

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie,  
Neonatologie und Kinderkardiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Ertan Mayatepek

Quantifizierung von S-100b, NSE und MBP  
im Urin Frühgeborener  $\leq 1500$  g Geburtsgewicht und  
Korrelation mit dem Status des PDA zur  
Abschätzung einer perfusionsgeminderten  
Schädigung zerebraler Zellen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von

Laura Maria Langer

2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Thomas Höhn

Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Monika Hampl

Für meine Eltern

Für Timo

## Zusammenfassung (deutsch)

Quantifizierung von S-100b, NSE und MBP im Urin Frühgeborener  $\leq 1500$  g Geburtsgewicht und Korrelation mit dem Status des PDA zur Abschätzung einer perfusionsgeminderten Schädigung zerebraler Zellen

Laura Maria Langer

Der persistierende Duktus arteriosus (PDA) ist das häufigste kardiovaskuläre Problem Frühgeborener (Chiruvolu et al., 2009). Da er mit vielen Erkrankungen wie nekrotisierender Enterokolitis (Cassady et al., 1989) sowie intrazerebralen Blutungen (Evans and Kluckow, 1996) assoziiert ist, ist es von großer Bedeutung seine Hämodynamik einschätzen zu können. Die Echokardiografie ist der Goldstandard um einen PDA zu diagnostizieren und den Durchmesser sowie die Größe des Shunts zu messen (Sanjeev et al., 2005, Evans et al., 1993). Es fehlen jedoch festgelegte Kriterien um die hämodynamische Relevanz sicher einschätzen (Chiruvolu and Jaleel, 2009b) sowie die Therapieindikation stellen zu können (Hamrick und Hansmann, 2009). Daher muss die Echokardiografie durch klinische Parameter ergänzt werden. Unser Ziel war es, Parameter zu finden, die nicht-invasiv eine objektive Beurteilbarkeit der hämodynamischen Relevanz des PDA ermöglichen bzw. Hinweise auf dessen Einfluss auf die Perfusion des Gehirns geben. Hierbei suchten wir Marker, welche den möglichen Untergang von Gehirnzellen widerspiegeln könnten. In unserer Studie wurde Urin von 50 Frühgeborenen  $\leq 1500$  g (*very low birth weight infants*, VLBW) zu vier verschiedenen Zeitpunkten gesammelt und die Proteine S100b und MBP mit Hilfe von ELISAs sowie NSE mit Hilfe eines ECLIAS quantifiziert. Bei Kindern mit einer Therapie des PDA (Intervention) fanden zusätzliche Urinsammlungen statt. Zudem wurden am 2. - 4. Lebenstag routinemäßig eine Echokardiografie sowie ein Schädel-Ultraschall durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass es bei S100b und NSE keinen signifikanten Unterschied der Proteinkonzentrationen zwischen den Kindern ohne PDA (Kontrollgruppe) und mit PDA (PDA-Gruppe) gibt. Die Kontrollgruppe hatte jedoch an den ersten beiden Messzeitpunkten signifikant höhere MBP-Konzentrationen, was durch die höhere Reife in dieser Gruppe erklärbar ist. Kinder mit offenem PDA hatten ein signifikant geringeres Gestationsalter. Das Geburtsgewicht war in der Interventionsgruppe signifikant geringer als in der Kontrollgruppe. In der Schädel-Sonografie der A. cerebri anterior war kein signifikanter Unterschied der Blutversorgung des Gehirns zwischen den beiden Gruppen zu erkennen, jedoch ein hoch signifikanter Unterschied des *resistance*-Index zwischen der Kontroll- und Interventionsgruppe. Die *La/Ao-ratio*, welche häufig als Parameter zur Einschätzung der Hämodynamik des PDA bestimmt wird, zeigte in unserer Studie keinen Einfluss auf die Konzentrationen der drei betrachteten Proteine. Zusammenfassend konnte bei Frühgeborenen mit PDA keine erhöhten Proteine als Marker der drei großen Gehirnzellreihen im Urin nachgewiesen werden, sodass wir davon ausgehen, dass es bei vorhandenem PDA nicht zu einer Schädigung zerebraler Zellen in nennenswertem Umfang kommt.

## Zusammenfassung (englisch)

Clinically hemodynamically relevant patent ductus arteriosus in very low birth weight (VLBW) infants does not lead to hypoperfusion-associated cerebral damage

Laura Maria Langer

Patent ductus arteriosus is the most common functional cardiovascular disease of preterm infants (Chiruvolu et al., 2009). It causes a left-to-right shunt, which potentially leads to problems like necrotizing enterocolitis (Cassady et al., 1989) and intracerebral hemorrhage (Evans and Kluckow, 1996). Therefore, it is important to estimate the hemodynamical relevance. Echocardiography with color Doppler is the gold standard to detect PDA and to measure the size of the shunt and the diameter of the ductus (Evans, 1993; Sanjeev et al., 2005). There are still no fixed criteria to distinguish hemodynamically significant from hemodynamically non-significant PDA and no clinical signs which are appropriate to decide for or against treatment (Chiruvolu and Jaleel, 2009a; Hamrick and Hansmann, 2010). Echocardiographic findings need to be complemented by clinical signs. Hence the aim of the present study was to quantify non-invasively potential parameters of cerebral hypoperfusion which might reflect perfusion-associated brain damage caused by PDA in immature preterm infants. Therefore, the levels of three proteins, S100b, myelin basic protein (MBP) and neuron-specific enolase (NSE), of 50 preterm infants  $\leq 1500$  g were measured in urine at four points in time. Additional urine samples were collected when PDA was treated. S100b and MBP were measured via enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA), NSE via electro-chemo-luminescence-assay (ECLIA). Echocardiography and ultrasound of arteria cerebri anterior was routinely conducted between day 2 - 4 of life. Protein concentrations of S100b and NSE were similar between the groups at all points in time. Neonates of the control group had higher urine concentrations of MBP than those of the PDA group at the first two points in time explainable by maturity. Neonates of intervention group had a significant lower birthweight as neonates of the control group. PDA group had a significantly lower gestational age than control group. We found no difference in systolic and enddiastolic flow in arteria cerebri anterior, but a significant difference of the resistance-index between control and intervention group. No correlation was observed between the three proteins and La/Ao ratio. Levels of S100b and NSE in urinary samples showed no significant difference between infants with and without PDA at all four points in time. MBP was different between the two groups on day 0 - 1 and day 2 - 4. Medical interventions for PDA did not affect urinary protein levels either. In summary, our study showed no increase of urinary protein concentrations in in the presence of hsPDA. These findings make it unlikely that relevant hypoperfusion occurs in order to lead to substantial cell death of neurons, astrocytes, or glial cells.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>A.</b>	Arteria
<b>abgeschl.</b>	abgeschlossen
<b>BNP</b>	B-type natriuretic peptide
<b>COX-Inhibitoren</b>	Cyclooxygenase Inhibitoren
<b>ECLIA</b>	Elektrochemolumineszenz Immuno Assay
<b>ELBW</b>	Extremely-low-birth-weight
<b>ELISA</b>	Enzyme linked immunoabsorbant Assay
<b>ET</b>	Entlassungstag
<b>h</b>	hour
<b>hrPDA</b>	hämodynamisch relevanter persistierender Duktus arteriosus
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>Interv.</b>	Intervention
<b>LT</b>	Lebenstag
<b>Max.</b>	Maximum
<b>MBP</b>	Myelin basic protein
<b>Min.</b>	Minimum
<b>NEC</b>	nekrotisierende Enterokolitis
<b>NNE</b>	Nicht-Neuronen spezifische Enolase
<b>NSE</b>	Neuronen spezifische Enolase
<b>OPD</b>	o-Phenylenediamin Dihydrochlorid
<b>PGE2</b>	Prostaglandin E2
<b>PGI2</b>	Prostacyclin
<b>Pro-BNP</b>	Pro-brain natriuretic peptide
<b>RI</b>	Resistance Index
<b>SA-HRP</b>	Peroxidase markiertes Streptavidin
<b>SGA</b>	Small for gestational age
<b>SSW</b>	Schwangerschaftswoche
<b>STD</b>	Standard (Verdünnungsreihe)
<b>TMB Substrat</b>	Tetramethylbenzidin Substrat
<b>VLBW</b>	Very low birth weigh
<b>WHO</b>	Weltgesundheitsorganisation
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung (deutsch) .....	I
Zusammenfassung (englisch) .....	II
Abkürzungsverzeichnis .....	III
Abbildungsverzeichnis .....	VII
Tabellenverzeichnis .....	X
1. Einleitung .....	1
1.1 Definition des Frühgeborenen .....	1
1.2 Der Duktus arteriosus .....	1
1.2.1 Ätiologie des PDA .....	1
1.2.2 Physiologie und Pathophysiologie des Duktus arteriosus .....	2
1.2.3 Klinik des PDA .....	3
1.2.4 Diagnostik des PDA .....	4
1.2.5 Therapie des PDA .....	6
1.3 Die Marker .....	8
1.3.1 S100b .....	8
1.3.2 Myelin <i>basic protein</i> (MBP) .....	10
1.3.3 Neuronen spezifische Enolase (NSE) .....	11
1.4 Ziele der Arbeit .....	12
2 Material und Methoden .....	14
2.1 Patientenpopulation .....	14
2.2 Versuchsplanung und Ablauf .....	15
2.3 Material und Geräte .....	18
2.4 Quantitative Bestimmung der Proteinkonzentrationen mit Hilfe des ELISA bzw. ECLIA .....	19
2.4.1 Die quantitative Bestimmung von S100b mittels ELISA .....	20
2.4.2 Die quantitative Bestimmung des Myelin <i>basic protein</i> (MBP) mittels ELISA .....	21
2.4.3 Quantitative Bestimmung der Neuronen-spezifischen Enolase (NSE) mittels ECLIA .....	23
2.5 Datenanalyse .....	24

3.	Ergebnisse .....	25
3.1	Vergleich der Gruppen.....	25
3.1.1	Vergleich der Gruppen hinsichtlich des Gestationsalters.....	26
3.1.2	Vergleich der Gruppen hinsichtlich des Geburtsgewichts .....	28
3.1.3	Vergleich der Gruppen hinsichtlich der <i>La/Ao-ratio</i> .....	32
3.1.4	Vergleich der Gruppen hinsichtlich der Creatininkonzentration.....	32
3.1.5	Vergleich der Gruppen hinsichtlich der Laktatkonzentration .....	32
3.1.6	Vergleich der Gruppen hinsichtlich der schädelsonografischen Parameter RI, Vmax syst. und Vend diast.....	33
3.1.7	Übersichtstabellen der Kontroll- und der PDA-Gruppe hinsichtlich der verglichenen Parameter .....	37
3.2	Vergleich der Kontroll- mit der PDA-Gruppe bezogen auf die Konzentrationen von S100b, MBP und NSE zu den vier Messzeitpunkten .....	40
3.2.1	Vergleich der Gruppen bezüglich der S100b-Konzentrationen .....	41
3.2.2	Vergleich der Gruppen bezüglich der MBP-Konzentration .....	44
3.2.3	Vergleich der Gruppen bezüglich der NSE-Konzentrationen .....	48
3.3	Vergleich Kontroll- mit der Interventionsgruppe bezogen auf die Konzentrationen von S100b, MBP und NSE zu den vier Messzeitpunkten .....	55
3.4	Korrelation der Konzentrationen der Proteine S100b, NSE und MBP an allen vier Messzeitpunkten mit dem Gestationsalter .....	58
3.4.1	Korrelation von S100b mit dem Gestationsalter .....	58
3.4.2	Korrelation von Myelin <i>basic protein</i> mit dem Gestationsalter .....	62
3.4.3	Korrelation der Neuronen-spezifischen Enolase mit dem Gestationsalter ...	66
3.5	Korrelation der Konzentrationen der Proteine S100b, MBP und NSE am 2. - 4. Lebensstag mit dem Geburtsgewicht .....	70
3.5.1	Korrelation der Konzentration von S100b mit dem Geburtsgewicht .....	70
3.5.2	Korrelation von MBP mit dem Geburtsgewicht.....	71
3.5.3	Korrelation von NSE mit dem Geburtsgewicht.....	72
3.6	Korrelation der Proteine S100, MBP und NSE am 2. - 4. Lebensstag mit der <i>La/Ao-ratio</i>	73
3.6.1	Korrelation von S100b am 2. - 4. Lebensstag mit der <i>La/Ao-ratio</i> .....	74

3.6.2	Korrelation von MBP am 2. - 4. Lebenstag mit der <i>La/Ao-ratio</i> .....	74
3.6.3	Korrelation von NSE am 2. - 4. Lebenstag mit der <i>La/Ao-ratio</i> .....	75
3.7	Konzentrationsunterschiede der Proteine S100b, MBP und NSE in Bezug auf die therapeutische Intervention des PDA.....	76
3.7.1	Verlauf der S100b-Konzentrationen der Interventionsgruppe .....	76
3.7.2	Verlauf der MBP-Konzentrationen der Interventionsgruppe .....	78
3.7.3	Verlauf der NSE-Konzentrationen der Interventionsgruppe .....	80
3.8	Exemplarische Darstellung eines Kindes mit operativer Ligatur .....	82
3.8.1	Verlauf der S100b-Konzentrationen.....	83
3.8.2	Verlauf der MBP-Konzentrationen .....	84
3.8.3	Verlauf der NSE-Konzentrationen .....	85
4.	Diskussion .....	86
5.	Schlussfolgerung .....	95
6.	Referenzen.....	96

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung der Probanden auf die Gruppen.....	15
Abbildung 2: Zeitpunkte der Urinprobenentnahme mit Versuchspersonenanzahl pro quantifiziertem Marker.....	16
Abbildung 3: Vergleich Gestationsalter mit dem Zustand des Duktus.....	27
Abbildung 4: Vergleich des Gestationsalters zwischen der Kontroll- und der Interventionsgruppe.....	28
Abbildung 5: Vergleich Geburtsgewicht mit dem Zustand des Duktus.....	29
Abbildung 6: Vergleich des Geburtsgewichts zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe.....	30
Abbildung 7: Vergleich des Geburtsgewichts innerhalb der PDA-Gruppe zwischen den Kindern ohne und den Kindern mit Intervention.....	31
Abbildung 8: Vergleich Zustand des Duktus mit dem RI der A. cerebri ant. in der Schädelsonografie am 2. - 4. Lebenstag.....	34
Abbildung 9: Vergleich zwischen der Kontroll- und der Interventionsgruppe bezogen auf den RI der A. cerebri ant. in der Schädelsonografie am 2. - 4. Lebenstag.....	35
Abbildung 10: Vergleich Zustand des Duktus mit Vmax syst. der A. cerebri ant. in der Schädelsonografie am 2. - 4. Lebenstag.....	36
Abbildung 11: Vergleich Zustand des Duktus mit Vend diast. der A. cerebri ant. in der Schädelsonografie am 2. - 4. Lebenstag.....	37
Abbildung 12: Vergleich der Konzentration von S100b am 0. - 1. Lebenstag mit dem Zustand des Duktus.....	41
Abbildung 13: Vergleich der Konzentration von S100b am 2. - 4. Lebenstag mit dem Zustand des Duktus.....	42
Abbildung 14: Vergleich der Konzentration von S100b am 6. - 8. Lebenstag mit dem Zustand des Duktus.....	43
Abbildung 15: Vergleich der Konzentration von S100b am Entlassungstag mit dem Zustand des Duktus.....	44
Abbildung 16: Vergleich der Konzentration von MBP am 0. - 1. Lebenstag mit dem Zustand des Duktus.....	45
Abbildung 17: Vergleich der Konzentration von MBP am 2. - 4. Lebenstag mit dem Zustand des Duktus.....	46

Abbildung 18: Vergleich der Konzentration von MBP am 6. - 8. Lebenstag mit dem Zustand des Duktus .....	47
Abbildung 19: Vergleich der Konzentration von MBP am Entlassungstag mit dem Zustand des Duktus .....	48
Abbildung 20: Vergleich der Konzentration von NSE am 0. - 1. Lebenstag mit dem Zustand des Duktus .....	49
Abbildung 21: Vergleich der Konzentration von NSE am 2. - 4. Lebenstag mit dem Zustand des Duktus .....	50
Abbildung 22: Vergleich der Konzentration von NSE am 6. - 8. Lebenstag mit dem Zustand des Duktus .....	51
Abbildung 23: Vergleich der Konzentration von NSE am Entlassungstag mit dem Zustand des Duktus .....	52
Abbildung 24: Vergleich der Konzentration von S100b am Entlassungstag mit dem Zustand des Duktus bei Entlassung .....	53
Abbildung 25: Vergleich der Konzentration von MBP am Entlassungstag mit dem Zustand des Duktus bei Entlassung .....	54
Abbildung 26: Vergleich der Konzentration von NSE am Entlassungstag mit dem Zustand des Duktus bei Entlassung .....	55
Abbildung 27: Korrelation zwischen S100b am 0. - 1. Lebenstag und dem Gestationsalter .....	59
Abbildung 28: Korrelation zwischen S100b am 2. - 4. Lebenstag mit dem Gestationsalter .....	60
Abbildung 29: Korrelation zwischen S100b am 6. - 8. Lebenstag mit dem Gestationsalter .....	61
Abbildung 30: Korrelation zwischen S100b am Entlassungstag mit dem Gestationsalter .....	62
Abbildung 31: Korrelation zwischen MBP am 0. - 1. Lebenstag und dem Gestationsalter .....	63
Abbildung 32: Korrelation zwischen MBP am 2. - 4. Lebenstag und dem Gestationsalter .....	64
Abbildung 33: Korrelation zwischen MBP am 6. - 8. Lebenstag und dem Gestationsalter .....	65
Abbildung 34: Korrelation zwischen MBP am Entlassungstag mit dem Gestationsalter .....	66
Abbildung 35: Korrelation zwischen NSE am 0. - 1. Lebenstag und dem Gestationsalter .....	67
Abbildung 36: Korrelation zwischen NSE am 2. - 4. Lebenstag und dem Gestationsalter .....	68

