Gerber HP. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol* 2001;106:148-56.
56. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996;87:3336-43.

57. Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 1994;269:25646-54.
58. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 2005;109:227-41.
59. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992;267:26031-7.
60. Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A, Satow Y. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res* 1995;55:5687-92.
61. Seidner SR, Chen YQ, Oprysko PR, et al. 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.
62. Clyman RI, Seidner SR, Kajino H, et al. VEGF regulates remodeling during permanent anatomic closure of the ductus arteriosus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;282:R199-206.
63. Beharry KD, Modanlou HD, Hasan J, et al. Comparative effects of early postnatal ibuprofen and indomethacin on VEGF, IGF-I, and GH during rat ocular development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:3036-43.
64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. 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.
68. Thebaud B, Wu XC, Kajimoto H, et al. Developmental absence of the O₂ sensitivity of L-type calcium channels in preterm ductus arteriosus smooth muscle cells impairs O₂ constriction contributing to patent ductus arteriosus. *Pediatr Res* 2008;63:176-81.
69. Momma K, Toyono M. The role of nitric oxide in dilating the fetal ductus arteriosus in rats. *Pediatr Res* 1999;46:311-5.
70. Clyman RI. Ibuprofen and patent ductus arteriosus. *N Engl J Med* 2000;343:728-30.
71. Liu H, Manganiello V, Waleh N, Clyman RI. Expression, activity, and function of phosphodiesterases in the mature and immature ductus arteriosus. *Pediatr Res* 2008;64:477-81.
72. Levin M, McCurnin D, Seidner SR, et al. 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.
73. 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.
74. Dudell GG, Gersony WM. Patent ductus arteriosus in neonates with severe respiratory disease. *J Pediatr* 1984;104:915-20.

75. Cotton RB, Stahlman MT, Bender HW, Graham TP, Catterton WZ, Kovar I. Randomized trial of early closure of symptomatic patent ductus arteriosus in small preterm infants. *J Pediatr* 1978;93:647-51.
76. van de Bor M, Verloove-Vanhorick SP, Brand R, Ruys JH. Patent ductus arteriosus in a cohort of 1338 preterm infants: a collaborative study. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1988;2:328-36.
77. Lagercrantz H, Katz-Salamon M, Forssberg H. The Stockholm Neonatal Project: neonatal mortality and morbidity at the Children's Centre, Karolinska Hospital. *Acta Paediatr Suppl* 1997;419:11-5.
78. 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.
79. Wyllie J. Treatment of patent ductus arteriosus. *Semin Neonatol* 2003;8:425-32.
80. Costeloe K, Hennessy E, Gibson AT, Marlow N, Wilkinson AR. The EPICure study: outcomes to discharge from hospital for infants born at the threshold of viability. *Pediatrics* 2000;106:659-71.
81. Lee SK, McMillan DD, Ohlsson A, et al. Variations in practice and outcomes in the Canadian NICU network: 1996-1997. *Pediatrics* 2000;106:1070-9.
82. Fanaroff AA, Stoll BJ, Wright LL, et al. Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196:147 e1-8.
83. Noori S, McCoy M, Friedlich P, et al. Failure of ductus arteriosus closure is associated with increased mortality in preterm infants. *Pediatrics* 2009;123:e138-44.
84. Rojas MA, Gonzalez A, Bancalari E, Claire N, Poole C, Silva-Neto G. Changing trends in the epidemiology and pathogenesis of neonatal chronic lung disease. *J Pediatr* 1995;126:605-10.
85. Cassady G, Crouse DT, Kirklin JW, 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.
86. Evans N, Kluckow M. Early ductal shunting and intraventricular haemorrhage in ventilated preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1996;75:F183-6.
87. Kluckow M, Evans N. Low superior vena cava flow and intraventricular haemorrhage in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000;82:F188-94.
88. 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.
89. Fowlie PW, Davis PG. Prophylactic intravenous indomethacin for preventing mortality and morbidity in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2002:CD000174.
90. Fowlie PW, Davis PG. Prophylactic indomethacin for preterm infants: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88:F464-6.
91. Brooks JM, Travadi JN, Patole SK, Doherty DA, Simmer K. Is surgical ligation of patent ductus arteriosus necessary? The Western Australian experience of conservative management. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2005;90:F235-9.
92. Berkowitz GS, Papiernik E. Epidemiology of preterm birth. *Epidemiol Rev* 1993;15:414-43.
93. Grunau RE, Whitfield MF, Davis C. Pattern of learning disabilities in children with extremely low birth weight and broadly average intelligence. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2002;156:615-20.
94. Tommiska V, Heinonen K, Kero P, et al. A national two year follow up study of extremely low birthweight infants born in 1996-1997. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88:F29-35.