Abbildung 37: Korrelation zwischen NSE am 6. - 8. Lebenstag und dem Gestationsalter	69
Abbildung 38: Korrelation zwischen NSE am Entlassungstag und dem Gestationsalter..	69
Abbildung 39: Korrelation zwischen S100b am 2. - 4. Lebenstag und dem Geburtsgewicht .....	71
Abbildung 40: Korrelation zwischen MBP am 2. - 4. Lebenstag und dem Geburtsgewicht. .....	72
Abbildung 41: Korrelation zwischen NSE am 2. - 4. Lebenstag und dem Geburtsgewicht.. .....	73
Abbildung 42: Korrelation zwischen S100b am 2. - 4. Lebenstag und der La/Ao-ratio ...	74
Abbildung 43: Korrelation zwischen MBP am 2. - 4. Lebenstag und der La/Ao-ratio .....	75
Abbildung 44: Korrelation zwischen NSE am 2. - 4. Lebenstag und der La/Ao-ratio .....	76
Abbildung 45: Verlauf der S100b-Konzentrationen der Interventionsgruppe.....	77
Abbildung 46: Verlauf der MBP-Konzentrationen der Interventionsgruppe .....	79
Abbildung 47: Verlauf der NSE-Konzentrationen der Interventionsgruppe .....	81
Abbildung 48: Verlauf der S100b-Konzentrationen bei einem Kind mit operativer Ligatur des Duktus nach erfolgloser pharmakologischer Intervention .....	83
Abbildung 49 Verlauf der MBP-Konzentrationen bei einem Kind mit operativer Ligatur des Duktus nach erfolgloser pharmakologischer Intervention .....	84
Abbildung 50: Verlauf der NSE-Konzentrationen bei einem Kind mit operativer Ligatur des Duktus nach erfolgloser pharmakologischer Intervention .....	85

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Materialien und Geräte mit Herstellernachweis .....	18 - 19
Tabelle 2: Mittelwerte, Standardabweichungen, Minima und Maxima sowie Probandenzahl der Parameter Gestationsalter, Geburtsgewicht, La/Ao-ratio, Creatinin, Laktat und der sonografischen Parameter Vmax syst., Vend diast. und resistance-Index (RI) der Kontrollgruppe.....	38
Tabelle 3: Mittelwerte, Standardabweichungen, Minima und Maxima sowie Probandenzahl der Parameter Gestationsalter, Geburtsgewicht, La/Ao-ratio, Creatinin, Laktat und der sonografischen Parameter Vmax syst., Vend diast. und resistance-Index (RI) der PDA-Gruppe .....	39
Tabelle 4: Vergleich der Mittelwerte, Standardabweichungen und Probandenanzahl sowie der Ergebnisse des t-Tests der quantitativen S100b-Bestimmung zwischen Kontroll- und der Interventionsgruppe.....	56
Tabelle 5: Vergleich der Mittelwerte, Standardabweichungen und Probandenanzahl sowie der Ergebnisse des t-Tests der quantitativen MBP-Bestimmung zwischen Kontroll- und der Interventionsgruppe .....	57
Tabelle 6: Vergleich der Mittelwerte, Standardabweichungen und Probandenanzahl sowie der Ergebnisse des t-Tests der quantitativen NSE-Bestimmung zwischen der Kontroll- und der Interventionsgruppe.....	57
Tabelle 7: Mittelwerte, Standardabweichungen, Minima und Maxima sowie Probandenanzahl der S100b-Messungen zu allen Probezeitpunkten der Interventionsgruppe .....	78
Tabelle 8: Mittelwerte, Standardabweichungen, Minima und Maxima sowie Probandenanzahl der MBP-Messungen zu allen Probezeitpunkten der Interventionsgruppe. .....	80
Tabelle 9: Mittelwerte, Standardabweichungen, Minima und Maxima sowie Probandenanzahl der NSE-Messungen zu allen Probezeitpunkten der Interventionsgruppe.. .....	82
Tabelle 10: Verlauf der S100b-Konzentrationen vom 0. - 1. Lebenstag bis Entlassung bei einem Kind der Interventionsgruppe, welches eine Ligatur erhielt.....	83
Tabelle 11 Verlauf der MBP-Konzentrationen vom 0. - 1. Lebenstag bis zur Entlassung ei einem Kind der Interventionsgruppe welches eine Ligatur erhielt.....	84

Tabelle 12: Verlauf der NSE-Konzentrationen vom 0. - 1. Lebenstag bis Entlassung bei einem Kind der Interventionsgruppe welches eine Ligatur erhielt..... 85

# 1. Einleitung

## 1.1 Definition des Frühgeborenen

Die WHO (Weltgesundheitsorganisation) definiert die Frühgeburt als Lebendgeburt vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche (SSW). Es können Abstufungen anhand des Gestationsalters vorgenommen werden. So ist ein Kind, welches vor der 28. SSW zur Welt kommt ein „*extremely preterm infant*“, ein Kind, welches vor der vollendeten 32. SSW geboren wird ein „*very preterm infant*“ und ein Kind, das zwischen der 32. und 37. SSW zur Welt kommt ein „*moderate preterm infant*“. Frühgeburtlichkeit ist die häufigste Todesursache in den ersten 4 Lebenswochen eines Neugeborenen und nach der Pneumonie die zweithäufigste Todesursache von Kindern unter 5 Jahren. Sie birgt viele Probleme, sodass bei einer von der WHO geschätzten Zahl von 15 Millionen Frühgeborenen weltweit, ein Fokus auf die Versorgung und Problematiken dieser Kinder geworfen werden muss (March of Dimes, PMNCH, Save the Children, WHO, 2012).

Eines der Hauptprobleme stellt der persistierende Duktus arteriosus Botalli (PDA) dar, welcher im Folgenden behandelt wird.

## 1.2 Der Duktus arteriosus

### 1.2.1 Ätiologie des PDA

Präpartal fließt das Blut über den Duktus arteriosus Botalli unter Umgehung der Lunge zu Aorta und Plazenta und stellt somit eine überlebenswichtige Struktur dar. (Koch et al., 2006, Schneider and Moore, 2006). Bleibt ein Verschluss des Duktus postnatal aus, handelt es sich um einen persistierenden Duktus arteriosus, das häufigste kardiovaskuläre Problem Frühgeborener (Chiruvolu et al., 2009). Bei einem von der WHO geschätzten Anteil von 5-18 % Frühgeburten weltweit und einem Anteil von 9.2 % an allen Geburten in Deutschland, stellt die Frühgeburtlichkeit hierfür einen großen Risikofaktor dar (March of Dimes, PMNCH, Save the Children, WHO., 2012).

Insbesondere Kinder unter 1000 Gramm (g), *extremely low birth weight infants* (ELBW) weisen einen PDA auf (Chiruvolu and Jaleel, 2009b; Koch et al., 2006). Annähernd 65 % dieser ELBW sind von einem PDA betroffen, welcher in 85 % der Fälle behandelt werden muss (Chiruvolu und Jaleel, 2009b). Insgesamt betrachtet hat etwa jedes dritte Kind unter

1500 g einen PDA. Die geschätzte Prävalenz bei reifen Neugeborenen wird mit 57 auf 100.000 angegeben (Hamrick and Hansmann, 2010a). Physiologisch verschließt sich der Duktus innerhalb der ersten 96 Lebensstunden bei > 95 % der Neugeborenen über 1500 g (Koch et al., 2006), bei einem Großteil in den ersten 24 - 48 Lebensstunden (Schneider and Moore, 2006). Herrman et al. (2009) beobachteten einen Spontanverschluss im medianen Alter von 48 Wochen post menstruationem bei 18 von 21 sehr leichten Frühgeborenen, *very low birth weight infants* (VLBW), die zum Zeitpunkt der Entlassung aus dem Krankenhaus noch einen PDA hatten. Bei den ELBW ist bei nahezu 40 % ein spontaner Verschluss festzustellen. Dieser erfolgt meist am Ende der 1. postnatalen Woche ( $4.3 \pm 2$  Lebenstage) (Koch et al., 2006). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein eines PDA mit sinkendem Gestationsalter und geringerem Geburtsgewicht zunimmt (Alagarsamy et al., 2005).

### **1.2.2 Physiologie und Pathophysiologie des Duktus arteriosus**

Der Duktus arteriosus ist ein essentieller Bestandteil des pränatalen Kreislaufs. Er ist eine vaskuläre Struktur, welche die absteigende Aorta und die Pulmonalarterie in der Nähe des Ursprungs der linken Pulmonalarterienabzweigung verbindet. Der rechtsventrikuläre Auswurf liegt bei ca. 65 %, wobei ein Großteil des Blutes unter Umgehung der Lungen zirkuliert. Nur etwa 5 - 10 % des Auswurfs passiert die Lunge, in welcher ein hoher Widerstand herrscht. Der restliche Anteil fließt von der Pulmonalarterie über den Duktus arteriosus zur Aorta und Plazenta (Schneider and Moore, 2006). Eine vorgeburtliche Verengung bzw. ein Verschluss würde über eine Rechtsherzinsuffizienz zu einem fetalen Hydrops führen (Leal et al., 1997).

Die Wand des Duktus arteriosus unterscheidet sich von der der Aorta und der Pulmonalarterie dadurch, dass die Media des Duktus aus longitudinalen und spiralig angeordneten Lagen glatter Muskulatur besteht, während die Media der beiden erst genannten aus zirkumferenten Lagen elastischer Fasern besteht (Schneider and Moore, 2006). Die glatten Muskelzellen des Duktus arteriosus reagieren auf Sauerstoff. Der Tonus der Duktuswand wird über vasoaktive Stoffe der Endothelzellen verändert (Heymann and Rudolph, 1975). Zusätzlich zum geringen Sauerstoffgehalt im fetalen Kreislauf (Heymann and Rudolph, 1975) zirkulieren die Cyclooxygenase-vermittelten Produkte des Arachidonsäurestoffwechsels, Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), welche einen Verschluss des Duktus verhindern (Coceani and Olley, 1973). Vom Duktus

produziertes PGE<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub> sorgen für eine Vasodilatation über duktale Prostaglandinrezeptoren. Zusätzlich werden diese Prostanoiden von der Plazenta produziert (Michelakis et al., 2000; Schneider and Moore, 2006). Sauerstoff hingegen führt zu einer Konstriktion des Duktus über Inhibition von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen (Michelakis et al., 2000).

Der vollständige und bleibende Verschluss des Duktus ist abhängig vom Gestationsalter des Neugeborenen (Hamrick and Hansmann, 2010a) und vollzieht sich in mehreren Schritten. Durch die Umstellung vom pränatalen auf perinatalen Kreislauf und der damit verbundenen gesteigerten Lungenperfusion, kommt es zu einem erhöhten Sauerstoffgehalt im Blut. Dieser führt über spannungsgesteuerte Kaliumkanäle zu einem Kalziumeinstrom und zur Konstriktion der glatten Duktusmuskulatur (Hamrick and Hansmann, 2010a; Leonhardt et al., 2003). Zusätzlich werden durch den Metabolismus in der nun funktionsfähigen Lunge und durch die fehlende Plazenta weniger Prostanoiden produziert, was ebenso förderlich für den Verschluss ist. Die Wand des Duktus verdickt sich, das Lumen obliteriert und der Duktus verkürzt sich. Die Konstriktion der glatten Muskulatur führt zur lokalen Hypoxie und diese wiederum zur Apoptose. Daraufhin folgt ein *Remodelling* über Wachstumsfaktoren, welche infolge der Apoptose ausgeschüttet werden (Hamrick and Hansmann, 2010a). Das zurückbleibende fibröse Band persistiert als Ligamentum arteriosum (Schneider and Moore, 2006).

Das Problem der Wiedereröffnung des Duktus bei unreifen Kindern ist auf die insuffiziente Muskelkontraktion des Duktus zurückzuführen. Der vollständige Verschluss bleibt aus. Die Wiedereröffnungsrate ist bei niedrigem Gestationsalter signifikant höher als bei reifen Kindern (Weiss et al., 1995).

### **1.2.3 Klinik des PDA**

Die Klinik des PDA ist stark abhängig von der Größe und der Kompensation des *shunts*. So kann ein PDA asymptomatisch auftreten, aber auch zur lebensbedrohlichen Eisenmenger-Reaktion führen (Chiruvolu and Jaleel, 2009b, Schneider and Moore, 2006).

Der PDA führt zu einem Links-Rechts-*shunt*, welcher einen erhöhten Blutfluss in der Lunge und somit einen erhöhten pulmonalen Druck zur Folge hat. Ein bestehendes Atemnotsyndrom, einhergehend mit einem niedrigen onkotischen Druck und erhöhter Kapillarpermeabilität, kann zum interstitiellen und alveolären Lungenödem und einer verminderten Compliance der Lunge führen. Daraus resultiert meist eine längere

Beatmungsdauer mit höheren Sauerstoffkonzentrationen. Es steigt das Risiko für eine bronchopulmonale Dysplasie bzw. chronische Lungenveränderungen. Bei Kindern unter 1500 g geht die Lungenschädigung häufig mit einer myokardialen Dysfunktion mit linksventrikulärer Überfüllung einher, was gemeinsam mit dem *Steal*-Phänomen die systemische Blutversorgung erschwert (Hamrick and Hansmann, 2010a). Durch diese Konstellation sind Frühgeborene unter 1500 g anfällig für Minderdurchblutung von Organen und den daraus resultierenden Folgen (Clyman and Chorne, 2007, Hamrick and Hansmann, 2010). So konnte bei diesen ein verminderter Blutfluss im Truncus coeliacus, in der Arteria mesenterica superior, in den Arteriae renales (Chiruvolu and Jaleel, 2009a) sowie der Arteria cerebri anterior (Perlman et al., 1981) nachgewiesen werden. Dies führt zu Komorbiditäten wie intraventrikulären Hirnblutungen (Evans and Kluckow, 1996) oder der nekrotisierenden Enterokolitis (Cassady et al., 1989). Noori et al. (2009) zeigten zudem in einer retrospektiven Studie, dass der PDA ein Risikofaktor für eine erhöhte Mortalitätsrate ist. Nach Anpassung der perinatalen Faktoren, Reife, Krankheitsschwere, und pathologischen Veränderungen, konnte ein achtfach erhöhtes Risiko für Kinder mit einem PDA im Gegensatz zu Kindern mit einem vollständigen Duktusverschluss aufgezeigt werden.

#### **1.2.4 Diagnostik des PDA**

Die Diagnostik des PDA stellt Neonatologen auch heute noch vor ein Problem, da es keine einheitlich festgelegten diagnostischen Kriterien für die Einschätzung der Signifikanz des PDAs gibt. Auch die Kriterien zur Durchführung einer Intervention sind nicht einheitlich (Chiruvolu et al., 2009; Hamrick and Hansmann, 2010a).

Klinische Zeichen können ein Systolikum, erhöhter Pulsdruck, Tachykardie, unterschiedliches Pulsvolumen und Blutdruckparameter sowie steigender Bedarf der Beatmung bzw. die Unfähigkeit die Beatmung zu reduzieren, sein (Chiruvolu et al., 2009; Skelton et al., 1994). So untersuchten Skelton et al. (1994) die Rolle der Parameter systolisches Herzgeräusch, steigende Pulsvolumina und steigende präkordiale Aktivität bei Frühgeborenen unter 1500 g. Das systolische Herzgeräusch zeigte eine Spezifität von 99 %, jedoch nur eine Sensitivität von 31 %. Erst mit dem 7. Tag stieg die Sensitivität auf 94 %. Eine weitere Studie an Frühgeborenen unter 1750 g zeigte, dass die steigende kardiothorakale-*ratio* im Röntgen-Thorax als weiteres klinisches Zeichen ebenfalls eine hohe Spezifität, aber eine geringe Sensitivität zwischen dem 3. und 7. Lebenstag hat. Das Pulsvolumen zeigte eine Spezifität von 74 %, die Sensitivität lag bei lediglich 43 %. Daher

erweisen sich radiologische Zeichen in der Regel nicht als ausreichend hilfreich bei der Entscheidung, ob ein relevanter oder ein nicht-relevanter Duktus vorliegt. Die klinischen und radiologischen Zeichen müssen durch die Echokardiografie ergänzt werden. (Davis P et al., 1995).

Die Echokardiografie hat sich als Goldstandard zur Diagnostik eines PDA etabliert. *Shunt*-Größe und der Duktusdurchmesser können mit Hilfe des Farbflussdopplers dargestellt bzw. gemessen werden (Wesley Vick III et al., 1985).

Eine Kombination von echokardiografischen Parametern können helfen einen hämodynamisch wirksamen PDA zu identifizieren. Es gibt somit keinen echokardiografischen Marker, welcher alleinig geeignet wäre, einen hämodynamisch wirksamen PDA von einem nicht wirksamen zu unterscheiden und eine Therapieindikation zu stellen (Chiruvolu et al., 2009).

Die *La/Ao-ratio* ist ein Parameter, der häufig Verwendung in der Abschätzung der hämodynamischen Relevanz des Duktus findet. Sie bildet das Verhältnis zwischen dem Durchmesser des linken Atriums und dem Durchmesser der Aorta ab und gibt einen Hinweis auf die *shunt*-Größe (Evans and Iyer, 1995; Iyer and Evans, 1994). Eine *La/Ao-ratio* von 1.17 war im Mittel bei geschlossenem Duktus, 1.21 bei teilweise geschlossenem und 1.61 bei weit offenem Duktus feststellbar. Nimmt man 1.5 als *cut-off*, findet man eine Sensitivität von 79 % und eine Spezifität von 95 % für die *La/Ao-ratio*. Die Sensitivität stieg auf 88 %, wenn Echokardiografien nach dem 1. Lebenstag verwendet wurden. Die *La/Ao-ratio* sollte somit nicht am 1. Lebenstag als Parameter zur Bestimmung des PDA verwendet werden (Iyer and Evans, 1994). Insgesamt sind die echokardiografischen Parameter jedoch nicht in der Lage das *outcome* einzuschätzen (El-Khuffash et al., 2008).

Ein Duktusdurchmesser von  $\geq 1,5$  mm im mittleren Alter von 19 Lebensstunden bei Frühgeborenen unter 1500 g ist mit einer Sensitivität von 81 % sowie einer Spezifität von 85 % hämodynamisch wirksam (Kluckow and Evans, 1995). Ein Duktusdurchmesser von  $\geq 1,4$  mm/kg bei Frühgeborenen unter 30 SSW erbrachte eine Sensitivität von 94 % und eine Spezifität von 90 % (El Hajjar et al., 2005).

Als weiteres diagnostisches Hilfsmittel kann *B-type natriuretic peptide* (BNP), ein Hormon, welches vom Ventrikel unter hämodynamischem Stress produziert wird, zur Beurteilung der Relevanz des PDA verwendet werden. Eine Konzentrationserhöhung im Plasma kann dabei helfen, Kinder mit einem therapiebedürftigen PDA zu erkennen. Zudem lässt sich der Therapieerfolg anhand der sinkenden Plasmakonzentrationen des pro-BNP unter einer Therapie mit Indometacin feststellen (Sanjeev et al., 2005). Es konnte eine signifikante

Korrelation zwischen der *La/Ao-ratio*, dem *shunt*-Durchmesser und pro-BNP gefunden werden (Choi et al., 2005). Bei der Verwendung des pro-BNP gibt es jedoch keinen festgelegten *cut-off*-Wert um einen PDA als hämodynamisch relevant zu identifizieren (Chiruvolu et al., 2009).

Aufgrund der uneinheitlichen diagnostischen Kriterien ist es dem erfahrenen Neonatologen überlassen, die hämodynamische Relevanz des Duktus einzuschätzen und über die Notwendigkeit einer Intervention zu entscheiden.

Es erweist sich als problematisch, dass die Klinik gerade in den ersten Lebenstagen Unsicherheiten birgt, dies aber genau die Zeit ist, in der eine Intervention am erfolgversprechendsten ist (Davis P et al., 1995; Firth and Pickering, 1980; Skelton et al., 1994).

### **1.2.5 Therapie des PDA**

Es lassen sich zwei Therapieoptionen beim PDA unterscheiden. Zum einen die medikamentöse Therapie und zum anderen die operative Ligatur. Als Medikamente stehen Ibuprofen und Indometacin zur Verfügung (Chiruvolu and Jaleel, 2009b; Van Overmeire et al., 2000). Beide Medikamente sind nicht-selektive Cyclooxygenase-Inhibitoren, deren Effekte auf den Duktus von Friedman et al. (1976) und Heymann et al. (1976) veröffentlicht wurden. Es konnte innerhalb von 24 Stunden nach der Gabe von Indometacin eine deutliche Verbesserung der klinischen Symptome sowie der echokardiografischen Befunde von Frühgeborenen mit hämodynamisch relevantem PDA (hrPDA), welcher sonst operativ versorgt worden wäre, gezeigt werden (Friedman et al., 1976). Auch die Publikation von Heymann et al., (1976) konnten diese Effekte durch Indometacin bestätigen. Hier mussten teilweise drei Dosen gegeben werden, um den gewünschten Effekt des Duktusverschlusses zu erzielen. Beide Veröffentlichungen wiesen jedoch auch darauf hin, dass es zu einer vorübergehenden Reduktion der Nierenfunktion bzw. einem Anstieg des Creatinins kommen kann. Diese Ergebnisse führten dazu, dass sich die Therapie des PDA durch Gabe von unselektiven COX-Inhibitoren etablierte.

Heute besteht die Therapie aus einem ersten Therapiezyklus durch drei Gaben Ibuprofen bzw. Indometacin (Chiruvolu and Jaleel, 2009b).

Ohlsson et al. (2005) konnten in ihrem *review* zeigen, dass kein Unterschied zwischen Ibuprofen und Indometacin in der Effektivität des Duktusverschlusses besteht. Beide zeigten den gleichen Erfolg, gemessen am Misserfolg des Verschlusses. Auch Van Overmeire et al.

(2000) konnten die vergleichbare Effektivität bei Frühgeborenen mit PDA und *respiratory distress syndrome* bestätigen.

Ibuprofen erwies sich im Vergleich zu Indometacin als schonender für die Niere und hatte signifikant weniger kurzfristige Niereninsuffizienzen zur Folge (Ohlsson et al., 2005). Es wurde jedoch eine Assoziation zwischen Ibuprofen und der Bronchopulmonalen Dysplasie festgestellt. Das erhöhte Risiko lag in der Meta-Analyse bei 30 % (Jones et al., 2011).

Ibuprofen sowie Indometacin reduzieren beide das Risiko einer NEC, wobei Ibuprofen, das Risiko betreffend, das Mittel der Wahl zu sein scheint. (Ohlsson et al., 2005). In Bezug auf die Überlebensrate bis zur Entlassung sowie dem Bedarf an Atemhilfe zeigte sich zwischen beiden Präparaten kein Unterschied. Auch die Zeit bis zum Erreichen des Geburtsgewichts sowie die Zeit bis zur vollständig enteralen Ernährung waren gleich

(Van Overmeire et al., 2000).

Mit der medikamentösen Intervention sollte möglichst früh begonnen werden. Mit zunehmender Reife, insbesondere nach der vierten Lebenswoche, sinkt die Prostaglandinsensitivität des Duktusgewebes stetig. Ein Erfolg wird somit mit zunehmender Reife immer unwahrscheinlicher (Hamrick and Hansmann, 2010a). Vida et al. (2009) konnten ein Patientenkollektiv identifizieren, welches nicht gut auf Ibuprofen ansprach. Dies waren die Kinder mit geringerem Gestationsalter und geringerem Geburtsgewicht. Zudem wurde in dieser Arbeit der Zeitpunkt für die operative Ligatur nach erfolgloser medikamentöser Behandlung mit Ibuprofen diskutiert. Als besten Zeitpunkt sahen die Autoren die Ligatur nach dem zweiten erfolglosen Zyklus Ibuprofen an, da sich sonst das Risiko einer bronchopulmonalen Dysplasie sowie der akuten Niereninsuffizienz erhöhen würden (Vida et al., 2009). Die Autoren schlussfolgern, dass durch eine zurückhaltende Indikationsstellung zur Ligatur die Morbiditätsrate sowie die Hospitalisierungszeit zunehmen. Durch eine möglichst frühe Ligatur nach frustraner medikamentöser Therapie könnten so die Morbiditätsrate und die Hospitalisierungszeit reduziert werden (Vida et al., 2009). Komplikationen der Ligatur können beispielsweise eine linksseitige Stimmbandparalyse durch Schädigung des Nervus recurrens (Fan et al., 1989), sowie selten die Entstehung eines Chylothorax (Stempniewicz and Walas, 2007) sein.

Unter einer prophylaktischen Gabe von Cyclooxygenase-Inhibitoren (COX-Inhibitoren) versteht man die Gabe innerhalb der ersten 24 Lebensstunden unabhängig vom Status des Duktus (Chiruvolu and Jaleel, 2009b). Die Prophylaxe wird kontrovers diskutiert. Es konnte in einer Metaanalyse mit 19 Studien ein positiver Effekt der prophylaktischen Gabe verglichen mit Placebo- bzw. keiner Medikamentengabe aufgezeigt werden. Es kam zu

weniger symptomatischen PDAs, Hirnblutungen Grad III und IV traten seltener auf und weniger Kinder mussten einer operativen Ligatur unterzogen werden. (Fowlie and Davis, 1996). Die prophylaktische Gabe vermindert zwar die Notwendigkeit einer operativen Ligatur, verringert die Rate an pulmonalen und schweren intrazerebralen Blutungen, birgt jedoch auch das Risiko von Nebenwirkungen der medikamentösen Therapie (Hamrick and Hansmann, 2010a). Betrachtet man die spontane Verschlussrate von über 34 % bei Kindern unter 1000 g so ist davon auszugehen, dass viele Kinder unnötig behandelt und Nebenwirkungen riskiert werden würden (Koch et al., 2006).

Ibuprofen als Prophylaxe bei VLBW mit dem Risiko eines PDA kann nach aktueller Datenlage keine Standardempfehlung sein (Hamrick and Hansmann, 2010b; Ohlsson et al., 2005; Ohlsson and Shah, 2011). Eine prophylaktische Ligatur konnte weder das Mortalitätsrisiko noch das Risiko für die bronchopulmonale Dysplasie, Retinopathia prematorum, sowie Hirnblutungen Grad III und IV senken. Lediglich bei der NEC zeigten sich signifikante Verringerungen im Vorkommen des Stadiums II und III. Somit ist auch die prophylaktische Ligatur unter den Gesichtspunkten der Spontanverschlüsse, der vorhandenen Risiken und der guten pharmakologischen Therapie nicht zu empfehlen (Mosalli and Alfaleh, 2008).

Insgesamt zeigt sich die Notwendigkeit eine Verbesserung der Diagnostik und der hämodynamischen Einschätzung des PDA zu erreichen.

Die nachfolgende Arbeit hat es sich zum Ziel gemacht weitere Marker zu finden, welche in der Lage sind, die Signifikanz des PDA und insbesondere seine Auswirkungen auf das Gehirn, besser einschätzen zu können. So wurde für jede der drei großen Zelllinien, Neurone, Astrozyten sowie Oligodendrozyten ein Protein als Marker ausgewählt. Im Folgenden sind die dazu gewählten Protein-Marker S100b, Neuronenspezifische Enolase (NSE) und Myelin basic protein (MBP) weiter beschrieben.

## **1.3 Die Marker**

### **1.3.1 S100b**

Moore (1965) isolierte 1965 erstmals Proteine aus Rinderhirnen, welche als Nervensystem-spezifisch galten. Diese wurden S100 Proteine genannt. Später konnte gezeigt werden, dass

diese vornehmlich aus zwei Polypeptiden bestanden, dem S100a1 und S100b, welche die ersten zwei Anhänger dieser Proteinfamilie mit jeweils 10 Kilodalton (kDa) und zwei hochaffinen Domänen, der Calcium-bindenden EF-Hände darstellen (Isobe and Okuyama, 1978; Zimmer et al., 1995).

Die Proteine der Calcium-bindenden S100-Familie sind kleine saure Proteine mit einer Größe von 10 - 12 kDa. Sie liegen in Homo- und Heterodimeren vor (Heizmann et al., 2002). Mittlerweile sind 24 Mitglieder der S100-Proteinfamilie bekannt, welche sich in drei Subtypen einteilen lassen. Unterschieden werden Proteine, die intrazellulär, Proteine, die intra- und extrazellulär und Proteine, die extrazellulär regulatorisch wirken (Donato et al., 2013).

S100-Proteine zeichnen sich unter anderem dadurch aus, dass sie nur in Vertebraten exprimiert werden. Sie besitzen Zell-spezifische Genexpressionsmuster. Zudem ist bekannt, dass S100-Proteine, im Rahmen von pathologischen Prozessen auch in Zellen exprimiert werden, die physiologisch kein S100 exprimieren (Donato et al., 2013).

Die Proteine der S100-Familie regulieren unter anderem Zellwachstum, Zellstrukturen, Zell-Zell-Kommunikation, den Energiemetabolismus der Zellen, die intrazelluläre Signaltransduktion (Zimmer et al., 1995), Differenzierung, Apoptose, Entzündungen sowie die Calcium-Homöostase (Donato et al., 2013). Zudem interagieren sie mit zellulären *target*-Proteinen wie Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren, Enzymen und Untereinheiten des zellulären Zytoskeletts (Donato et al., 2013).

Extrazelluläres S100b und S100a4 interagieren unter anderem mit dem epidermalen Wachstumsfaktor und dem *basic-fibroblast-growth factor* (Donato et al., 2013). S100b wird vornehmlich von astroglialen Zellen exprimiert (Donato, 2001; Schäfer and Heizmann, 1996; Zimmer et al., 1995). S100 Proteine wirken regulatorisch auf verschiedene Zellreihen wie Monozyten, Makrophagen, Mikroglia, neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Mastzellen, Chondrozyten, endotheliale und vaskuläre glatte Muskelzellen, Neurone, Astrozyten, Schwannzellen, epitheliale Zellen, Myoblasten und Kardiomyozyten. Hier wirken sie unter anderem bei der Immunantwort, Zellmigration und Chemotaxis (Donato et al., 2013).

Eine Vielzahl an Assoziationen der S100 Proteine mit Erkrankungen wurden beschrieben. Diese lassen sich in zwei Gruppen einteilen, den neurologischen sowie den neoplastischen Erkrankungen.

So konnten Studien einen Zusammenhang zwischen der S100b-Konzentration und schweren Schädelhirntraumata (Raabe et al., 1999) sowie deren *outcome* (Woertgen et al.,

1997), perinataler Asphyxie (Roka et al., 2012), zerebraler Hypoxie nach kardio-pulmonalen *bypass*-Operationen (Johnsson et al., 1995) sowie Ventrikeldilatation nach intraventrikulären Hirnblutungen bei Frühgeborenen (Whitelaw et al., 2001) feststellen. Zudem kann S100b als früher Indikator für eine intraventrikuläre Hirnblutung (Gazzolo et al., 1999) sowie für die Einschätzung einer Asphyxie von Termingeborenen dienen (Ruetzler et al., 2006). Bei akuten ischämischen Schlaganfällen kann es zudem eine Einschätzung des Ausmaßes des Infarktes sowie des neurologischen *outcomes* ermöglichen (Missler et al., 1997).

Bei Neoplasien wie dem malignen Melanom wird S100b überexprimiert und hat hier in der klinischen Diagnostik einen Stellenwert gefunden (Cochran et al., 1993).

Van Engelen et al. (1992) fanden in Ihrer Studie über die alterskorrelierten Veränderungen der Proteine NSE, S100b sowie MBP im Liquor heraus, dass jedes dieser Proteine ca. 1 % pro Lebensjahr steigt (van Engelen et al., 1992). Ruetzler et al. (2006) hingegen konnten zeigen, dass erhöhte Konzentrationen von S100b im Urin mit Unreife assoziiert sind.

S100b wird über die Nieren eliminiert (Ruetzler et al., 2006). So haben einige Autoren wie Ruetzler et al. (2006) und Leite et al. (2008) mit Erfolg die Durchführbarkeit der S100b-Messung im Urin gezeigt.

Da das S100b vor allem in Astrozyten vorkommt, haben wir diesen Marker für unsere Studie gewählt, um einen möglichen Astrozytenabbau bei unseren Probanden nachweisen zu können. Da S100b über die Niere eliminiert wird und andere Arbeitsgruppen bereits Erfolge mit der Messung von S100b im Urin zeigen konnten, haben wir uns, insbesondere durch die nicht-invasive Gewinnung der Urinproben, dazu entschlossen, diese Methode anzuwenden. Zudem kann man anhand der bisherigen Studien einen Zusammenhang mit neurologischen und insbesondere zerebralen Schädigungen sehen, sodass dieser Marker uns für unsere Fragestellung, in Bezug auf den möglichen Gehirnzellabbau durch einen PDA, als geeignet erscheint.

### **1.3.2 Myelin basic protein (MBP)**

MBP ist eine der Hauptkomponenten der Markscheiden. Es ist mit 30 % das zweithäufigste Protein in myelinisierenden Zellen (Boggs, 2006). Es gehört zu einer Familie von Proteinen mit multiplen Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von 14 - 21,5 kDa. Die Proteinfamilie geht aus einem Komplex namens *genes of oligodendrocyte lineage* hervor. Es wird auch die „Exekutive des Myelin“ genannt, da es eine wesentliche Aufgabe bei der

Myelinisierung inne hat (Moscarello, 1997). Kamholz et al. (1986) konnten drei Isoformen identifizieren, wovon die beim Menschen vornehmlich vorkommende Isoform ein Molekulargewicht von 18,5 kDa hat.

Myelinisierung ist ab der 25. SSW nachweisbar. Schrittweise myelinisiert das Nervengewebe beginnend beim Globus pallidus, pallidothalamischen Fasern über das Striatum, Gyrus prä- und postcentralis in der 35. Woche bis zur Capsula interna anterior und der Sehstrahlung in der 37. Woche. Der Prozess der Myelinisierung setzt sich nach der Geburt fort (Hasegawa et al., 1992). Es zeigt sich, dass der Myelinisierung neben anderen morphologischen Korrelaten, wie beispielsweise der Gyrierung, eine wesentliche Rolle bei der Einschätzung der Gehirnentwicklung und der Reife zukommt (Chi et al., 1977; Hasegawa et al., 1992)

Die MBP-Konzentration im Liquor steigt mit zunehmendem Alter um ca. 1 %/Jahr. Es konnte kein Unterschied zwischen den Geschlechtern gezeigt werden (van Engelen et al., 1992).

Es lässt sich des Weiteren ein Zusammenhang zwischen dem Myelin und altersbedingten degenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer finden (Terry et al., 1964). Es konnte dargestellt werden, dass mit zunehmendem Alter eine fortschreitende granuläre Degeneration des Myelins stattfindet.

Siegal et al (1987) konnten durch Bestimmung der MBP-Konzentration im Liquor von Patienten mit leptomeningealen Metastasen Hinweise auf die Krankheitsaktivität finden. Zudem zeigte sich, dass einem Anstieg von *MBP-like material* im Urin eine Rolle als klinischer Marker für den Misserfolg einer Remission der Multiplen Sklerose sowie beim Übergang in eine chronisch progressiven Phase zukommt (Whitaker et al., 1995).

Betrachtet man die Rolle des MBP im ZNS, so kann man annehmen, dass es bei der Einschätzung und Identifikation von ZNS-Schäden hilfreich sein könnte. Daher und durch die wesentliche Rolle bei der Myelinisierung und die Spezifität für Oligodendrozyten und Schwannzellen haben wir uns entschieden, diesen Marker im Zusammenhang mit dem PDA und der dadurch möglichen verminderten Perfusion des Gehirns, mit Folge von Zellabbau, zu untersuchen.