95. Hack M, Fanaroff AA. Outcomes of children of extremely low birthweight and gestational age in the 1990's. *Early Hum Dev* 1999;53:193-218.
96. Hack M, Wilson-Costello D, Friedman H, Taylor GH, Schluchter M, Fanaroff AA. Neurodevelopment and predictors of outcomes of children with birth weights of less than 1000 g: 1992-1995. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2000;154:725-31.
97. Kirpalani H, Asztalos E. Neonatal brain injury. *Curr Opin Pediatr* 2001;13:227-33.
98. Taglialatela G, Perez-Polo JR, Rassin DK. Induction of apoptosis in the CNS during development by the combination of hyperoxia and inhibition of glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* 1998;25:936-42.
99. Hoehn T, Felderhoff-Mueser U, Buhner C. The ambiguous role of nitric oxide in the developing brain. *J Pediatr* 2003;142:215-6; author reply 6-7.
100. Felderhoff-Mueser U, Bittigau P, Sifringer M, et al. Oxygen causes cell death in the developing brain. *Neurobiol Dis* 2004;17:273-82.
101. Perlman JM. White matter injury in the preterm infant: an important determination of abnormal neurodevelopment outcome. *Early Hum Dev* 1998;53:99-120.
102. 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.
103. Schmidt B, Asztalos EV, Roberts RS, Robertson CM, Sauve RS, Whitfield MF. Impact of bronchopulmonary dysplasia, brain injury, and severe retinopathy on the outcome of extremely low-birth-weight infants at 18 months: results from the trial of indomethacin prophylaxis in preterms. *JAMA* 2003;289:1124-9.
104. Felderhoff-Mueser U, Buhner C. Clinical measures to preserve cerebral integrity in preterm infants. *Early Hum Dev* 2005;81:237-44.
105. Benesova O, Tejkalova H, Kristofikova Z, Husek P, Nedvidkova J, Yamamotova A. Brain maldevelopment and neurobehavioural deviations in adult rats treated neonatally with indomethacin. *Eur Neuropsychopharmacol* 2001;11:367-73.
106. Schmidt B, Davis P, Moddemann D, et al. Long-term effects of indomethacin prophylaxis in extremely-low-birth-weight infants. *N Engl J Med* 2001;344:1966-72.
107. Edwards AD, Wyatt JS, Richardson C, et al. Effects of indomethacin on cerebral haemodynamics in very preterm infants. *Lancet* 1990;335:1491-5.
108. Leffler CW, Busija DW, Fletcher AM, Beasley DG, Hessler JR, Green RS. Effects of indomethacin upon cerebral hemodynamics of newborn pigs. *Pediatr Res* 1985;19:1160-4.
109. Leffler CW, Busija DW, Beasley DG, Fletcher AM, Green RS. Effects of indomethacin on cardiac output distribution in normal and asphyxiated piglets. *Prostaglandins* 1986;31:183-90.
110. McCormick DC, Edwards AD, Brown GC, et al. Effect of indomethacin on cerebral oxidized cytochrome oxidase in preterm infants. *Pediatr Res* 1993;33:603-8.
111. Mosca F, Bray M, Lattanzio M, Fumagalli M, Tosetto C. Comparative evaluation of the effects of indomethacin and ibuprofen on cerebral perfusion and oxygenation in preterm infants with patent ductus arteriosus. *J Pediatr* 1997;131:549-54.
112. Patel J, Roberts I, Azzopardi D, Hamilton P, Edwards AD. Randomized double-blind controlled trial comparing the effects of ibuprofen with indomethacin on cerebral hemodynamics in preterm infants with patent ductus arteriosus. *Pediatr Res* 2000;47:36-42.
113. Chemtob S, Beharry K, Rex J, Varma DR, Aranda JV. Prostanoids determine the range of cerebral blood flow autoregulation of newborn piglets. *Stroke* 1990;21:777-84.

114. Chemtob S, Beharry K, Barna T, Varma DR, Aranda JV. Differences in the effects in the newborn piglet of various nonsteroidal antiinflammatory drugs on cerebral blood flow but not on cerebrovascular prostaglandins. *Pediatr Res* 1991;30:106-11.
115. Evans N. Diagnosis of patent ductus arteriosus in the preterm newborn. *Arch Dis Child* 1993;68:58-61.
116. 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.
117. Kluckow M, Evans N. Early echocardiographic prediction of symptomatic patent ductus arteriosus in preterm infants undergoing mechanical ventilation. *J Pediatr* 1995;127:774-9.
118. Kluckow M, Evans N. Ductal shunting, high pulmonary blood flow, and pulmonary hemorrhage. *J Pediatr* 2000;137:68-72.
119. 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.
120. 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.
121. Mellander M, Larsson LE, Ekstrom-Jodal B, Sabel KG. Prediction of symptomatic patent ductus arteriosus in preterm infants using Doppler and M-mode echocardiography. *Acta Paediatr Scand* 1987;76:553-9.
122. Johnson GL, Breart GL, Gewitz MH, et al. Echocardiographic characteristics of premature infants with patent ductus arteriosus. *Pediatrics* 1983;72:864-71.
123. Schmitz L, Stiller B, Koch H, Koehne P, Lange P. Diastolic left ventricular function in preterm infants with a patent ductus arteriosus: a serial Doppler echocardiography study. *Early Hum Dev* 2004;76:91-100.
124. Schmitz L, Stiller B, Pees C, Koch H, Xanthopoulos A, Lange P. Doppler-derived parameters of diastolic left ventricular function in preterm infants with a birth weight <1500 g: reference values and differences to term infants. *Early Hum Dev* 2004;76:101-14.
125. Skelton R, Evans N, Smythe J. A blinded comparison of clinical and echocardiographic evaluation of the preterm infant for patent ductus arteriosus. *J Paediatr Child Health* 1994;30:406-11.
126. Vanderheyden M, Bartunek J, Goethals M. Brain and other natriuretic peptides: molecular aspects. *Eur J Heart Fail* 2004;6:261-8.
127. Wu AH, Smith A, Wiecek S, et al. Biological variation for N-terminal pro- and B-type natriuretic peptides and implications for therapeutic monitoring of patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* 2003;92:628-31.
128. Mir TS, Marohn S, Laer S, Eiselt M, Grollmus O, Weil J. Plasma concentrations of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in control children from the neonatal to adolescent period and in children with congestive heart failure. *Pediatrics* 2002;110:e76.
129. Bar-Oz B, Lev-Sagie A, Arad I, Salpeter L, Nir A. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentrations in mothers just before delivery, in cord blood, and in newborns. *Clin Chem* 2005;51:926-7.
130. Koch A, Singer H. Normal values of B type natriuretic peptide in infants, children, and adolescents. *Heart* 2003;89:875-8.
131. El-Khuffash AF, Molloy EJ. Influence of a patent ductus arteriosus on cardiac troponin T levels in preterm infants. *J Pediatr* 2008;153:350-3.