### **1.3.3 Neuronen spezifische Enolase (NSE)**

NSE ist ein glykolytisches Enzym mit einem Molekulargewicht von ca. 80 kDa. Sie kommt in Homo- sowie Heterodimeren vor, die jeweils aus den immunologischen Untereinheiten

$\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  bestehen. In verschiedenen Geweben kommen jeweils bestimmte Untereinheiten und Kombinationen vor. So findet man die  $\alpha$ -Untereinheit in zahlreichen Gewebetypen von Säugern, während die  $\beta$ -Untereinheit vor allem in quergestreifter Muskulatur sowie im Herzen vorkommt. NSE, auch als  $\gamma$ -Enolase bezeichnet, setzt sich aus den Untereinheiten  $\alpha\gamma$  und  $\gamma\gamma$  zusammen. Sie ist vornehmlich im Zytoplasma von Neuronen und in neuroendokrinen Zellen nachweisbar (Lamerz R., 1988a). NSE findet sich in geringen Konzentrationen auch in anderen Organen wie der Prostata, der Lunge, der Henle-Schleife sowie der Macula densa der Niere und dem Erregungsleitungssystem des Herzens (Haimoto et al., 1985). Die  $\alpha$ -Form wird als nicht-neuronen-spezifische Enolase, NNE, bezeichnet. (McALEESE et al., 1988).

NSE hat als Marker zunehmend an medizinischem Interesse gewonnen, da beispielsweise bei neuroendokrinen Tumoren (Tapia et al., 1981), Neuroblastomen (Gotoh et al., 1986) sowie in kleinzelligen Bronchialkarzinomen Konzentrationserhöhungen gefunden werden (Ebert et al., 1997).

Zudem finden sich auch bei benignen zerebralen Erkrankungen wie tuberkulösen (Song et al., 2012) und purulent bakteriellen Meningitiden (Kepa, 2009) sowie Hirninfarkten (Cunningham et al., 1996; Missler et al., 1997) erhöhte Serum-/Liquorwerte.

NSE kann als Marker für die perinatale Asphyxie (Çeltik et al., 2004a; Roka et al., 2012) sowie für die hypoxisch-ischämische Enzephalopathie bei Neugeborenen dienen (Çeltik et al., 2004a). Im Liquor gemessenes NSE erwies sich in den ersten 96 Lebensstunden in einer Meta-Analyse als signifikant prädiktiver Marker für langfristiges neurologisches *outcome* (Ramaswamy et al., 2009). Die Autoren konnten jedoch in ihrem systematischen Review auch zeigen, dass eine große Heterogenität bezüglich der Aussagekraft von NSE besteht (Ramaswamy et al., 2009)

Die NSE-Konzentration steigt im Liquor ca. 1 % pro Lebensjahr (van Engelen et al., 1992). Da NSE insbesondere im Zytoplasma von Neuronen vorkommt und sich in vielen Studien als positiv prädiktiver Marker für Hirnschäden und zerebralen Erkrankungen gezeigt hat, haben wir NSE in unserer Studie, im Zusammenhang mit möglichen Hirnschäden durch einen persistierenden Duktus, gewählt.

## **1.4 Ziele der Arbeit**

Da der PDA das häufigste kardiovaskuläre Problem Frühgeborener ist und mit vielen Erkrankungen und Problemen assoziiert, ist es von großer Bedeutung seine Hämodynamik

und die daraus entstehenden Folgen einschätzen zu können. Es ist bekannt, dass der PDA zu einem verminderter Blutfluss im Truncus coeliacus, in der Arteria mesenterica superior, in den Arteriae renales (Chiruvolu and Jaleel, 2009a) sowie der Arteria cerebri anterior (Perlman et al., 1981) führen kann. Dies führt zu Komorbiditäten wie intraventrikulären Hirnblutungen (Evans and Kluckow, 1996) oder der nekrotisierenden Enterokolitis (Cassady et al., 1989). Zusätzlich stellt der PDA einen Risikofaktor für eine erhöhte Mortalitätsrate dar (Noori et al., 2009). Da es keine festgelegten Kriterien gibt, ist es bisher dem erfahrenen Neonatologen überlassen anhand von Klinik und Echokardiografie die Therapieindikation für einen Duktusverschluss zu stellen.

Diese Arbeit entstand durch die Suche nach möglichen Markern, welche dazu dienen sollen, die Signifikanz des PDA und insbesondere seine Auswirkungen auf das Gehirn, besser einschätzen zu können.

Unser Ziel war es, Parameter zu finden, die nicht-invasiv eine objektive Beurteilbarkeit der hämodynamischen Relevanz des PDA ermöglichen bzw. Hinweise auf dessen Einfluss auf die Perfusion des Gehirns geben. Hierbei suchten wir Marker, welche den möglichen Untergang von Gehirnzellen widerspiegeln könnten.

Es wurden die drei großen Zelllinien, Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten, des Gehirns betrachtet. Für jede dieser Zelllinien wurde jeweils ein Protein als Marker ausgewählt, welches den Abbau dieser Zellen durch Ausfällung im Urin aufzeigen soll. Im vorhergehenden Kapitel 1.3 sind diese Protein-Marker S100b, Neuronenspezifische Enolase (NSE) und Myelin basic protein (MBP) näher beschrieben.

## 2 Material und Methoden

Im Folgenden werden Material und Methoden der Studie vorgestellt.

### 2.1 Patientenpopulation

Im Zeitraum von Februar 2011 bis Februar 2012 wurde bei 50 Frühgeborenen Urin am 0. - 1., 2. - 4., 6. - 8. Lebenstag sowie zum Entlassungstag gesammelt. Zusätzlich wurden bei 8 der 50 Kinder, bei welchen ein hämodynamisch relevanter bzw. ein interventionsbedürftiger PDA festgestellt wurde, Urinproben in Zusammenhang mit der pharmakologischen Intervention gesammelt. Alle Kinder wurden in der Kinderklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf stationär betreut. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität hat die Studie geprüft und genehmigt (Studiennummer: 3552).

Es wurden nur Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht von  $\leq 1500$  g in die Studie einbezogen.

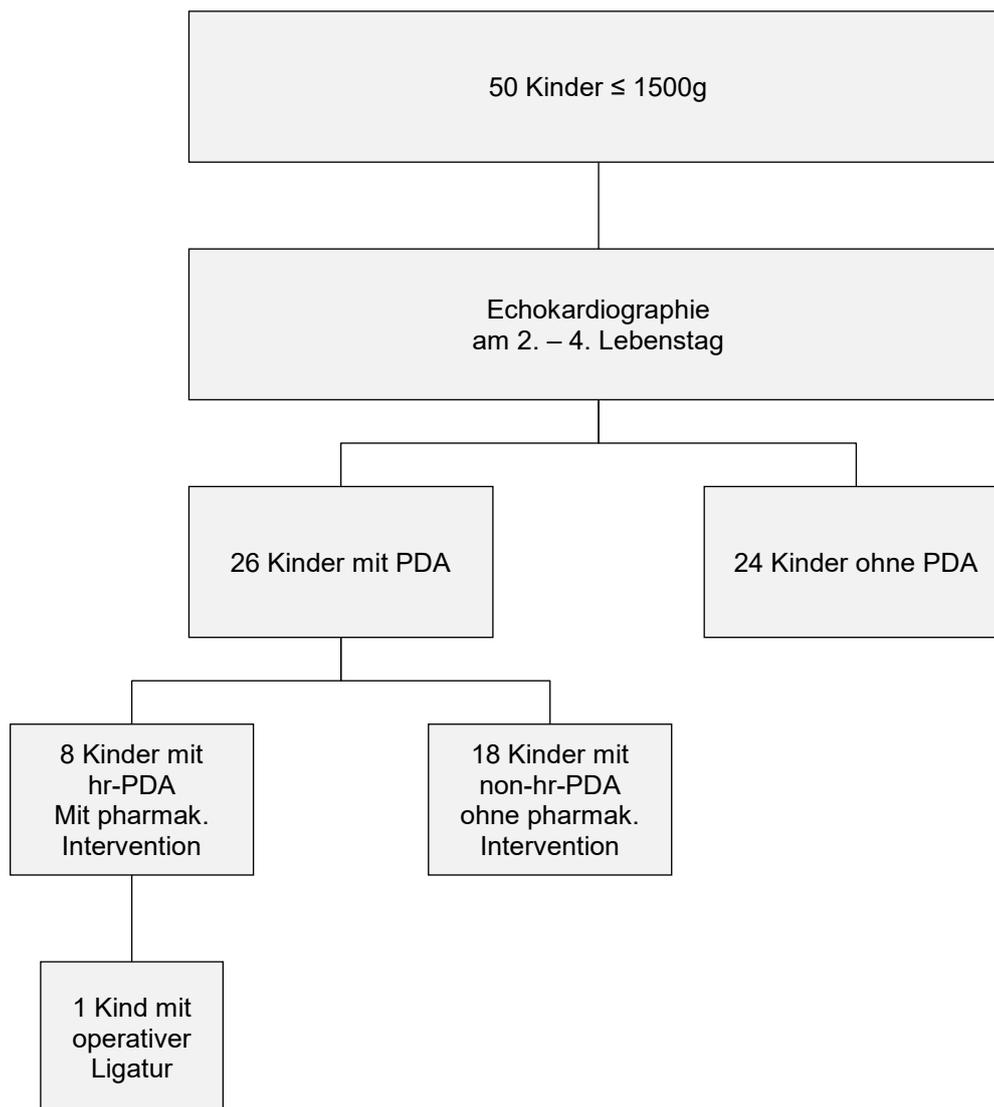
Ausschlusskriterien bestanden in angeborenen Herzfehlbildungen mit Ausnahme des Vorhofseptumdefekts und des Ventrikelseptumdefekts. Drei Kinder wurden im Verlauf der Probensammlung ausgeschlossen. Hier handelte es sich um ein Kind mit einer hypertrophen obstruktiven Kardiomyopathie, ein Kind mit einer Fallot-Tetralogie sowie ein Kind mit Lungenhypoplasie und Sepsis.

In der Studie befanden sich Drillinge sowie sieben Zwillingspaare. Zudem drei Zwillingspaare, von denen jeweils nur ein Kind in die Studie mit eingeschlossen werden konnte.

Bei allen Kindern wurden am 2. - 4. Lebenstag eine echografische Routineuntersuchung sowie ein Schädel-Ultraschall durchgeführt. Zudem wurde an diesem Tag eine Urinprobe gesammelt. Echokardiografisch wurden der Zustand des Duktus (offen vs. geschlossen) sowie die *La/Ao-ratio* ermittelt. Zusätzlich erfolgte vor der Entlassung aus der Klinik eine Echokardiografie mit Bestimmung der *La/Ao-ratio*.

Zum Zeitpunkt der ersten Echokardiografie (2. - 4. Lebenstag) hatten 26 Kinder einen PDA, im weiteren Verlauf wurden davon acht Kinder pharmakologisch mit Ibuprofen behandelt. Bei einem dieser Kinder musste nach erfolgloser pharmakologischer Therapie und klinisch weiterhin bestehenden Kriterien für einen hrPDA eine operative Ligatur erfolgen.

Abbildung 1 gibt einen Überblick der Probandenverteilung auf die einzelnen Gruppen.

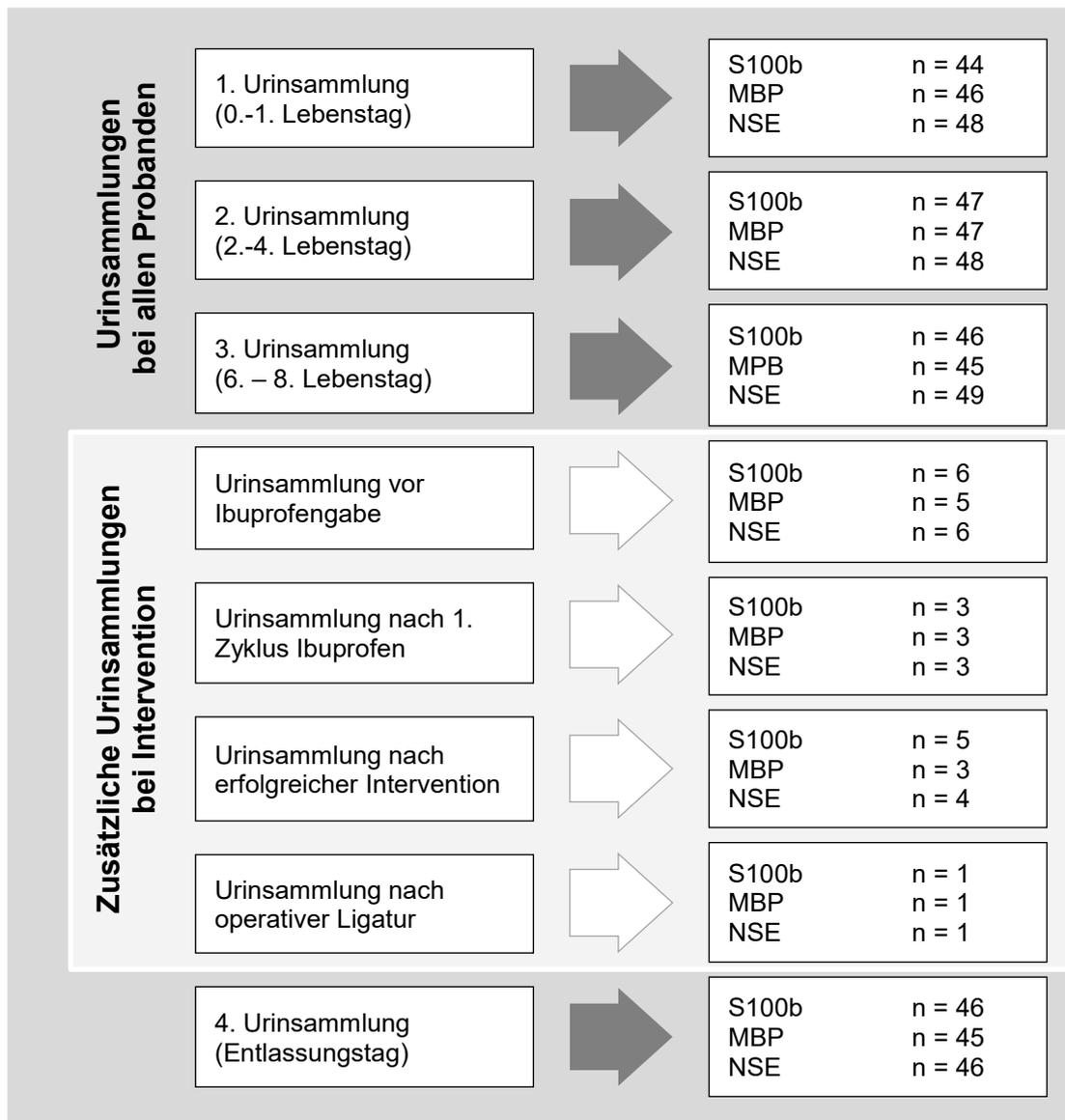


**Abbildung 1: Verteilung der Probanden auf die Gruppen**

## 2.2 Versuchsplanung und Ablauf

Die Urinproben wurden jeweils zu vier fixen Zeitpunkten gesammelt. Dazu zählte der 0. - 1. Lebenstag, der 2. - 4. Lebenstag, der 6. - 8. Lebenstag sowie der Entlassungstag. Zusätzlich wurde bei den Kindern, die eine Intervention erhielten, vor der Intervention sowie mindestens 24 Stunden nach dem ersten abgeschlossenen Zyklus der Intervention, ein Urin gesammelt. Nach klinischem Erfolg bzw. abgeschlossener Intervention wurde zusätzlich ein Urin gesammelt.

Bei dem Kind, dessen Duktus ligiert wurde, wurden vorher 3 Versuche mit Ibuprofen unternommen. Da die pharmakologische Therapie keinen hinreichenden Erfolg brachte, wurde der Duktus operativ ligiert. Hier erfolgte 48 Stunden nach Ligatur eine Urinsammlung. Abbildung 2 zeigt den Ablauf der Urinsammlungen aller Kinder sowie die zusätzlichen Urinsammlungen im Rahmen der pharmakologischen Intervention inklusive der Probandenanzahl pro untersuchten Marker zum jeweiligen Zeitpunkt.



**Abbildung 2: Zeitpunkte der Urinprobenentnahme mit Versuchspersonenanzahl pro quantifiziertem Marker**

Bei der Probensammlung wurde jeweils das aktuelle Gestationsalter der Kinder dokumentiert. Zusätzlich wurden Creatinin- sowie Laktat-Werte im Urin bestimmt. Der Urin wurde ab dem 15. August 2011 mit üblichen Mulltupfern gesammelt. Der vorherige Versuch der Probensammlung mit Damen-Slipeinlagen wurde aufgrund von Ausflockungen und dadurch bedingter Probenzerstörungen verworfen. Die Mulltupfer wurden vom Pflegepersonal bei den routinemäßigen Pflegerunden in die Windel der Kinder gelegt, bei der nächsten Pflegerunde entfernt und kühl gelagert. So entstand keine zusätzliche Belastung der Kinder. Die Proben wurden innerhalb einer Stunde bei 3000 Umdrehungen pro Minute für 3 Minuten zentrifugiert und bei -80 °C eingefroren oder bei -20 °C für maximal 24 Stunden zwischengelagert. Vor dem Einfrieren bei -80 °C wurde mit Hilfe eines Blutgasanalysegerätes das Laktat bestimmt. Zusätzlich wurde eine Urinprobe an das Zentrallabor des Uniklinikums Düsseldorf verschickt, um die Creatininkonzentration bestimmen zu lassen. Der Rest des Urins wurde bis zu den weiteren Untersuchungen (innerhalb einer Jahresfrist) bei -80 °C eingefroren.

## 2.3 Material und Geräte

Die folgende Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der verwendeten Geräte.