132. 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.
133. Heymann MA, Rudolph AM, Silverman NH. Closure of the ductus arteriosus in premature infants by inhibition of prostaglandin synthesis. *N Engl J Med* 1976;295:530-3.
134. Shaffer CL, Gal P, Ransom JL, et al. Effect of age and birth weight on indomethacin pharmacodynamics in neonates treated for patent ductus arteriosus. *Crit Care Med* 2002;30:343-8.
135. Thomas RL, Parker GC, Van Overmeire B, Aranda JV. A meta-analysis of ibuprofen versus indomethacin for closure of patent ductus arteriosus. *Eur J Pediatr* 2005;164:135-40.
136. Morris JL, Rosen DA, Rosen KR. Nonsteroidal anti-inflammatory agents in neonates. *Paediatr Drugs* 2003;5:385-405.
137. Rennie JM, Doyle J, Cooke RW. Early administration of indomethacin to preterm infants. *Arch Dis Child* 1986;61:233-8.
138. Betkerur MV, Yeh TF, Miller K, Glasser RJ, Pildes RS. Indomethacin and its effect on renal function and urinary kallikrein excretion in premature infants with patent ductus arteriosus. *Pediatrics* 1981;68:99-102.
139. 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.
140. Grosfeld JL, Chaet M, Molinari F, et al. Increased risk of necrotizing enterocolitis in premature infants with patent ductus arteriosus treated with indomethacin. *Ann Surg* 1996;224:350-5; discussion 5-7.
141. Fujii AM, Brown E, Mirochnick M, O'Brien S, Kaufman G. Neonatal necrotizing enterocolitis with intestinal perforation in extremely premature infants receiving early indomethacin treatment for patent ductus arteriosus. *J Perinatol* 2002;22:535-40.
142. Ballabh P, Xu H, Hu F, et al. Angiogenic inhibition reduces germinal matrix hemorrhage. *Nat Med* 2007;13:477-85.
143. Cooke L, Steer P, Woodgate P. Indomethacin for asymptomatic patent ductus arteriosus in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2003:CD003745.
144. Evans N. Current controversies in the diagnosis and treatment of patent ductus arteriosus in preterm infants. *Adv Neonatal Care* 2003;3:168-77.
145. Pezzati M, Vangi V, Biagiotti R, Bertini G, Cianciulli D, Rubaltelli FF. Effects of indomethacin and ibuprofen on mesenteric and renal blood flow in preterm infants with patent ductus arteriosus. *J Pediatr* 1999;135:733-8.
146. Pellicer A, Aparicio M, Cabanas F, Valverde E, Quero J, Stiris TA. Effect of the cyclooxygenase blocker ibuprofen on cerebral blood volume and cerebral blood flow during normocarbica and hypercarbia in newborn piglets. *Acta Paediatr* 1999;88:82-8.
147. Kaplan BH, Nevitt MP, Pach JM, Herman DC. Aseptic meningitis and iridocyclitis related to ibuprofen. *Am J Ophthalmol* 1994;117:119-20.
148. Grosfeld JL, Kamman K, Gross K, et al. Comparative effects of indomethacin, prostaglandin E1, and ibuprofen on bowel ischemia. *J Pediatr Surg* 1983;18:738-42.
149. 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.
150. Varvarigou A, Bardin CL, Beharry K, Chemtob S, Papageorgiou A, Aranda JV. Early ibuprofen administration to prevent patent ductus arteriosus in premature newborn infants. *JAMA* 1996;275:539-44.

151. Adams SS, Bresloff P, Mason CG. Pharmacological differences between the optical isomers of ibuprofen: evidence for metabolic inversion of the (-)-isomer. *J Pharm Pharmacol* 1976;28:256-7.
152. Cheng H, Rogers JD, Demetriades JL, Holland SD, Seibold JR, Depuy E. Pharmacokinetics and bioinversion of ibuprofen enantiomers in humans. *Pharm Res* 1994;11:824-30.
153. Aranda JV, Varvarigou A, Beharry K, et al. Pharmacokinetics and protein binding of intravenous ibuprofen in the premature newborn infant. *Acta Paediatr* 1997;86:289-93.
154. Van Overmeire B, Touw D, Schepens PJ, Kearns GL, van den Anker JN. Ibuprofen pharmacokinetics in preterm infants with patent ductus arteriosus. *Clin Pharmacol Ther* 2001;70:336-43.
155. Gregoire N, Gualano V, Geneteau A, et al. Population pharmacokinetics of ibuprofen enantiomers in very premature neonates. *J Clin Pharmacol* 2004;44:1114-24.
156. Desfrère L. Effect of intravenous ibuprofen on bilirubin binding in preterm infants: interim data. *Eur J Pediatr* 2006;165(Suppl 1):385.
157. Besunder JB, Reed MD, Blumer JL. Principles of drug biodisposition in the neonate. A critical evaluation of the pharmacokinetic-pharmacodynamic interface (Part I). *Clin Pharmacokinet* 1988;14:189-216.
158. Gross RE. Surgical Management of the Patent Ductus Arteriosus: With Summary of Four Surgically Treated Cases. *Ann Surg* 1939;110:321-56.
159. Little DC, Pratt TC, Blalock SE, Krauss DR, Cooney DR, Custer MD. Patent ductus arteriosus in micropreemies and full-term infants: the relative merits of surgical ligation versus indomethacin treatment. *J Pediatr Surg* 2003;38:492-6.
160. Su PH, Chen JY, Su CM, Huang TC, Lee HS. Comparison of ibuprofen and indomethacin therapy for patent ductus arteriosus in preterm infants. *Pediatr Int* 2003;45:665-70.
161. Chorne N, Jegatheesan P, Lin E, Shi R, Clyman RI. Risk factors for persistent ductus arteriosus patency during indomethacin treatment. *J Pediatr* 2007;151:629-34.
162. Desfrère L, Zohar S, Morville P, et al. Dose-finding study of ibuprofen in patent ductus arteriosus using the continual reassessment method. *J Clin Pharm Ther* 2005;30:121-32.
163. Narayanan M, Cooper B, Weiss H, Clyman RI. Prophylactic indomethacin: factors determining permanent ductus arteriosus closure. *J Pediatr* 2000;136:330-7.
164. Vanamo K, Berg E, Kokki H, Tikanoja T. Video-assisted thoracoscopic versus open surgery for persistent ductus arteriosus. *J Pediatr Surg* 2006;41:1226-9.
165. Villa E, Vanden Eynden F, Le Bret E, Folliguet T, Laborde F. Paediatric video-assisted thoracoscopic clipping of patent ductus arteriosus: experience in more than 700 cases. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004;25:387-93.
166. Perez CA, Bustorff-Silva JM, Villasenor E, Fonkalsrud EW, Atkinson JB. Surgical ligation of patent ductus arteriosus in very low birth weight infants: is it safe? *Am Surg* 1998;64:1007-9.
167. Zbar RI, Chen AH, Behrendt DM, Bell EF, Smith RJ. Incidence of vocal fold paralysis in infants undergoing ligation of patent ductus arteriosus. *Ann Thorac Surg* 1996;61:814-6.
168. Clement WA, El-Hakim H, Phillipos EZ, Cote JJ. Unilateral vocal cord paralysis following patent ductus arteriosus ligation in extremely low-birth-weight infants. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;134:28-33.
169. Malcolm WF, Hornik C, Evans A, Smith PB, Cotten CM. Vocal fold paralysis following surgical ductal closure in extremely low birth weight infants: a case series of feeding and respiratory complications. *J Perinatol* 2008;28:782-5.

170. Benjamin JR, Smith PB, Cotten CM, Jaggars J, Goldstein RF, Malcolm WF. Long-term morbidities associated with vocal cord paralysis after surgical closure of a patent ductus arteriosus in extremely low birth weight infants. *J Perinatol* 2010;30:408-13.
171. Clyman R, Cassady G, Kirklin JK, Collins M, Philips JB, 3rd. The role of patent ductus arteriosus ligation in bronchopulmonary dysplasia: reexamining a randomized controlled trial. *J Pediatr* 2009;154:873-6.
172. 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.
173. 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.
174. Brewer GJ. Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. *J Neurosci Res* 1995;42:674-83.
175. Bittigau P, Sifringer M, Pohl D, et al. Apoptotic neurodegeneration following trauma is markedly enhanced in the immature brain. *Ann Neurol* 1999;45:724-35.
176. Back SA, Han BH, Luo NL, et al. Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia. *J Neurosci* 2002;22:455-63.
177. Toyoshima K, Momma K, Nakanishi T. In vivo dilatation of the ductus arteriosus induced by furosemide in the rat. *Pediatr Res*;67:173-6.
178. Fay FS. Guinea pig ductus arteriosus. I. Cellular and metabolic basis for oxygen sensitivity. *Am J Physiol* 1971;221:470-9.
179. Giuriato L, Scatena M, Chiavegato A, Guidolin D, Pauletto P, Sartore S. Rabbit ductus arteriosus during development: anatomical structure and smooth muscle cell composition. *Anat Rec* 1993;235:95-110.
180. Malone TA, Stonestreet BS, Goddard M, Sicard R, Werner JC, Oh W. Atrial natriuretic peptide in newborn piglets with a patent ductus arteriosus. *Dev Pharmacol Ther* 1992;19:155-60.
181. Takahashi Y, Roman C, Chemtob S, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitors constrict the fetal lamb ductus arteriosus both in vitro and in vivo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;278:R1496-505.
182. van Landeghem FK, Felderhoff-Mueser U, Moysich A, et al. Fas (CD95/Apo-1)/Fas ligand expression in neonates with pontosubicular neuron necrosis. *Pediatr Res* 2002;51:129-35.
183. Hack M, Friedman H, Fanaroff AA. Outcomes of extremely low birth weight infants. *Pediatrics* 1996;98:931-7.
184. Hack M, Klein N. Young adult attainments of preterm infants. *JAMA* 2006;295:695-6.
185. Tyson JE, Parikh NA, Langer J, Green C, Higgins RD. Intensive care for extreme prematurity--moving beyond gestational age. *N Engl J Med* 2008;358:1672-81.
186. Van Overmeire B, Allegaert K, Casaer A, et al. Prophylactic ibuprofen in premature infants: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2004;364:1945-9.
187. Bancalari E, Claure N, Gonzalez A. Patent ductus arteriosus and respiratory outcome in premature infants. *Biol Neonate* 2005;88:192-201.
188. Leonhardt A, Glaser A, Wegmann M, Schranz D, Seyberth H, Nusing R. Expression of prostanoid receptors in human ductus arteriosus. *Br J Pharmacol* 2003;138:655-9.
189. Vaughan CJ, Basson CT. Molecular determinants of atrial and ventricular septal defects and patent ductus arteriosus. *Am J Med Genet* 2000;97:304-9.