Gerät	Firma	Firmensitz
Vortex-Gerät Reax top	Heidolph Instruments GmbH und Co. KG	Schwabach, Deutschland
Pipetten Thermo Electron Scientific (verschiedene Größen)	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
Pipetten (verschiedene Größen)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen Tip One sterile (verschiedene Größen)	StarLab GmbH	Hamburg, Deutschland
Wärmeschrank Hera Cell	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
Photospektrometer Tecan infinite m200	Tecan Group	Männedorf, Deutschland
Taumel-Wipptisch Biometra WT12	Biometra	Göttingen, Deutschland
Eppendorf-Hütchen 1.5 ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Akku-Pipette Pipetboy (5/10 ml)	Integra Bioscience GmbH	Biebertal, Deutschland
Pipetten Stripetten (5/10 ml)	Corning Incorporated	Tewksbury, USA
Ständer für Eppendorf-Hütchen	Neolab	Heidelberg, Deutschland
Blutgasanalyse-Gerät Autocheck ABL700 Series	Radiometer	Copenhagen, Dänemark
Blutgasanalyse Kapillare Clinitubes (90 µl)	Radiometer	Copenhagen, Dänemark

<b>Zentrifuge Labofuge 400 Heraeus Function Line</b>	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
<b>Kühlschrank (handelsüblich)</b>	Miele	Gütersloh, Deutschland
<b>Tiefkühlagergerät Hera freeze HFU 686 Basic</b>	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
<b>Röhren 50 ml Falcon</b>	BD Biosciences	San Jose, USA

**Tabelle 1: Materialien und Geräte mit Herstellernachweis**

## **2.4 Quantitative Bestimmung der Proteinkonzentrationen mit Hilfe des ELISA bzw. ECLIA**

Für die quantitative Bestimmung der Proteine wurden für S100b und MBP *ELISA-kits* (*Enzyme-Linked-Immunesorbent-Assay*) verwendet. Die Bestimmung des NSE wurde mittels eines *Elektro-Chemo-Lumineszenz-Immuno-Assay*, kurz ECLIA, vom Zentrallabor des Uniklinikums Düsseldorf ermittelt, da hierfür keine geeigneten *ELISA-kits* erhältlich waren. Die Bestimmung des NSE mit Hilfe des ECLIA wurde zuvor getestet, da dieses Verfahren nur für die Messung im Serum etabliert ist.

Um die Messung mittels ELISA durchzuführen wurden alle Proben zuvor auf Raumtemperatur gebracht und mit Zuhilfenahme eines Vortexgerätes vermischt. Es wurden in jedem Schritt stets neue Eppendorfpipetten verwendet. Eine *multichannel*-Pipette fand bei den Lösungen, mit Ausnahme der Standardreihe und der einzelnen Patientenproben, Verwendung. Jede Probe wurde zweimal aufgetragen und aus den Mittelwerten das Ergebnis ermittelt. Die Mikrotiterplatten wurden vor Benutzung jeweils zweimal gewaschen, was im Falle des MBP vom Protokoll des Herstellers abwich. Nach jeder Inkubation wurde die Mikrotiterplatte mit einer in den *kits* vorhandenen Folie abgedeckt und nach Protokollvorgaben inkubiert. Im Fall des MBP wurde die Mikrotiterplatte in einem Wärmeschrank lichtgeschützt verwahrt. S100b wurde bei Raumtemperatur unter ständiger Bewegung durch einen Mikrotiterplatten-Schüttler inkubiert.

### 2.4.1 Die quantitative Bestimmung von S100b mittels ELISA

Die Bestimmung der S100b-Konzentrationen wurde das YK15 S-100b ELISA Kit der Firma Yanaihara Institute Inc., Shizuoka, Japan verwendet.

Im Kit befinden sich:

- Eine mit dem Antikörper gegen S100β beschichtete Mikrotiterplatte mit 96 *wells*
- 5 ng Boviner-S100β Standard, welcher mit 1 ml Verdünnungspuffer verdünnt wurde. Daraus wurden mit einer Verdünnungsreihe 7 Standards konstruiert: STD 1: 5 ng/ml, STD 2: 2.5 ng/ml, STD 3: 1.25 ng/ml, STD 4: 0.625 ng/ml, STD 5: 0.313 ng/ml, STD 6: 0.156 ng/ml, STD 7: 0.078ng/ml, STD 0: 0 pg/ml
- 50 ml konzentrierter Waschpuffer, welcher mit 950 ml destilliertem Wasser zu 1000 ml verdünnt wurde
- 20 ml gebrauchsfertiger Phosphatpuffer
- 11 ml Biotinylierter Hasen-Anti-Rind-S100-Antikörper
- 11 ml SA-HRP Lösung (Peroxidase markiertes Streptavidin)
- 26 ml Substratpuffer
- 2 OPD-Tabletten zur Herstellung des Substrats (o-Phenylenediamin Dihydrochlorid)
- 11 ml gebrauchsfertige Stopplösung (1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- 4 Abdeckfolien

Die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll.

Im 1. Schritt wurden die Mikrotiterplatten dreimal mit 0.2 ml/*well* gewaschen.

Im 2. Schritt wurden jeweils 100 µl Phosphatpuffer in jedes *well* gegeben. Anschließend wurde der zuvor mit Hilfe einer Verdünnungsreihe gefertigte Standard in die *wells* pipettiert. Alle weiteren *wells* wurden einzeln mit 20 µl der Patientenproben befüllt. Für diesen Schritt wurde die Zeit von 30 Minuten nicht überschritten. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte abgedeckt und für 3 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler inkubiert.

Im 3. Schritt wurde der Inhalt der *wells* verworfen und viermal mit jeweils 0.2 ml/*well* gewaschen. Daraufhin wurden jeweils 100 µl Antikörper-Lösung in die *wells* pipettiert und

die Mikrotiterplatte für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler inkubiert.

Im 4. Schritt wurde wiederum der Inhalt der *wells* verworfen und viermal, wie zuvor beschrieben, gewaschen. Daraufhin wurden 100 µl SA-HRP Lösung in die *wells* gegeben und dies wiederum für 1 Stunde, wie zuvor beschrieben, inkubiert.

Im 5. Schritt wurde zur Herstellung der Substratlösung die OPD-Tablette in 12 ml Substratpuffer aufgelöst und vermischt. Die Mikrotiterplatte wurde fünfmal gewaschen und 100 µl der somit entstandenen Substratlösung in die *wells* gegeben. Die abgedeckte Mikrotiterplatte wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur für die Farbreaktion stengelassen.

Im 6. Schritt wurden jeweils 100 µl Stopplösung in die *wells* gegeben und die Farbreaktion unterbrochen. Die Extinktion der Farbreaktion wurde direkt im Anschluss mit Hilfe des Mikrotiterplattenphotometers „Tecan infinite m200“ bei 450 nm gemessen und mit dem Programm „Magellan“ berechnet.

#### **2.4.2 Die quantitative Bestimmung des Myelin *basic protein* (MBP) mittels ELISA**

Zur Bestimmung der Konzentrationen des MBP wurde das E90539 Hu *enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for Myelin basic protein* der Firma Usen Life Science Inc., Wuhan, China verwendet.

Im *kit* befinden sich:

- Eine beschichtete Mikrotiterplatte mit 96 *wells*
- Standard (gefriergetrocknet), welcher mit 1 ml Standardverdünner verdünnt wurde. Daraus wurden mit einer Verdünnungsreihe mit 7 Standards konstruiert: STD 1: 1000 pg/ml, STD 2: 500 pg/ml, STD 3: 250 pg/ml, STD 4: 125 pg/ml, STD 5: 62.5 pg/ml, STD 6: 31.2 pg/ml, STD 7: 15.6 pg/ml, STD 0: 0 pg/ml
- 120 µl Detektionsreagenz A, welches mit 6 ml des Assay-Verdünner A und 6 ml destilliertem Wasser vermischt wird

- 120 µl Detektionsreagenz B, welches mit 6 ml des Assay-Verdünner B und 6 ml destilliertem Wasser vermischt wird
- 6 ml zweifach konzentrierter Assay-Verdünner A
- 6 ml zweifach konzentrierter Assay-Verdünner B
- 9 ml TMB Substrat (Tetramethylbenzidin)
- 20 ml konzentrierter Waschpuffer, der mit 580 ml destilliertem Wasser zu 600 ml verdünnt wurde
- 20 ml Standardverdünner
- 4 Abdeckfolien
- 6 ml gebrauchsfertige Stopplösung

Die Durchführung erfolgte, abgesehen von zwei Waschvorgängen vor Beschichtung der Platten mit dem Standard bzw. den Proben und nach der ersten Inkubationszeit von 2 Stunden, nach dem Herstellerprotokoll. Dies wurde durch einen Testlauf entschieden, bei dem sich zeigte, dass die Mikrotiterplatte sonst unregelmäßig beschichtet wird, was sich auf die Qualität des ELISAs auswirkt.

Im 1. Schritt wurde zweimal mit 0.2 ml/*well* gewaschen. Hierbei wurde der Waschpuffer für 1-2 Minuten im *well* belassen.

Im 2. Schritt wurden je 100 µl des Standards bzw. der Patientenproben pipettiert. Danach wurde die Mikrotiterplatte mit einer Folie abgedeckt und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Im 3. Schritt wurde abweichend vom Herstellerprotokoll der Inhalt der *wells* verworfen und dreimal, wie bereits beschrieben, gewaschen. Dies wurde durch einen Testlauf entschieden, bei dem eine unregelmäßige Benetzung der *wells* auffiel. Anschließend wurden 100 µl des zuvor hergestellten Detektionsreagenz A in jedes *well* pipettiert, abgedeckt und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

Im 4. Schritt wird der Inhalt der *wells* verworfen und dreimal gewaschen. Im Anschluss wurden jeweils 100 µl des zuvor hergestellten Detektionsreagenz B in die *wells* pipettiert, abgedeckt und bei 37 °C 30 Minuten lang inkubiert.

Im 5. Schritt wurde fünfmal gewaschen und 90 µl Substratlösung in jedes *well* gegeben und für 10-15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dabei färbte sich der Inhalt der *wells* blau.

Im 6. Schritt wurden je 50 µl Stopplösung in die *wells* gegeben. Der Inhalt färbte sich gelb. Direkt im Anschluss wurde die Extinktion im Mikrotiterplattenphotometer „Tecan infinite m200“ bei 450 nm gemessen und mit dem Softwareprogramm „Magellan“ berechnet.

### **2.4.3 Quantitative Bestimmung der Neuronen-spezifischen Enolase (NSE) mittels ECLIA**

Die quantitative Bestimmung der NSE wurde vom Zentrallabor des Uniklinikums Düsseldorf mit Hilfe des *Elektro-Chemo-Lumineszenz-Immuno-Assay* (ECLIA) zur Bestimmung von NSE im Humanserum der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Referenznummer: 12133113 122, durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen immunologischen *in vitro*-Test zur quantitativen Bestimmung der NSE in Humanserum. Nach einem Testlauf und Rücksprache mit dem Zentrallabor, entschlossen wir uns für dieses Verfahren zur Bestimmung der NSE im Urin.

Im Test-*kit* enthalten sind:

- 6.5 ml Streptavidin-beschichtete Mikropartikel
- 10 ml biotinylierter monoklonaler Anti-NSE-Antikörper
- 10 ml monoklonaler Rutheniumkomplex-markierter Anti-NSE Antikörper

Testprinzip:

Bei dem ECLIA handelt es sich um ein *Sandwich*-Prinzip.

Im 1. Schritt werden 20 µl der Probe mit einem biotinylierten monoklonalen NSE-spezifischen Antikörper und einem mit einem Ruthenium-Komplex markierten monoklonalen NSE-spezifischen Antikörper zusammengebracht. Diese bilden einen *Sandwich*-Komplex.

Im 2. Schritt werden Streptavidin-beschichtete Mikropartikel hinzugegeben. Durch Interaktionen zwischen Biotin und Streptavidin wird der *Sandwich*-Komplex an die Festphase gebunden.

Dieses Gemisch wird im 3. Schritt in die Messzelle gegeben. Durch magnetische Wirkung werden die Mikropartikel an die Elektroden gebunden, sodass danach die ungebundenen Substanzen durch ProCell entfernt werden können.

Durch eine angelegte Spannung wird im 4. Schritt die Chemilumineszenzemission induziert. Diese kann dann mit Hilfe eines Photomultiplers gemessen werden.

Die Werte werden mit Zuhilfenahme einer Geräte-spezifischen *master*-Kurve sowie einer 2-Punkt-Kalibration und der daraus entstehenden Kalibrationskurve, ermittelt.

Testdauer: 18 Minuten

Die Proben wurden entweder direkt verschickt oder bei -80 °C gelagert. Sie wurden jeweils auf Raumtemperatur gebracht und direkt dem Zentrallabor übersandt. Hier erfolgte zudem die Kalibrierung der Reagenzcharge.

Das Gerät ermittelt selbstständig die Konzentration in ng/ml.

## 2.5 Datenanalyse

Die Daten wurden mit dem Programm GraphPad Prism5 analysiert.

Bei der deskriptiven Statistik wurden Mittelwerte, Mediane, Standardfehler, Standardabweichungen, Minima, Maxima, Probandenanzahl der untersuchten Parameter und Gruppen berechnet und verglichen. Die graphische Darstellung der Vergleiche erfolgte mit *boxplots*.

Für den Vergleich zwischen den Gruppen wurde ein t-Test durchgeführt.

Bei Korrelationen wurde die Pearson-Korrelation verwendet. Die Werte wurden nach Transformation der Daten mit dem natürlichen Logarithmus ermittelt. Hier wurden jeweils das Konfidenzintervall und der p-Wert errechnet. Zusätzlich ist die Regressionsgerade dargestellt. Die graphische Darstellung erfolgte in der Originalskala oder logarithmischen Skala.

Ab einem Signifikanz-Wert von  $p < 0.05$  wurden die Rechnungen als statistisch signifikant gewertet.

### 3. Ergebnisse

Unter den 50 Frühgeborenen unseres Patientenkollektivs waren 26 Kinder weiblich (52 %) und 24 Kinder männlich (48 %). Das Geburtsgewicht reichte von 405 g bis 1500 g. (Median: 1170 g, Mittelwert: 1074 g). Das Gestationsalter reichte von 24 + 3 SSW – 35 + 2 SSW (Median: 28.3 SSW, Mittelwert: 28.63 SSW).

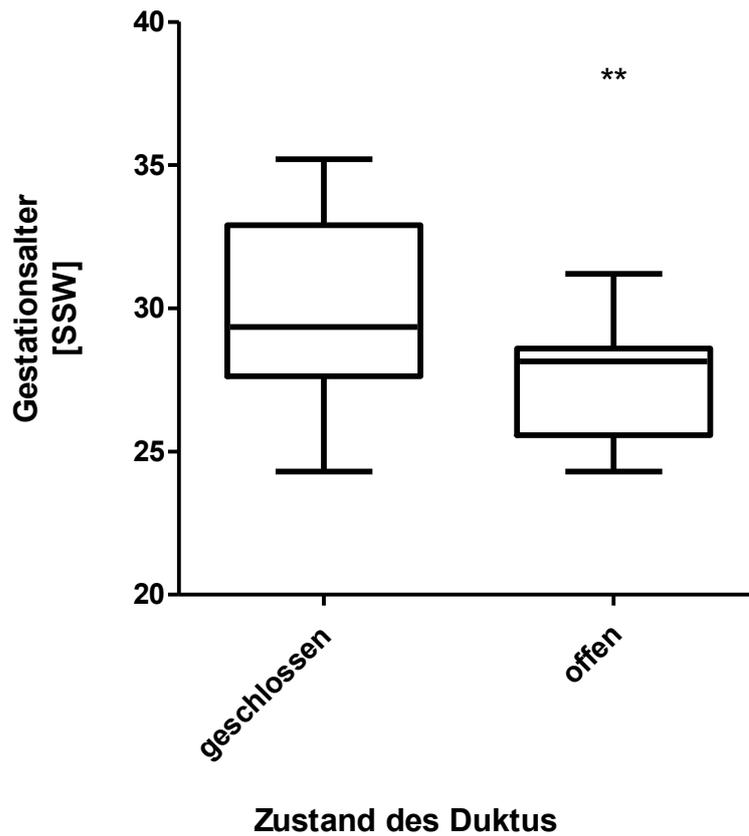
Im Folgenden werden die Kinder, deren Duktus am 2. - 4. Lebenstag verschlossen war als Kontrollgruppe, die Kinder deren Duktus zu diesem Zeitpunkt noch offen war als PDA-Gruppe und die Kinder, der PDA-Gruppe, welche eine Intervention erhielten als Interventionsgruppe bezeichnet. Die Mittelwerte, Standardabweichungen, Minima, Maxima und die Probandenzahl pro untersuchten Parameter für die Kontroll- und die PDA-Gruppe sind gesondert den Tabelle 2 und 3 zu entnehmen.

#### 3.1 Vergleich der Gruppen

Die folgenden Ergebnisse vergleichen die Kontrollgruppe und PDA-Gruppe sowie die Kinder der PDA-Gruppe, die durch spätere Therapieindikationsstellung (Interventionsgruppe) behandelt wurden anhand der Parameter Gestationalalter, Geburtsgewicht, und der schädelsonografischen Marker *resistance*-Index (RI), maximale systolische Flussgeschwindigkeit (Vmax. syst.) und enddiastolische Flussgeschwindigkeit (Vend. diast.).

### 3.1.1 Vergleich der Gruppen hinsichtlich des Gestationsalters

Vergleicht man die einzelnen Gruppen, so stellt man fest, dass gerade vom PDA betroffene Kinder ein niedrigeres Gestationsalter aufweisen. So reicht das Gestationsalter der PDA-Gruppe von der 24.3 SSW - 31.2 SSW (Median: 28.15 SSW, Mittelwert: 27.56 SSW), hingegen dass der Kinder mit schon geschlossenem Duktus zu diesem Zeitpunkt von der 24.3 - 35.2 SSW, jedoch liegt hier der Median mit 29.35 SSW und der Mittelwert mit 29.78 SSW deutlich höher. Der Unterschied ist mit einem p-Wert von 0.0040 signifikant. Vergleicht man nun noch die Kinder der PDA-Gruppe, deren offener Duktus als behandlungsbedürftig eingeschätzt wurde und die daraufhin eine Intervention erhielten (Interventionsgruppe), so findet man eine Spanne von der 24.3 SSW - 29.1 SSW. Hier liegt der Median bei 26.45 SSW und der Mittelwert bei 26.79 SSW. Vergleicht man die Interventionsgruppe mit der Kontrollgruppe, so ist, wie zu erwarten, auch dieser Unterschied signifikant ( $p = 0.02$ ). Nimmt man nun die Interventionskinder, welche in der PDA-Gruppe mit eingeschlossen sind heraus und vergleicht diese 8 Kinder (Mittelwert: 26.79 SSW, Median: 26.45 SSW) mit dem restlichen 18 Kindern mit PDA, aber ohne Intervention (Mittelwert: 27.86 SSW, Median: 28.2 SSW), so kann man keinen signifikanten Unterschied, sondern nur einen Trend im Gestationsalter feststellen ( $p = 0.1783$ ). Insgesamt zeigt sich, dass gerade die Interventionsgruppe das geringste Gestationsalter aufweist. Abbildung 3 zeigt, dass das Gestationsalter der Kinder mit offenem Duktus am 2. - 4. Lebenstag geringer ist, als dass der Kinder, deren Duktus zu diesem Zeitpunkt schon verschlossen ist. So weist die PDA-Gruppe ein geringeres Gestationsalter auf als die Kontrollgruppe. Abbildung 4 zeigt den Vergleich zwischen der Kontroll- und der Interventionsgruppe. Die Korrelation zwischen dem Gestationsalter und unseren untersuchten Markern, ist dem Abschnitt 3.4 zu entnehmen.