190. Koki A, Khan NK, Woerner BM, et al. Cyclooxygenase-2 in human pathological disease. *Adv Exp Med Biol* 2002;507:177-84.
191. Smith GC. The pharmacology of the ductus arteriosus. *Pharmacol Rev* 1998;50:35-58.
192. Clyman RI. Ductus arteriosus: current theories of prenatal and postnatal regulation. *Semin Perinatol* 1987;11:64-71.
193. Coceani F, Olley PM. The control of cardiovascular shunts in the fetal and perinatal period. *Can J Physiol Pharmacol* 1988;66:1129-34.
194. Kajino H, Chen YQ, Seidner SR, et al. Factors that increase the contractile tone of the ductus arteriosus also regulate its anatomic remodeling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;281:R291-301.
195. Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, et al. Prostaglandin E2-activated Epac promotes neointimal formation of the rat ductus arteriosus by a process distinct from that of cAMP-dependent protein kinase A. *J Biol Chem* 2008;283:28702-9.
196. Bouayad A, Kajino H, Waleh N, et al. Characterization of PGE2 receptors in fetal and newborn lamb ductus arteriosus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H2342-9.
197. Guerguerian AM, Hardy P, Bhattacharya M, et al. Expression of cyclooxygenases in ductus arteriosus of fetal and newborn pigs. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:1618-26.
198. Desligneres S, Larroche JC. Ductus arteriosus. I. Anatomical and histological study of its development during the second half of gestation and its closure after birth. II. Histological study of a few cases of patent ductus arteriosus in infancy. *Biol Neonate* 1970;16:278-96.
199. Coceani F, Ackerley C, Seidlitz E, Kelsey L. Function of cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 in the ductus arteriosus from foetal lamb: differential development and change by oxygen and endotoxin. *Br J Pharmacol* 2001;132:241-51.
200. Nguyen M, Camenisch T, Snouwaert JN, et al. The prostaglandin receptor EP4 triggers remodelling of the cardiovascular system at birth. *Nature* 1997;390:78-81.
201. Segi E, Sugimoto Y, Yamasaki A, et al. Patent ductus arteriosus and neonatal death in prostaglandin receptor EP4-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;246:7-12.
202. Loftin CD, Trivedi DB, Tiano HF, et al. Failure of ductus arteriosus closure and remodeling in neonatal mice deficient in cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:1059-64.
203. Bhattacharya M, Asselin P, Hardy P, et al. Developmental changes in prostaglandin E(2) receptor subtypes in porcine ductus arteriosus. Possible contribution in altered responsiveness to prostaglandin E(2). *Circulation* 1999;100:1751-6.
204. Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, et al. Chronic activation of the prostaglandin receptor EP4 promotes hyaluronan-mediated neointimal formation in the ductus arteriosus. *J Clin Invest* 2006;116:3026-34.
205. Hammerman C, Glaser J, Kaplan M, Schimmel MS, Ferber B, Eidelman AI. Indomethacin tocolysis increases postnatal patent ductus arteriosus severity. *Pediatrics* 1998;102:E56.
206. Soraisham AS, Dagleish S, Singhal N. Antenatal indomethacin tocolysis is associated with an increased need for surgical ligation of patent ductus arteriosus in preterm infants. *J Obstet Gynaecol Can* 2010;32:435-42.
207. Waleh N, Kajino H, Marrache AM, et al. Prostaglandin E2--mediated relaxation of the ductus arteriosus: effects of gestational age on g protein-coupled receptor expression, signaling, and vasomotor control. *Circulation* 2004;110:2326-32.
208. Dumont DJ, Fong GH, Puri MC, Gradwohl G, Alitalo K, Breitman ML. Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Dev Dyn* 1995;203:80-92.

209. Cebe-Suarez S, Zehnder-Fjallman A, Ballmer-Hofer K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:601-15.
210. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995;376:66-70.
211. Sakurai Y, Ohgimoto K, Kataoka Y, Yoshida N, Shibuya M. Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:1076-81.
212. Shah NA, Hills NK, Waleh N, et al. Relationship between Circulating Platelet Counts and Ductus Arteriosus Patency after Indomethacin Treatment. *J Pediatr* 2011;158:919-23 e2.
213. Fujioka K, Morioka I, Miwa A, et al. Does thrombocytopenia contribute to patent ductus arteriosus? *Nat Med* 2011;17:29-30; author reply -1.
214. Clyman R, Chemtob S. Vessel remodeling in the newborn: platelets fill the gap. *Nat Med* 2011;16:33-5.
215. Yokoyama U, Minamisawa S, Ishikawa Y. Regulation of vascular tone and remodeling of the ductus arteriosus. *J Smooth Muscle Res* 2010;46:77-87.
216. Weber SC, Gratopp A, Akanbi S, et al. Isolation and Culture of Fibroblasts, Vascular Smooth Muscle and Endothelial Cells from the Fetal Rat Ductus Arteriosus. *Pediatr Res* 2011.
217. Costa M, Barogi S, Socci ND, et al. Gene expression in ductus arteriosus and aorta: comparison of birth and oxygen effects. *Physiol Genomics* 2006;25:250-62.
218. Coceani F, Olley PM, Bodach E. Lamb ductus arteriosus: effect of prostaglandin synthesis inhibitors on the muscle tone and the response to prostaglandin E2. *Prostaglandins* 1975;9:299-308.
219. Cooper-Peel C, Brodersen R, Robertson A. Does ibuprofen affect bilirubin-albumin binding in newborn infant serum? *Pharmacol Toxicol* 1996;79:297-9.
220. Ahlfors CE. Effect of ibuprofen on bilirubin-albumin binding. *J Pediatr* 2004;144:386-8.
221. Ambat MT, Ostrea EM, Jr., Aranda JV. Effect of ibuprofen L-lysinate on bilirubin binding to albumin as measured by saturation index and horseradish peroxidase assays. *J Perinatol* 2008;28:287-90.
222. Soligard HT, Nilsen OG, Bratliid D. Displacement of bilirubin from albumin by ibuprofen in vitro. *Pediatr Res* 2010;67:614-8.
223. Hanko E, Hansen TW, Almaas R, Paulsen R, Rootwelt T. Synergistic protection of a general caspase inhibitor and MK-801 in bilirubin-induced cell death in human NT2-N neurons. *Pediatr Res* 2006;59:72-7.
224. Silva RF, Rodrigues CM, Brites D. Rat cultured neuronal and glial cells respond differently to toxicity of unconjugated bilirubin. *Pediatr Res* 2002;51:535-41.
225. Hanko E, Hansen TW, Almaas R, Lindstad J, Rootwelt T. Bilirubin induces apoptosis and necrosis in human NT2-N neurons. *Pediatr Res* 2005;57:179-84.
226. McDonald JW, Shapiro SM, Silverstein FS, Johnston MV. Role of glutamate receptor-mediated excitotoxicity in bilirubin-induced brain injury in the Gunn rat model. *Exp Neurol* 1998;150:21-9.
227. Hoffman DJ, Zanelli SA, Kubin J, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. The in vivo effect of bilirubin on the N-methyl-D-aspartate receptor/ion channel complex in the brains of newborn piglets. *Pediatr Res* 1996;40:804-8.
228. Grojean S, Koziel V, Vert P, Daval JL. Bilirubin induces apoptosis via activation of NMDA receptors in developing rat brain neurons. *Exp Neurol* 2000;166:334-41.
229. Elsisi NS, Darling-Reed S, Lee EY, Oriaku ET, Soliman KF. Ibuprofen and apigenin induce apoptosis and cell cycle arrest in activated microglia. *Neurosci Lett* 2005;375:91-6.

230. Park EM, Cho BP, Volpe BT, Cruz MO, Joh TH, Cho S. Ibuprofen protects ischemia-induced neuronal injury via up-regulating interleukin-1 receptor antagonist expression. *Neuroscience* 2005;132:625-31.
231. Iwata R, Kitagawa K, Zhang NY, Wu B, Inagaki C. Non-steroidal anti-inflammatory drugs protect amyloid beta protein-induced increase in the intracellular Ca^{2+} concentration in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 2004;367:156-9.
232. Pender MP, Rist MJ. Apoptosis of inflammatory cells in immune control of the nervous system: role of glia. *Glia* 2001;36:137-44.
233. Menzel JE, Kolarz G. Modulation of nitric oxide synthase activity by ibuprofen. *Inflammation* 1997;21:451-61.
234. Calligaris SD, Bellarosa C, Giraudi P, Wennberg RP, Ostrow JD, Tiribelli C. Cytotoxicity is predicted by unbound and not total bilirubin concentration. *Pediatr Res* 2007;62:576-80.
235. Ostrow JD, Pascolo L, Tiribelli C. Reassessment of the unbound concentrations of unconjugated bilirubin in relation to neurotoxicity in vitro. *Pediatr Res* 2003;54:98-104.
236. Evans N, Iyer P. Longitudinal changes in the diameter of the ductus arteriosus in ventilated preterm infants: correlation with respiratory outcomes. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1995;72:F156-61.
237. Choi BM, Lee KH, Eun BL, et al. Utility of rapid B-type natriuretic peptide assay for diagnosis of symptomatic patent ductus arteriosus in preterm infants. *Pediatrics* 2005;115:e255-61.
238. Nuntnarumit P, Khositseth A, Thanomsingh P. N-terminal probrain natriuretic peptide and patent ductus arteriosus in preterm infants. *J Perinatol* 2009;29:137-42.
239. Farombi-Oghuvbu I, Matthews T, Mayne PD, Guerin H, Corcoran JD. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide: a measure of significant patent ductus arteriosus. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2008;93:F257-60.
240. Flynn PA, da Graca RL, Auld PA, Nesin M, Kleinman CS. The use of a bedside assay for plasma B-type natriuretic peptide as a biomarker in the management of patent ductus arteriosus in premature neonates. *J Pediatr* 2005;147:38-42.
241. Sanjeev S, Pettersen M, Lua J, Thomas R, Shankaran S, L'Ecuyer T. Role of plasma B-type natriuretic peptide in screening for hemodynamically significant patent ductus arteriosus in preterm neonates. *J Perinatol* 2005;25:709-13.
242. Attridge JT, Kaufman DA, Lim DS. B-type natriuretic peptide concentrations to guide treatment of patent ductus arteriosus. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2009;94:F178-82.
243. McNamara PJ, Sehgal A. Towards rational management of the patent ductus arteriosus: the need for disease staging. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2007;92:F424-7.
244. Kluckow M, Evans N. Superior vena cava flow in newborn infants: a novel marker of systemic blood flow. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000;82:F182-7.
245. El Hajjar M, Vaksman G, Rakza T, Kongolo G, Storme L. Severity of the ductal shunt: a comparison of different markers. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2005;90:F419-22.
246. Gournay V, Savagner C, Thiriez G, Kuster A, Roze JC. Pulmonary hypertension after ibuprofen prophylaxis in very preterm infants. *Lancet* 2002;359:1486-8.
247. Gournay V, Roze JC, Kuster A, et al. Prophylactic ibuprofen versus placebo in very premature infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2004;364:1939-44.
248. Keller RL, Clyman RI. Persistent Doppler flow predicts lack of response to multiple courses of indomethacin in premature infants with recurrent patent ductus arteriosus. *Pediatrics* 2003;112:583-7.

249. 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.
250. Dani C, Bertini G, Corsini I, et al. The fate of ductus arteriosus in infants at 23-27 weeks of gestation: from spontaneous closure to ibuprofen resistance. *Acta Paediatr* 2008;97:1176-80.
251. Carmo KB, Evans N, Paradisi M. Duration of indomethacin treatment of the preterm patent ductus arteriosus as directed by echocardiography. *J Pediatr* 2009;155:819-22 e1.
252. Gregoire N, Desfrere L, Roze JC, Kibleur Y, Koehne P. Population pharmacokinetic analysis of Ibuprofen enantiomers in preterm newborn infants. *J Clin Pharmacol* 2008;48:1460-8.
253. Hirt D, Van Overmeire B, Treluyer JM, et al. 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.
254. Brodersen R, Ebbesen F. Bilirubin-displacing effect of ampicillin, indomethacin, chlorpromazine, gentamicin, and parabens in vitro and in newborn infants. *J Pharm Sci* 1983;72:248-53.
255. Bhutani VK, Johnson LH, Shapiro SM. Kernicterus in sick and preterm infants (1999-2002): a need for an effective preventive approach. *Semin Perinatol* 2004;28:319-25.
256. Okumura A, Kidokoro H, Shoji H, et al. Kernicterus in preterm infants. *Pediatrics* 2009;123:e1052-8.
257. Oh W, Tyson JE, Fanaroff AA, et al. Association between peak serum bilirubin and neurodevelopmental outcomes in extremely low birth weight infants. *Pediatrics* 2003;112:773-9.
258. Berns M, Toennesen M, Koehne P, Altmann R, Obladen M. Ibuprofen augments bilirubin toxicity in rat cortical neuronal culture. *Pediatr Res* 2009;65:392-6.
259. Maisels MJ, Watchko JF. Treatment of jaundice in low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88:F459-63.
260. Brandt I, Sticker E. Griffiths Entwicklungsskalen (GES) zur Beurteilung der Entwicklung in den ersten beiden Lebensjahren. Beltz Test-GmbH, Göttingen 2001;2. Aufl.
261. Bayley N. Bayley scales of infant development (Bsid-II). Pearson Psychological Corporation, Sidney 1999;3rd edn.
262. Beail N. A comparative study of profoundly multiply handicapped children's scores on the Bayley and the Griffiths developmental scales. *Child Care Health Dev* 1985;11:31-6.
263. Ramsay M, Fitzhardinge PM. A comparative study of two developmental scales: the Bayley and the Griffiths. *Early Hum Dev* 1977;1:151-7.
264. Wennberg RP, Ahlfors CE, Bhutani VK, Johnson LH, Shapiro SM. Toward understanding kernicterus: a challenge to improve the management of jaundiced newborns. *Pediatrics* 2006;117:474-85.
265. Watchko JF. Kernicterus and the molecular mechanisms of bilirubin-induced CNS injury in newborns. *Neuromolecular Med* 2006;8:513-29.
266. Ahlfors CE, Amin SB, Parker AE. Unbound bilirubin predicts abnormal automated auditory brainstem response in a diverse newborn population. *J Perinatol* 2009;29:305-9.
267. Aranda JV, Wong RJ, Thomas R, et al. Plasma unbound bilirubin in placebo and ibuprofen treated preterm neonates. *E-PAS* 2008:5844.9.
268. Desfrère L, Mourdie J, Barbier A, Moriette G. Effect of ibuprofen on unbound bilirubin levels in preterm infants. *E-PAS* 2007;61:8447.11.