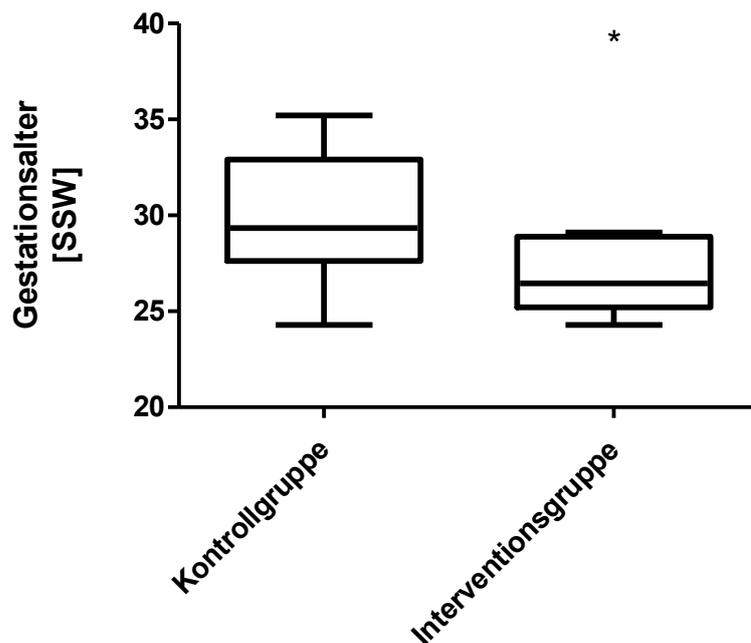


**Abbildung 3: Vergleich Gestationsalter mit dem Zustand des Duktus**

SSW: Schwangerschaftswochen, Gestationsalter in SSW,  $p = 0.0040$ , Duktus geschlossen: Mean  $\pm$  SEM:  $29.78 \pm 0.6593$ ,  $n = 24$ , Duktus offen: Mean  $\pm$  SEM:  $27.56 \pm 0.3568$ ,  $n = 26$ , 95 % KI: 0.7405 bis 3.695

Die Abbildung zeigt den Vergleich von Gestationsalter und Zustand des Duktus am 2. - 4. Lebenstag. Der Zustand des Duktus wurde routinemäßig via Echokardiografie bestimmt.

Es zeigt sich ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Gestationsalter und dem Zustand des Duktus. Je unreifer ein Kind, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit dafür, dass der Duktus am 2. - 4. Lebenstag noch offen ist.



**Abbildung 4: Vergleich des Gestationsalters zwischen der Kontroll- und der Interventionsgruppe**

SSW: Schwangerschaftswochen, Gestationsalter in SSW,  $p = 0.02$ , Kontrollgruppe: Mean  $\pm$  SEM:  $29.78 \pm 0.6593$ ,  $n = 24$ , Interventionsgruppe: Mean  $\pm$  SEM:  $26.79 \pm 0.6916$ ,  $n = 8$ , 95 % KI: 0.5059 bis 5.477

Der Zustand des Duktus wurde routinemäßig am 2. - 4. Lebenstag via Echokardiografie bestimmt. Kinder der Interventionsgruppe fielen erst im Verlauf in diese Gruppe, wenn sich bei vorhandenem PDA eine Therapieindikation ergab.

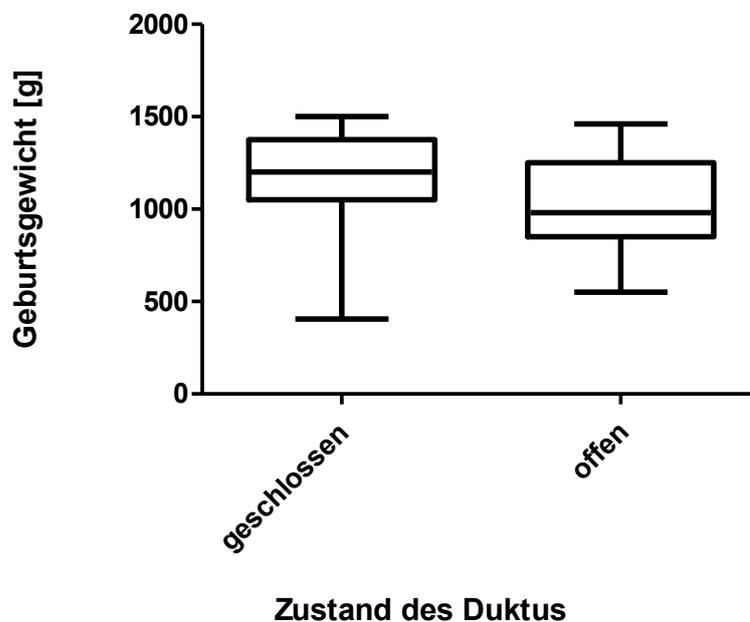
Abbildung 4 zeigt den Vergleich der Kontroll- und Interventionsgruppe bezogen auf das Gestationsalter. Es zeigt sich, dass die Kinder der Interventionsgruppe im Gegensatz zur Kontrollgruppe ein geringeres Gestationsalter aufweisen.

### 3.1.2 Vergleich der Gruppen hinsichtlich des Geburtsgewichts

Betrachtet man das Geburtsgewicht, so findet man bei der Kontrollgruppe eine Spanne von 405 - 1500 g, der Median liegt bei 1200 g und der Mittelwert bei 1127 g. PDA-Kinder weisen in etwa die gleiche Gewichtsspanne (550 - 1460 g) auf, jedoch zeigt sich ein deutlich geringerer Median von 980 g und ein Mittelwert von 1024 g. Der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der PDA-Gruppe ist mit einem p-Wert von 0.2389 nicht signifikant. Unterteilt man Letztere noch in die Kinder, die eine Intervention erhielten, so findet man

hier die leichtesten Kinder. (550 - 925 g, Median: 850 g, Mittelwert: 781.9 g). Vergleicht man die Kontrollgruppe mit der Interventionsgruppe, so findet man einen hoch signifikanten Unterschied ( $p = 0.0089$ ). Vergleicht man nun die 8 Kinder der Interventionsgruppe mit den Kindern der PDA-Gruppe, die keine Intervention erhielten, so zeigt sich auch hier ein hoch signifikanter Unterschied ( $p = 0.0006$ ). Der Mittelwert  $\pm$  SEM liegt bei der PDA-Gruppe ohne Intervention bei  $1137 \text{ g} \pm 56.24 \text{ g}$  vs.  $781.9 \text{ g} \pm 47.49 \text{ g}$  bei der Interventionsgruppe. Es zeigt sich, dass die Interventionskinder ein geringeres Geburtsgewicht haben (Abbildung 6). Das leichteste Kind der Studie hatte am 2. - 4. Lebenstag einen geschlossenen Duktus.

In Abbildung 5 wird ersichtlich, dass die Kinder, deren Duktus noch offen ist, im Mittel etwas leichter sind, dieser Unterschied allerdings nicht signifikant ist.



**Abbildung 5: Vergleich Geburtsgewicht mit dem Zustand des Duktus**

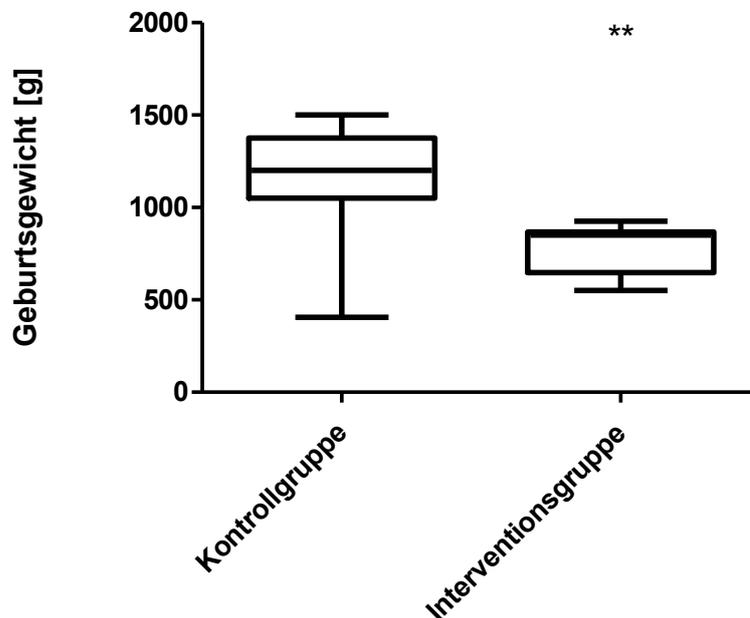
---

Geburtsgewicht in Gramm [g],  $p = 0,2389$ , Duktus geschlossen: Mean  $\pm$  SEM:  $1127 \pm 68.74$ ,  $n = 24$ , Duktus offen: Mean  $\pm$  SEM:  $1024 \pm 52.82$ ,  $n = 25$ , 95 % KI: -70.79 bis 276.6

Die Abbildung zeigt den Vergleich vom Geburtsgewicht mit dem Zustand des Duktus am 2. - 4. Lebenstag. Der Zustand des Duktus wurde routinemäßig via Echokardiografie bestimmt.

---

Abbildung 6 zeigt den Vergleich zwischen der Kontroll- und der Interventionsgruppe bezüglich des Geburtsgewichts. Es wird ersichtlich, dass Kinder, die im Verlauf einer Intervention bedürfen, ein niedrigeres Geburtsgewicht haben.



**Abbildung 6: Vergleich des Geburtsgewichts zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe**

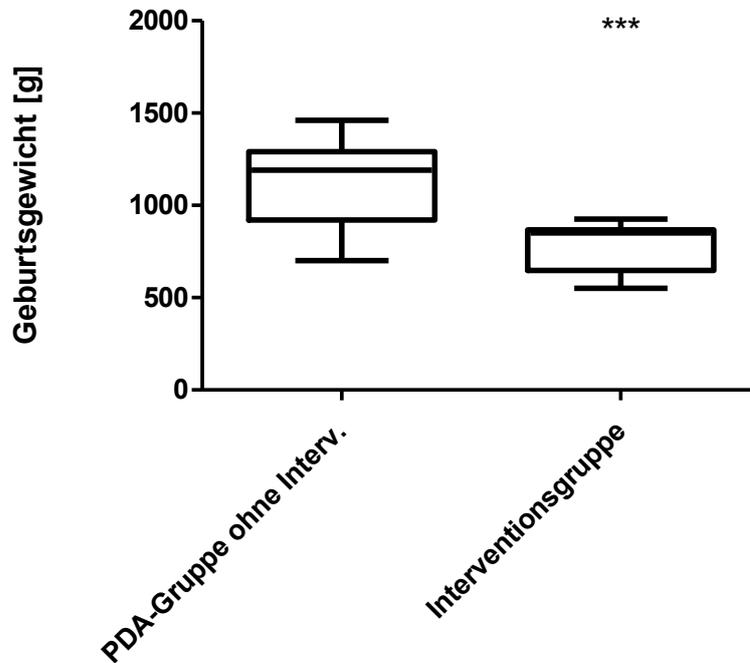
---

Geburtsgewicht in [g],  $p = 0.0089$ , Kontrollgruppe: Mean  $\pm$  SEM:  $1127 \pm 68.74$ ,  $n = 24$ ,  
Interventionsgruppe : Mean  $\pm$  SEM:  $781.9 \pm 47.49$ ,  $n = 8$ , 95 % KI:  $92.94 \pm 596.3$

Der Zustand des Duktus wurde routinemäßig am 2. - 4. Lebenstag via Echokardiografie bestimmt. Kinder der Interventionsgruppe fielen erst im Verlauf in diese Gruppe, wenn sich bei vorhandenem PDA eine Therapieindikation ergab.

---

Abbildung 7 zeigt den Vergleich der Kinder, deren Duktus zum Zeitpunkt der Echokardiografie zwar offen war, aber keiner Therapie bedurfte, mit den Kindern, deren offener PDA im Verlauf therapiert wurde. Somit teilt sich hier die PDA-Gruppe in eine PDA-Gruppe ohne Intervention und eine PDA-Gruppe mit Intervention. Letztere stellt daher die bisher auch als Interventionsgruppe bezeichnete Gruppe dar.



**Abbildung 7: Vergleich des Geburtsgewichts innerhalb der PDA-Gruppe zwischen den Kindern ohne und den Kindern mit Intervention**

Geburtsgewicht in [g],  $p = 0,0006$ , PDA-Gruppe ohne Intervention: Mean  $\pm$  SEM:  $1137 \pm 5624$  g,  $n = 17$ , Interventionsgruppe: Mean  $\pm$  SEM:  $781.9 \pm 47.49$ ,  $n = 8$ , 95 % KI: 171.8 bis 539.2

Der Zustand des Duktus wurde routinemäßig am 2. - 4. Lebenstag via Echokardiografie bestimmt. Kinder der Interventionsgruppe fielen erst im Verlauf in diese Gruppe, wenn sich bei vorhandenem PDA eine Therapieindikation ergab.

Kinder, die im Verlauf eine Intervention erhielten weisen ein geringeres Geburtsgewicht auf, als Kinder deren Duktus zum Zeitpunkt der Echokardiografie zwar offen war, jedoch im Verlauf keiner Therapie bedurfte.

### **3.1.3 Vergleich der Gruppen hinsichtlich der La/Ao-ratio**

Die La/Ao-ratio lag bei der Kontrollgruppe im Mittel bei 1.285 (Median: 1.23, 0.8 - 1.69). Bei der PDA-Gruppe zeigte sich ein sehr ähnliches Bild, der Mittelwert lag bei 1.298. (Median: 1.3, 0.8 - 2). Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p = 0.8915$ ). Betrachtet man nun die Interventionsgruppe, so findet man hier einen Mittelwert von 1.369, einen Median von 1.5 und den Maximalwert von 1.55 (0.8 - 1.55). Selbst der Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und der Interventionsgruppe ist nicht signifikant ( $p = 0.5113$ ). Somit ist hier kein Unterschied zwischen der La/Ao-ratio der Gruppen feststellbar. Die Ergebnisse der Korrelation der La/Ao-ratios mit den Markern S100b, NSE und MBP werden im Folgenden behandelt. Hier zeigte sich, dass dieser, in der Klinik häufig hinzugezogene Parameter, in unserer Studie nicht aussagekräftig war. Die Korrelationsergebnisse zwischen der La/Ao-ratio und den untersuchten Parametern S100, MBP und NSE am 2. - 4. Lebenstag ist dem Abschnitt 3.6 zu entnehmen. Die deskriptiven Ergebnisse sind in den Tabellen 2 und 3 aufgeführt.

### **3.1.4 Vergleich der Gruppen hinsichtlich der Creatininkonzentration**

Die Creatininkonzentrationen aller vier Messzeitpunkte im Urin der Kontrollgruppe lag mit einem Mittelwert  $\pm$  SEM von 12.95 mg/dl  $\pm$  1.332 mg/dl höher als in der PDA-Gruppe, welche einen Mittelwert  $\pm$  SEM von 10.14 mg/dl  $\pm$  0.5459 mg/dl aufzeigte (Kontrollgruppe: 0.6 - 89.7 mg/dl, Median: 8.85 mg/dl; PDA-Gruppe: 0.9 - 32.6 mg/dl, Median: 8.950 mg/dl). Die Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen waren nicht signifikant ( $p = 0.3375$ ). Die Kontrollgruppe hatte höhere Creatininkonzentrationen im Urin als die Interventionsgruppe (Mittelwert  $\pm$  SEM: 9.129  $\pm$  0.8357, 0.9 - 23.3 mg/dl, Median: 8.7 mg/dl), wobei sich jedoch auch hier keine Signifikanz zeigte ( $p = 0.2965$ ). In den Tabellen 2 und 3 sind weitere Ergebnisse zu den Creatininkonzentrationen aufgeführt.

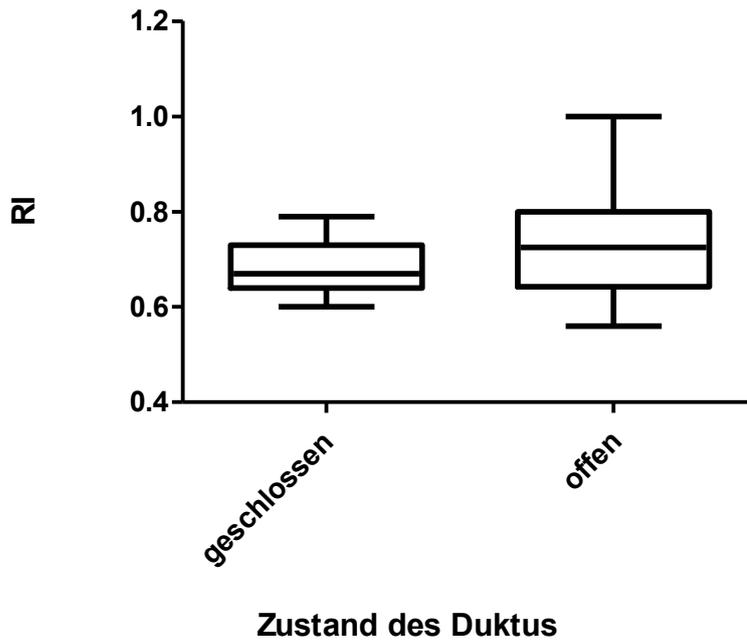
### **3.1.5 Vergleich der Gruppen hinsichtlich der Laktatkonzentration**

Der Mittelwert der Laktatkonzentrationen im Urin (von allen vier Messzeitpunkten) war bei der Kontrollgruppe (Mittelwert  $\pm$  SEM: 1.34  $\pm$  0.3268 mmol/l) etwas höher als bei der PDA-Gruppe (Mittelwert  $\pm$  SEM: 1.005  $\pm$  0.1093 mmol/l). Der Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $p = 0.8287$ ). Der Median beider Gruppen lag bei 0.7 mmol/l. Auch der Vergleich

zwischen der Kontrollgruppe und der Interventionsgruppe zeigte mit einem p-Wert von 0.7280 keinen signifikanten Unterschied. Der Median der Interventionsgruppe lag mit 0.8 mmol/l etwas höher als in den beiden anderen Gruppen, allerdings lag der Mittelwert mit 1.009 mmol/l, ähnlich wie der Mittelwert der PDA-Gruppe, etwas unter dem der Kontrollgruppe. Minima, Maxima, Standardabweichung sowie die Probandenanzahl sind den Tabelle 2 und 3 zu entnehmen.