269. Van Overmeire B. Ibuprofen, bilirubin and albumin: the importance of a balance. *Eur J Pediatr* 2006;165(Suppl 1):113-4.
270. Ahlfors CE. Unbound bilirubin associated with kernicterus: a historical approach. *J Pediatr* 2000;137:540-4.
271. Cashore WJ. Free bilirubin concentrations and bilirubin-binding affinity in term and preterm infants. *J Pediatr* 1980;96:521-7.
272. Bender GJ, Cashore WJ, Oh W. Ontogeny of bilirubin-binding capacity and the effect of clinical status in premature infants born at less than 1300 grams. *Pediatrics* 2007;120:1067-73.
273. Ebbesen F, Nyboe J. Postnatal changes in the ability of plasma albumin to bind bilirubin. *Acta Paediatr Scand* 1983;72:665-70.
274. Kuehl GE, Lampe JW, Potter JD, Bigler J. Glucuronidation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: identifying the enzymes responsible in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 2005;33:1027-35.
275. Zecca E, Romagnoli C, De Carolis MP, Costa S, Marra R, De Luca D. Does Ibuprofen increase neonatal hyperbilirubinemia? *Pediatrics* 2009;124:480-4.
276. Tin W, Wariyar U, Hey E. Changing prognosis for babies of less than 28 weeks' gestation in the north of England between 1983 and 1994. *Northern Neonatal Network. BMJ* 1997;314:107-11.
277. Horwood LJ, Mogridge N, Darlow BA. Cognitive, educational, and behavioural outcomes at 7 to 8 years in a national very low birthweight cohort. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1998;79:F12-20.
278. Emsley HC, Wardle SP, Sims DG, Chiswick ML, D'Souza SW. Increased survival and deteriorating developmental outcome in 23 to 25 week old gestation infants, 1990-4 compared with 1984-9. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1998;78:F99-104.
279. Bandstra ES, Montalvo BM, Goldberg RN, et al. Prophylactic indomethacin for prevention of intraventricular hemorrhage in premature infants. *Pediatrics* 1988;82:533-42.
280. Ment LR, Vohr B, Oh W, et al. Neurodevelopmental outcome at 36 months' corrected age of preterm infants in the Multicenter Indomethacin Intraventricular Hemorrhage Prevention Trial. *Pediatrics* 1996;98:714-8.
281. Ment LR, Vohr B, Allan W, et al. Outcome of children in the indomethacin intraventricular hemorrhage prevention trial. *Pediatrics* 2000;105:485-91.
282. Vohr BR, Allan WC, Westerveld M, et al. School-age outcomes of very low birth weight infants in the indomethacin intraventricular hemorrhage prevention trial. *Pediatrics* 2003;111:e340-6.
283. Ment LR, Vohr BR, Makuch RW, et al. Prevention of intraventricular hemorrhage by indomethacin in male preterm infants. *J Pediatr* 2004;145:832-4.
284. Monje ML, Toda H, Palmer TD. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 2003;302:1760-5.
285. Sperandio M, Beedgen B, Feneberg R, et al. 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.
286. Jegatheesan P, Ianus V, Buchh B, et al. Increased indomethacin dosing for persistent patent ductus arteriosus in preterm infants: a multicenter, randomized, controlled trial. *J Pediatr* 2008;153:183-9.
287. Buhner C, Grimmer I, Metze B, Obladen M. The CRIB (Clinical Risk Index for Babies) score and neurodevelopmental impairment at one year corrected age in very low birth weight infants. *Intensive Care Med* 2000;26:325-9.

288. Bhandari V, Zhou G, Bizzarro MJ, et al. Genetic contribution to patent ductus arteriosus in the premature newborn. *Pediatrics* 2009;123:669-73.
289. Dagle JM, Lepp NT, Cooper ME, et al. Determination of genetic predisposition to patent ductus arteriosus in preterm infants. *Pediatrics* 2009;123:1116-23.
290. Waleh N, Hodnick R, Jhaveri N, et al. Patterns of gene expression in the ductus arteriosus are related to environmental and genetic risk factors for persistent ductus patency. *Pediatr Res* 2010;68:292-7.
291. 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.

8. DANKSAGUNG

Diese Habilitationsschrift wäre nicht vollständig, ohne denjenigen Menschen zu danken, die diese Arbeit ermöglicht haben.

Mein tiefster Dank gebührt meiner Familie. Die Größe meiner Dankbarkeit lässt sich allerdings nur unzureichend in Worte fassen. Insbesondere meinem lieben Mann Dr. rer. nat. Christian Rosen danke ich von ganzem Herzen. Ohne seine Ermutigung, seine Toleranz, seine Geduld und Leidenschaft gäbe es diese Arbeit nicht. Meiner geliebten Mutter Ursula Sabine Koehne danke ich ganz herzlich für ihre liebevolle Unterstützung. Ohne ihre Herzenswärme, ihre Fürsorge und ihr immer offenes Ohr aber auch die nötige Großzügigkeit und Freiheit wäre mein beruflicher Werdegang nicht so zielstrebig verlaufen. In diesem Zusammenhang möchte ich auch meiner im Oktober 2010 verstorbenen Tante Frau Dr. med. Mathilde Yontá Käckell danken, die mir als erfolgreiche und forschende Oberärztin in der Kinder- und Jugendheilkunde der Universitäts-Kinderklinik Göttingen bei meiner Berufswahl ein Vorbild war. Meinen Schwiegereltern Christa und Klaus-Henning Rosen danke ich für ihre selbstverständliche, kurzfristige und unkomplizierte Unterstützung wann immer es von Nöten war. Auch unsere Kinderfrau und ehemalige Kinderkrankenschwester Frau Ursel Frank soll nicht unerwähnt bleiben. Sie hat unermüdlich geholfen, mir den nötigen zeitlichen Freiraum zu verschaffen, um diese Arbeit erfolgreich abschließen zu können und gleichzeitig meine Kinder Jonas und Johanna so liebevoll betreut, wie es niemand besser hätte tun können.