### **3.1.6 Vergleich der Gruppen hinsichtlich der schädelsonografischen Parameter RI, Vmax syst. und Vend diast.**

In der Schädelsonografie wurde die maximale Flussgeschwindigkeit systolisch sowie enddiastolisch gemessen sowie daraus der *resistance*-Index berechnet. Der RI lag beim geschlossenen Duktus bei Mittelwert  $\pm$  SEM:  $0.6848 \pm 0.01128$  cm/sec., beim offenen Duktus mit Mittelwert  $\pm$  SEM:  $0.7219 \pm 0.02116$  cm/sec. etwas höher. Der Unterschied ist mit  $p = 0.1424$  nicht signifikant. Beide befinden sich im Normbereich, der bei  $0.73 \pm 0.08$  cm/sec. liegt. Vergleicht man den RI der Kontrollgruppe mit dem der Interventionsgruppe (Mittelwert:  $0.775 \pm 0.0436$ ), so findet sich ein hoch signifikanter Unterschied ( $p = 0.0083$ ). Abbildung 9 zeigt, dass Kinder der Interventionsgruppe einen höheren RI als Kinder mit geschlossenem Duktus zum Zeitpunkt der Echokardiografie haben. Der Mittelwert der maximalen systolischen Flussgeschwindigkeit lag beim geschlossenen Duktus bei 25.44 cm/sec., beim offenen Duktus bei 29.87 cm/sec. In der Interventionsgruppe lag die maximale systolische Flussgeschwindigkeit bei 29.59 cm/sec. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe war dieser Unterschied mit einem p-Wert von 0.1979 nicht signifikant. Die maximale diastolische Flussgeschwindigkeit lag im Mittel bei geschlossenem Duktus bei 8.113 cm/sec., bei den Kindern mit noch offenem Duktus bei 9.5171 cm/sec. und bei den 8 Kindern der PDA-Gruppe, die eine Intervention erhielten bei 8.217 cm/sec. . Im Vergleich zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe zeigte sich mit einem p-Wert von 0.9469, dass diese Gruppen sich bezüglich der enddiastolischen Flussgeschwindigkeit in der Arteria cerebri anterior (A. cereb. ant.) gleichen. Die Abbildungen 8, 9 und 11 zeigen den Vergleich der Kontroll- und PDA-Gruppe bezüglich des *resistance*-Index, maximaler systolischer Flussgeschwindigkeit und enddiastolischer Flussgeschwindigkeit sowie den Vergleich des RI zwischen der Kontroll- und der Interventionsgruppe.



**Abbildung 8: Vergleich Zustand des Duktus mit dem RI der A. cerebri ant. in der Schädelsonografie am 2. - 4. Lebensstag**

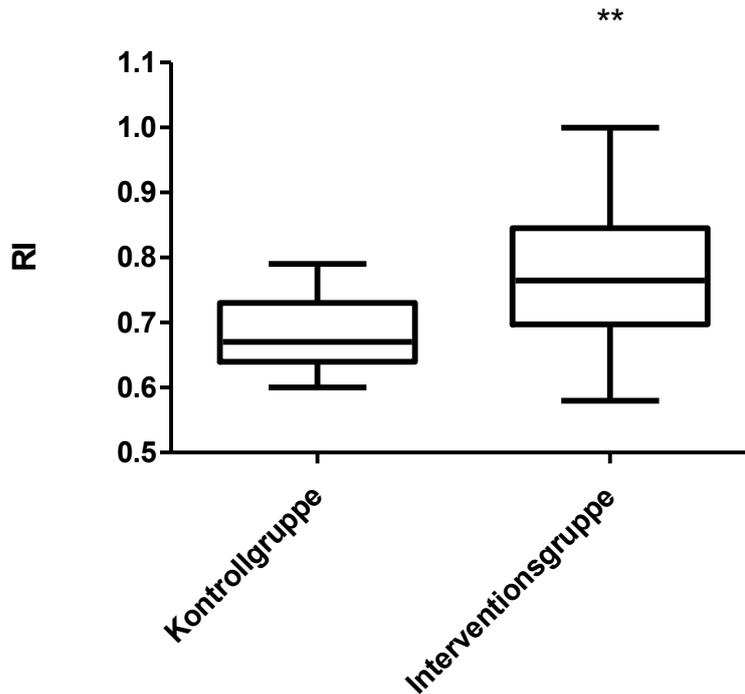
---

RI: resistance-Index, A. cerebri ant.: Arteria cerebri anterior  $p = 0.1424$ , Duktus geschlossen: Mean  $\pm$  SEM:  $0.6848 \pm 0.01128$ ,  $n = 23$ , Duktus offen: Mean  $\pm$  SEM:  $0.7219 \pm 0.02116$ ,  $n = 26$ , 95 % KI: -0.08726 bis 0.01298

Der Zustand des Duktus wurde routinemäßig am 2. - 4. Lebensstag via Echokardiografie bestimmt.

---

Abbildung 8 zeigt den RI der Arteria cerebri anterior im Vergleich mit dem Zustand des Duktus. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festzustellen.



**Abbildung 9: Vergleich zwischen der Kontroll- und der Interventionsgruppe bezogen auf den RI der A. cerebri ant. in der Schädelsonografie am 2. - 4. Lebenstag**

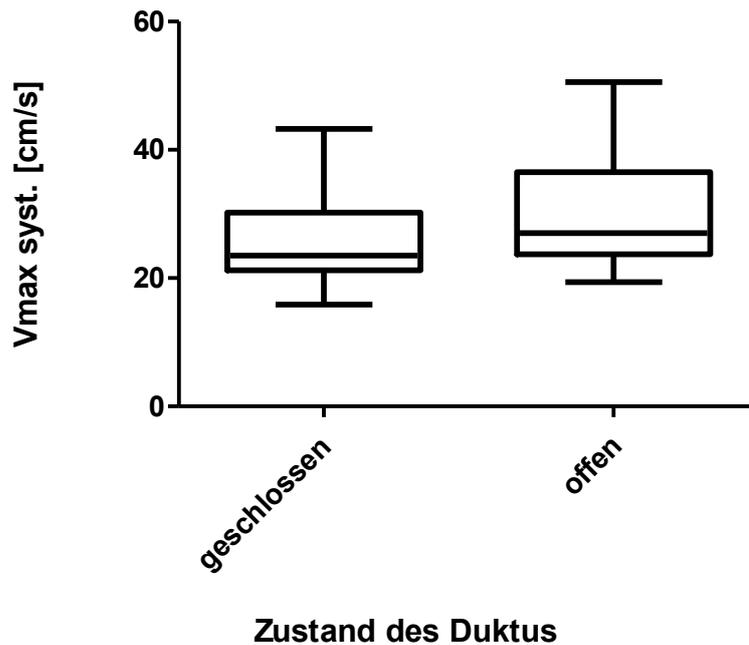
---

RI: *resistance*-Index, A. cerebri ant.: Arteria cerebri anterior  $p = 0.0083$ , Kontrollgruppe: Mean  $\pm$  SEM:  $0.6848 \pm 0.01128$ ,  $n = 23$ , Interventionsgruppe: Mean  $\pm$  SEM:  $0.775 \pm 0.04436$ ,  $n = 8$ , 95 % KI:  $-0.1553$  bis  $0.02509$

Der Zustand des Duktus wurde routinemäßig am 2. - 4. Lebenstag via Echokardiografie bestimmt. Kinder der Interventionsgruppe fielen erst im Verlauf in diese Gruppe, wenn sich bei vorhandenem PDA eine Therapieindikation ergab.

---

Die Abbildung 9 zeigt den RI der Arteria cerebri anterior im Vergleich zwischen der Kontroll- und der Interventionsgruppe. Es wird ein ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ersichtlich. Kinder der Interventionsgruppe haben einen höheren RI, als Kinder der Kontrollgruppe.



**Abbildung 10: Vergleich Zustand des Duktus mit Vmax syst. der A. cerebri ant. in der Schädelsonografie am 2. - 4. Lebenstag**

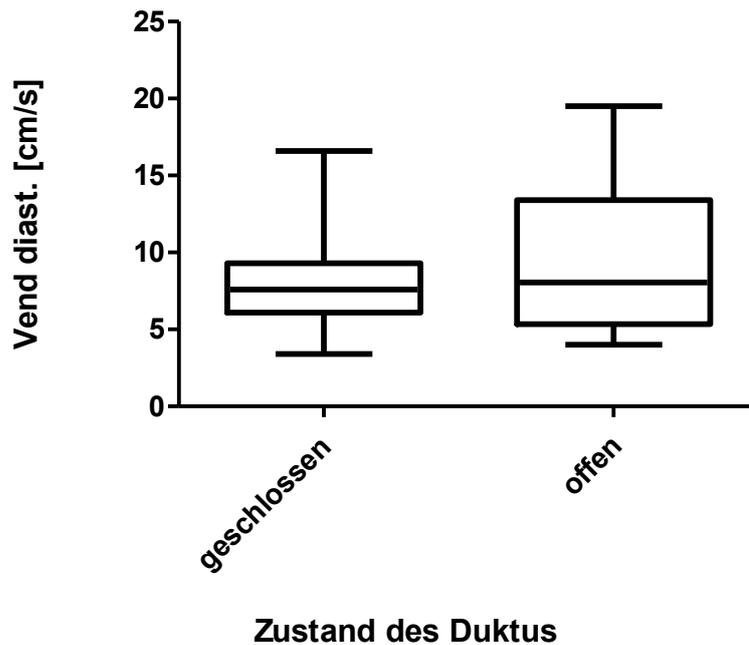
---

Vmax syst.: maximale Flussgeschwindigkeit systolisch, A. cerebri ant: Arteria cerebri anterior,  $p = 0.0530$ , Duktus geschlossen: Mean  $\pm$  SEM:  $25.44 \pm 1.409$ ,  $n = 24$ , Duktus offen: Mean  $\pm$  SEM:  $29.87 \pm 1.715$ ,  $n = 25$ , 95 % KI: -8.916 bis 0.06337

Der Zustand des Duktus wurde routinemäßig am 2. - 4. Lebenstag via Echokardiografie bestimmt

---

Die Abbildung 10 zeigt die maximale systolische Flussgeschwindigkeit in der Arteria cerebri anterior im Vergleich mit dem Zustand des Duktus. Es lässt sich ein Trend erkennen, jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Kinder mit offenem Duktus haben tendenziell erhöhte systolische Flussgeschwindigkeiten.



**Abbildung 11: Vergleich Zustand des Duktus mit Vend diast. der A. cerebri ant. in der Schädelsonografie am 2. - 4. Lebenstag**

Vend diast.: enddiastolische Flussgeschwindigkeit, A. cerebri ant.: Arteria cerebri anterior,  $p = 0.2364$ , Duktus geschlossen: Mean  $\pm$  SEM:  $8.113 \pm 0.6245$ ,  $n = 23$ , Duktus offen: Mean  $\pm$  SEM:  $9.571 \pm 1.027$ ,  $n = 24$ , 95 % KI: -3.906 bis 0.9908

Der Zustand des Duktus wurde routinemäßig am 2. - 4. Lebenstag via Echokardiografie bestimmt.

Die Abbildung 11 zeigt die enddiastolische Flussgeschwindigkeit in der Arteria cerebri anterior im Vergleich mit dem Zustand des Duktus. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist mit  $p = 0.2364$  nicht signifikant.

### **3.1.7 Übersichtstabellen der Kontroll- und der PDA-Gruppe hinsichtlich der verglichenen Parameter**

Die folgenden Tabellen 2 und 3 geben eine Übersicht der Gruppen hinsichtlich der untersuchten Parameter.

Die Tabelle 2 gibt eine Übersicht der Mittelwerte, Standardabweichungen, Minima, Maxima sowie der Probandenanzahl der untersuchten Parameter Gestationsalter, Geburtsgewicht,

La/Ao-ratio, Creatinin, und der sonografischen Parameter RI, Vmax syst., Vend diast. bei der Kontrollgruppe.

Kontrollgruppe	$\bar{x}$	SD	Min.	Max.	n
Gestationsalter [SSW]	29.78	3	24.3	35.2	24
Geburtsgewicht [g]	1127	336.7	405	1500	24
La/Ao-ratio	1.285	0.2571	0.8	1.69	13
Creatinin 0. - 1. LT [mg/dl]	13.19	11.71	3.1	47.9	24
Creatinin 2. - 4. LT [mg/dl]	13.39	17.36	0.6	89.7	23
Creatinin 6. - 8. LT [mg/dl]	11.92	6.543	0.6	30	23
Creatinin ET [mg/dl]	13.32	13.98	2.8	62.4	22
Laktat 0. - 1. LT [mmol/l]	2.546	5.892	0.2	23	24
Laktat 2. - 4. LT [mmol/l]	1.03	0.897	0.3	3.7	23
Laktat 6. - 8. LT [mmol/l]	0.9667	1.052	0.4	5.7	24
Laktat ET [mmol/l]	0.7286	0.4529	0.3	2.3	21
A. cerebri ant. RI 2. - 4. LT	0.6848	0.05409	0.6	0.79	23
A. cerebri ant. Vmax syst. 2. - 4. LT [cm/s]	25.44	6.903	15.9	43.3	24
A. cerebri ant. Vend diast. 2. - 4. LT [cm/s]	8.113	2.995	3.4	16.6	23

**Tabelle 2: Mittelwerte, Standardabweichungen, Minima und Maxima sowie Probandenzahl der Parameter Gestationsalter, Geburtsgewicht, La/Ao-ratio, Creatinin, Laktat und der sonografischen Parameter Vmax syst., Vend diast. und resistance-Index (RI) der Kontrollgruppe**

LT: Lebenstag, ET: Entlassungstag,  $\bar{x}$ : Mittelwert, SD: Standardabweichung, n: Probandenzahl, Min.: Minimum, Max.: Maximum, SSW: Schwangerschaftswochen, A. cerebri ant.: Arteria cerebri anterior, Vmax syst.: Maximaler systolischer Fluss, Vend diast.: enddiastolischer Fluss

Die folgende Tabelle 3 gibt eine Übersicht der Mittelwerte, Standardabweichungen, Minima, Maxima sowie der Probandenzahl der untersuchten Parameter Gestationsalter,

Geburtsgewicht, La/Ao-ratio, Creatinin, Laktat und der sonografischen Parameter RI, Vmax syst., Vend diast. bei der PDA-Gruppe

PDA-Gruppe	$\bar{x}$	SD	Min.	Max.	n
Gestationsalter [SSW]	27.56	2	24.3	31.2	26
Geburtsgewicht [g]	1024	264.1	550	1460	25
La/Ao-ratio	1.298	0.2629	0.8	2	23
Creatinin 0. - 1. LT [mg/dl]	10.56	7.623	3.3	30.5	26
Creatinin 2. - 4. LT [mg/dl]	8.85	3.049	0.9	15.7	26
Creatinin 6. - 8. LT [mg/dl]	9.085	3.66	3.5	18.4	26
Creatinin ET [mg/dl]	12.2	6.152	5	32.6	24
Laktat 0. - 1. LT [mmol/l]	1.015	0.9665	0.3	4.6	26
Laktat 2. - 4. Lebenstag [mmol/l]	1.269	1.613	0.2	8.6	26
Laktat 6. - 8. LT [mmol/l]	0.8962	1.003	0.3	5.4	26
Laktat ET [mmol/l]	0.8385	0.683	0.2	3.5	26
A. cerebri ant. RI 2. - 4. LT	0.7219	0.1079	0.56	1	26
A. cerebri ant. Vmax syst. 2. - 4. LT [cm/s]	29.87	8.576	19.4	50.6	25
A. cerebri ant. Vend diast. 2. - 4. LT [cm/s]	9.5071	5.033	4	19.5	24

**Tabelle 3: Mittelwerte, Standardabweichungen, Minima und Maxima sowie Probandenzahl der Parameter Gestationsalter, Geburtsgewicht, La/Ao-ratio, Creatinin, Laktat und der sonografischen Parameter Vmax syst., Vend diast. und resistance-Index (RI) der PDA-Gruppe**

LT: Lebenstag, ET: Entlassungstag,  $\bar{x}$ : Mittelwert, SD: Standardabweichung, n: Probandenzahl, Min.: Minimum, Max.: Maximum, SSW: Schwangerschaftswochen, A. cerebri ant.: Arteria cerebri anterior, Vmax syst.: Maximaler systolischer Fluss, Vend diast.: enddiastolischer Fluss

### **3.2 Vergleich der Kontroll- mit der PDA-Gruppe bezogen auf die Konzentrationen von S100b, MBP und NSE zu den vier Messzeitpunkten**

Im Folgenden finden sich die Konzentrationsunterschiede der beiden Patientengruppen hinsichtlich der Proteinkonzentrationen unserer untersuchten Marker an den vier Messzeitpunkten. Der t-test wurde nach Transformation der Ergebnisse mit dem Logarithmus naturalis berechnet.

### 3.2.1 Vergleich der Gruppen bezüglich der S100b-Konzentrationen

S100b zeigte wie in den Abbildungen 12 - 14 ersichtlich an keinem der 4 Messzeitpunkte einen Konzentrationsunterschied zwischen den beiden Gruppen.