Großer Dank gilt meinem Chef und wissenschaftlichem Lehrer, Herrn Professor Dr. Christoph Bühner, dem Direktor der Klinik für Neonatologie der Charité, der mir ermöglichte, diese Arbeit zu schreiben und meinen wissenschaftlichen Werdegang motiviert und kontinuierlich unterstützt hat. Durch seinen Ideenreichtum gepaart mit Enthusiasmus für die Wissenschaft und zahlreiche interessante Diskussionen gab er den Anstoß zu so manchem Forschungsprojekt.

Besonderer Dank gilt meinem klinischen und wissenschaftlichen Lehrer, Herrn Professor Dr. Michael Obladen, dem ehemaligen Direktor der Klinik für Neonatologie am Campus Virchow Klinikum, der mich jahrelang gefördert hat. Er ermutigte mich, trotz der Herausforderungen und der Interessenkonflikte in einem klinischen Umfeld wissenschaftliche Fragestellungen aufzugreifen und diese ebenso strukturiert wie konsequent zu bearbeiten. Seinen Rat in schwierigen klinischen Situationen habe ich besonders geschätzt. Für seine Unterstützung bei der Durchführung zahlreicher wissenschaftlicher Projekte, der Mithilfe bei der Fertigstellung vieler Veröffentlichungen sowie der kritischen Durchsicht der vorliegenden Habilitationsschrift bin ich ihm sehr dankbar.

Besonders dankbar bin ich meinem langjährigen wissenschaftlichen Mentor und lieben Freund Prof. Dr. Mario Rüdiger. Seine innovativen Ideen haben mich oftmals inspiriert und sind zusammen mit der gemeinsamen Freude an der Forschung Grundlage einer fruchtbaren Zusammenarbeit. Seine große Fähigkeit zu motivieren und der gemeinsame Gedankenaustausch haben mir geholfen, auch schwierige Phasen in denen es nicht so recht vorwärts gehen wollte zu überwinden.

Mein Dank gilt außerdem meinem Doktorvater und menschlichem Vorbild Prof. Dr. Gert Kunkel und dem damaligen Betreuer meiner experimentellen Promotionsarbeit Prof. Dr. Kristof Graf, die meine ersten wissenschaftlichen Gehversuche unterstützt haben und es verstanden haben, meine Begeisterung für die Bearbeitung wissenschaftlicher Fragestellungen zu wecken.

Diese Arbeit hätte ohne die Nachwuchsförderung durch ein Rahel-Hirsch Habilitationsstipendium der Charité nicht entstehen können. Das Stipendium hat mir die Möglichkeit zum selbstständigen Arbeiten und Aufbau einer eigenen Arbeitsgruppe gegeben. Für das erfolgreiche Gelingen der vorliegenden Arbeit war die Unterstützung ebenso motivierter wie fleißiger Mitarbeiter und Doktoranden entscheidend, denen mein ganz besonderer und herzlicher Dank gilt: Dr. Sandra Akanbi, Dr. Alexander Gratopp, Dr. Dorothee Helfenstein, Dr. Cornelia Rheinländer, Dr. Sven Weber. Sie haben nicht nur einen Teil der Arbeit gemacht, sondern waren Mitstreiter beim Versuch, die Besonderheiten des Ductusverschlusses bei Frühgeborenen zu ergründen.

In besonderer Weise danke ich allen guten Seelen des neonatologischen und des nephrologischen Forschungslabores, die immer hilfreiche Ansprechpartner für mich waren und mich methodisch tatkräftig unterstützt haben: Boris Metze, Evelyn Strauss, PD Dr. Dietger Stibenz, Heidi Wilde und Barbara Mauder.

Meiner lieben Kollegin Frau Dr. Christiane Pees danke ich überaus für die Einführung in die Geheimnisse der Echokardiographie und die gemeinsame Durchführung der klinischen Studie IBU/GER/2003. Ich freue mich besonders, dass sich aus der langjährigen Zusammenarbeit mit Christiane eine dauerhafte Freundschaft entwickelt hat.

Diese Arbeit hätte nicht entstehen können ohne die fruchtbare und freundschaftliche Kooperation mit Professor Dr. Ursula Felderhoff-Müser, Direktorin der Klinik für Kinderheilkunde I des Universitätsklinikums Essen; PD Dr. Thomas Höhn, Leiter der Neonatologie und Pädiatrischen Intensivmedizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; Dr. Elisabeth Walch, Oberärztin im Sozialpädiatrischen Zentrum des CC17 am Virchow-Klinikum der Charité; Dr. Nanette Sarioglu, Leitung der Paidopathologie und Placentologie am Institut für Pathologie der Charité; Dr. Luc Desfrère, Klinik für

Neonatologie, Hôpital Louis Mourier, Colombes, Universität Paris, Frankreich.

Meinen Oberarztkolleginnen und –kollegen Dr. Monika Berns, Dr. Christoph Czernik, Dr. Dieter Hüseman, Dr. Andrea Loui und Dr. Anja Pohl-Schickinger, danke ich für die langjährige gute Zusammenarbeit.

Abschließend sei all denjenigen gedankt, die ich im voranstehenden Abschnitt nicht namentlich erwähnt habe.

9. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

gemäß § 4 Abs. 3 (k) der Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- der Bewerberin die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Datum

Unterschrift