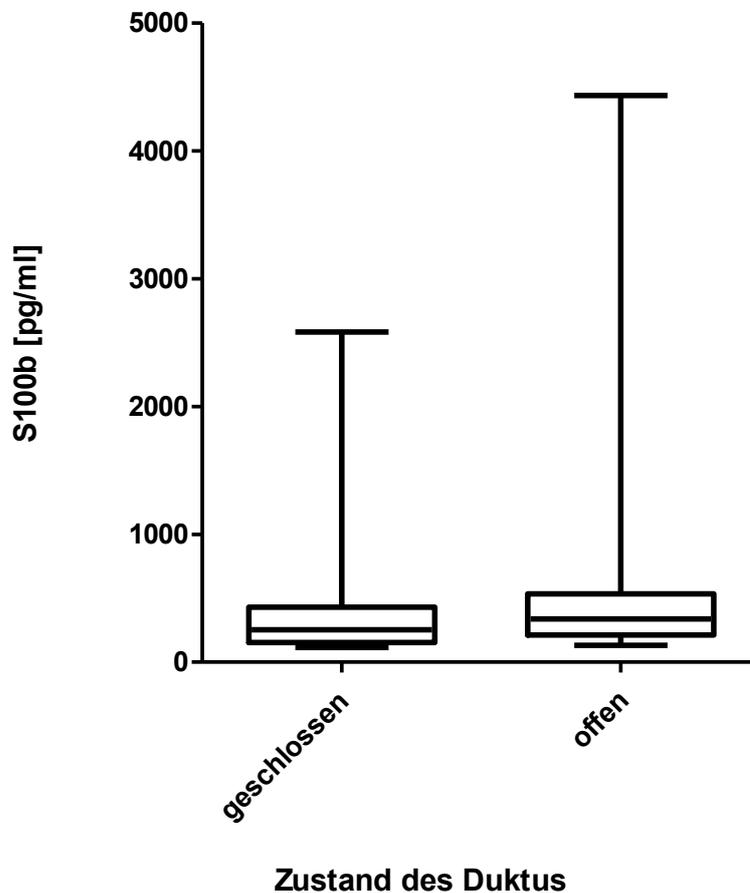


Abbildung 12: Vergleich der Konzentration von S100b am 0. - 1. Lebenstag mit dem Zustand des Duktus

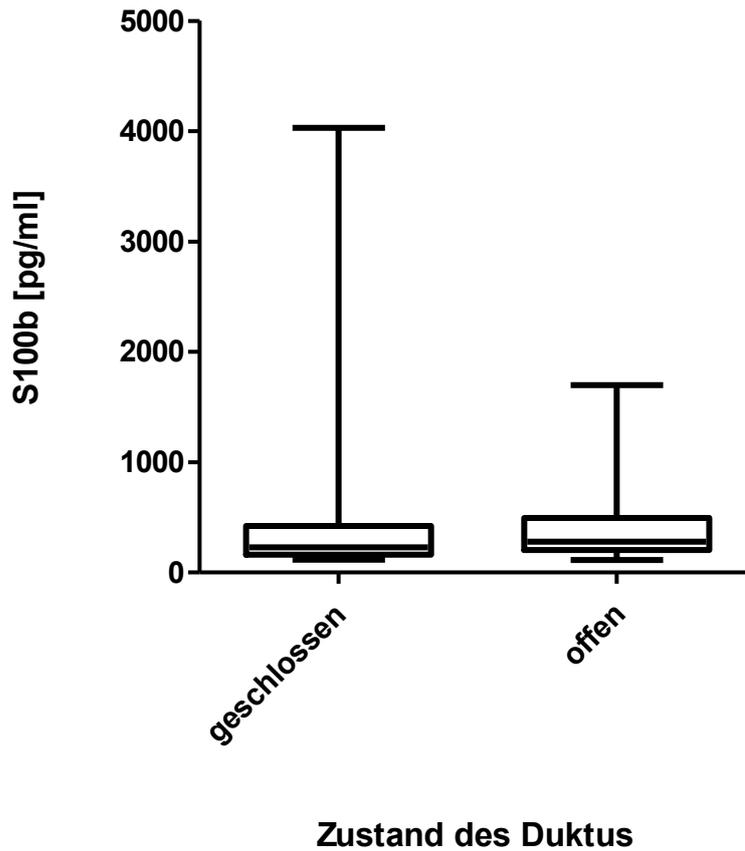
---

S100b-Konzentrationen in [pg/ml],  $p = 0.7769$ , Duktus geschlossen: Mean  $\pm$  SEM:  $587.5 \pm 181.2$ ,  $n = 19$ , Duktus offen: Mean  $\pm$  SEM:  $553.5 \pm 170.7$ ,  $n = 25$ , 95 % KI: -474.0 bis 542.0

Der Zustand des Duktus wurde routinemäßig am 2. - 4. Lebenstag via Echokardiografie bestimmt.

---

Die Abbildung 12 zeigt die Konzentrationen von S100b am 0. - 1. Lebenstag abhängig vom Zustand des Duktus. Der Zustand des Duktus wurde am 3. Lebenstag per Echokardiografie festgelegt und entspricht hier nicht dem Zustand des Duktus am 0. - 1. Lebenstag. Es lässt sich kein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen den Kindern, deren Duktus sich bis zum 2. - 4. Lebenstag verschlossen hat und den Kindern, deren Duktus über den 2. - 4. Lebenstag hinaus noch offen ist, erkennen.

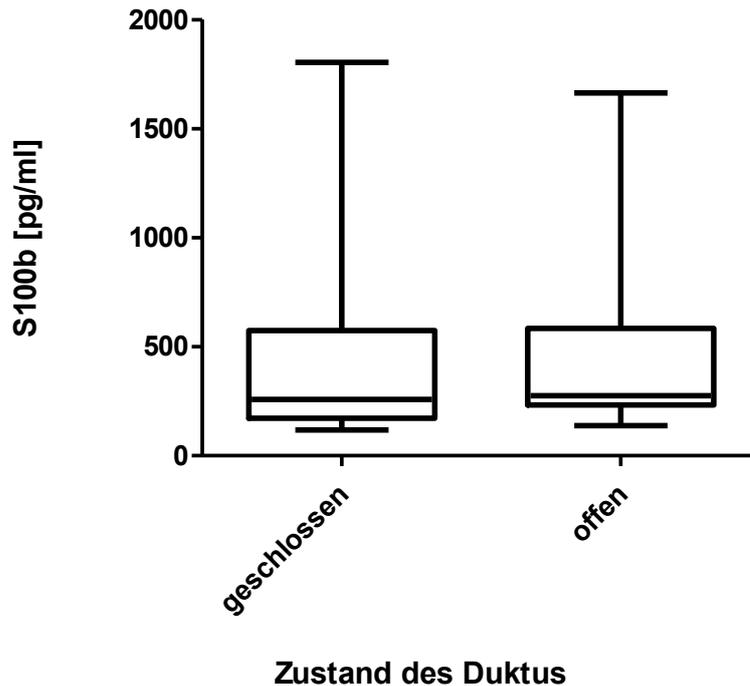


**Abbildung 13: Vergleich der Konzentration von S100b am 2. - 4. Lebenstag mit dem Zustand des Duktus**

S100b-Konzentrationen in [pg/ml],  $p = 0.7884$ , Duktus geschlossen: Mean  $\pm$  SEM:  $499.4 \pm 182.5$ ,  $n = 22$ , Duktus offen: Mean  $\pm$  SEM:  $403.5 \pm 70.41$ ,  $n = 24$ , 95 % KI: -286.1 bis 477.9

Der Zustand des Duktus wurde routinemäßig via Echokardiografie bestimmt.

Die Abbildung 13 zeigt die Konzentrationen von S100b am 2. - 4. Lebenstag abhängig vom Zustand des Duktus. Der Zustand des Duktus wurde genau in diesem Zeitraum, meist am 3. Lebenstag bzw. nach 72 Stunden (2. - 4. Lebenstag) per Echokardiografie festgelegt. Die beiden Gruppen unterscheiden sich nicht hinsichtlich der S100b Konzentration am 2. – 4. Lebenstag.

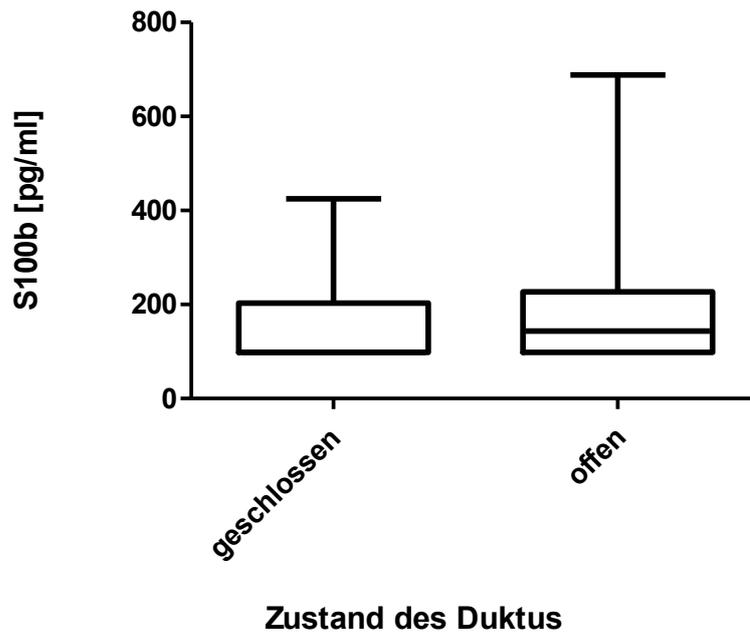


**Abbildung 14: Vergleich der Konzentration von S100b am 6. - 8. Lebenstag mit dem Zustand des Duktus**

S100b-Konzentrationen in [pg/ml], ln: Logarithmus naturalis  $p = 0.8274$ , Duktus geschlossen: Mean  $\pm$  SEM:  $479.2 \pm 101.6$ ,  $n = 22$ , Duktus offen: Mean  $\pm$  SEM:  $442.5 \pm 85.82$ ,  $n = 22$ , 95 % KI: -231.8 bis 305.2

Der Zustand des Duktus wurde routinemäßig via Echokardiografie bestimmt.

Die Abbildung 14 zeigt die Konzentrationen von S100b am 6. - 8. Lebenstag abhängig vom Zustand des Duktus. Der Zustand des Duktus wurde am 2. - 4. Lebenstag per Echokardiografie festgelegt und entspricht hier nicht dem Zustand des Duktus am 6. - 8. Lebenstag. Die Konzentrationsunterschiede zwischen den Kindern, deren Duktus sich bis zum 2. - 4. Lebenstag verschlossen hat und den Kindern, deren Duktus über den 2. - 4. Lebenstag hinaus noch offen ist, sind nicht signifikant.



**Abbildung 15: Vergleich der Konzentration von S100b am Entlassungstag mit dem Zustand des Duktus**

S100b-Konzentrationen in [pg/ml],  $p = 0,4924$ , Duktus geschlossen: Mean  $\pm$  SEM:  $157.8 \pm 22.14$ ,  $n = 22$ , Duktus offen: Mean  $\pm$  SEM:  $197.9 \pm 31.52$ ,  $n = 24$ , 95 % KI: -119.1 bis 38.9

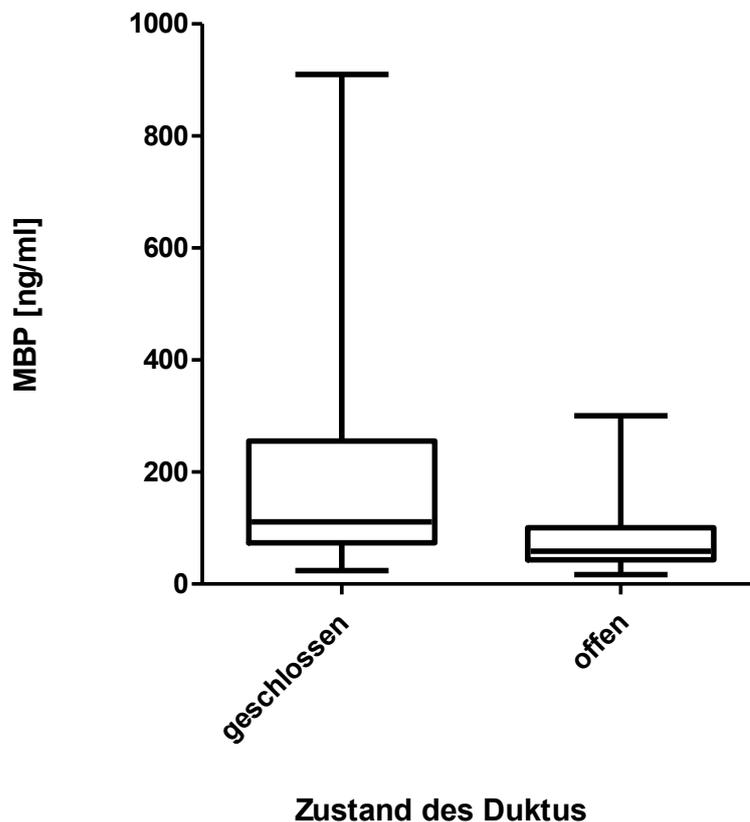
Der Zustand des Duktus wurde routinemäßig via Echokardiografie bestimmt.

Die Abbildung 15 zeigt die Konzentrationen von S100b am Entlassungstag abhängig von Zustand des Duktus. Der Zustand des Duktus wurde am 2. - 4. Lebenstag per Echokardiografie festgelegt und entspricht hier nicht dem Zustand des Duktus am Entlassungstag. Es lässt sich kein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen den Gruppen feststellen.

### 3.2.2 Vergleich der Gruppen bezüglich der MBP-Konzentration

In Abbildung 16 zeigt sich am 0. - 1. Lebenstag ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der PDA-Gruppe. Kinder mit einem geschlossenen Duktus haben mit einem  $p$  von 0.0041 signifikant höhere Konzentrationen an MBP im Urin. Dies wird auch durch die Mittelwerte von 223.1 ng/ml bei der Kontrollgruppe und 85.22 ng/ml bei der PDA-Gruppe deutlich. Wie in Abbildung 17 verdeutlicht, zeigt sich auch am 2. - 4. Lebenstag ein Unterschied, welcher mit einem  $p$  von 0.0054 hoch signifikant ist (Mittelwerte: Kontrollgruppe: 197.7 ng/ml, PDA-Gruppe: 68.98 ng/ml). Am

6. - 8. Lebenstag ist dieser Unterschied nicht mehr festzustellen (Abbildung 18). Wie an den Mittelwerten von 159.9 ng/ml bei der Kontrollgruppe und 152.4 ng/ml in der PDA-Gruppe ersichtlich, haben sich die beiden Gruppen stark angenähert ( $p = 0.9578$ ). Dies ist auch am Entlassungstag der Fall, der mit einem  $p$  von 0.1977 ebenfalls keinen signifikanten Unterschied mehr zeigt (Abbildung 19).



**Abbildung 16: Vergleich der Konzentration von MBP am 0. - 1. Lebenstag mit dem Zustand des Duktus**

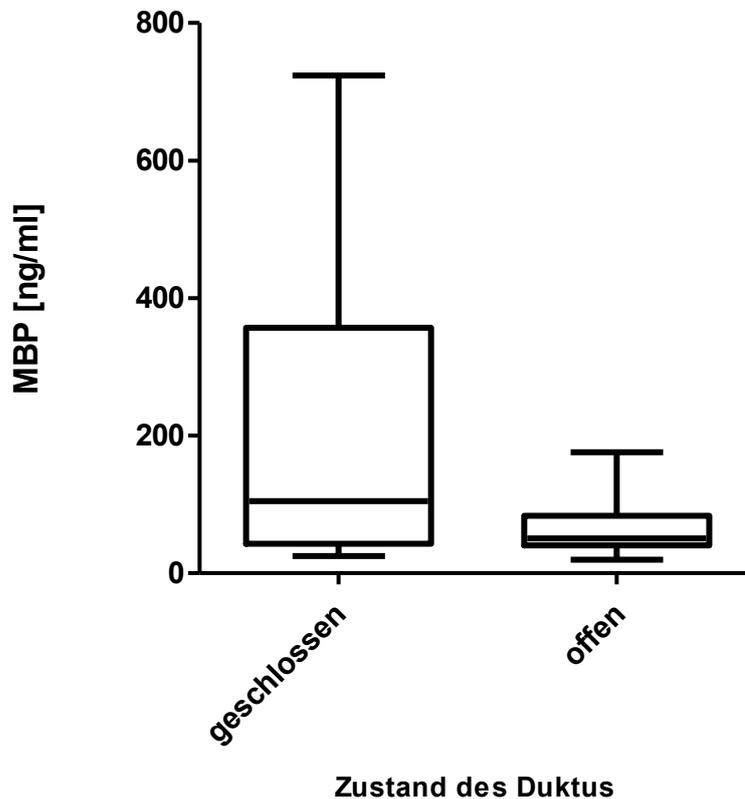
---

MBP: Myelin basic protein, MBP-Konzentration in [ng/ml],  $p = 0.0041$ , Duktus geschlossen: Mean  $\pm$  SEM:  $223.1 \pm 55.9$ ,  $n = 21$ , Duktus offen: Mean  $\pm$  SEM:  $85.22 \pm 14.5$ ,  $n = 25$ , 95 % KI: 29.93 bis 245.8

Der Zustand des Duktus wurde routinemäßig via Echokardiografie bestimmt.

---

Die Abbildung 16 zeigt die Konzentrationen von MBP am 0. - 1. Lebenstag abhängig vom Zustand des Duktus. Der Zustand des Duktus wurde am 2. - 4. Lebenstag per Echokardiografie festgelegt und entspricht hier nicht dem Zustand des Duktus am 0.- 1. Lebenstag. Hier findet sich ein signifikanter Unterschied. Kinder mit geschlossenem Duktus haben am 0. - 1. Lebenstag höhere MBP-Konzentrationen im Urin.



**Abbildung 17: Vergleich der Konzentration von MBP am 2. - 4. Lebenstag mit dem Zustand des Duktus**

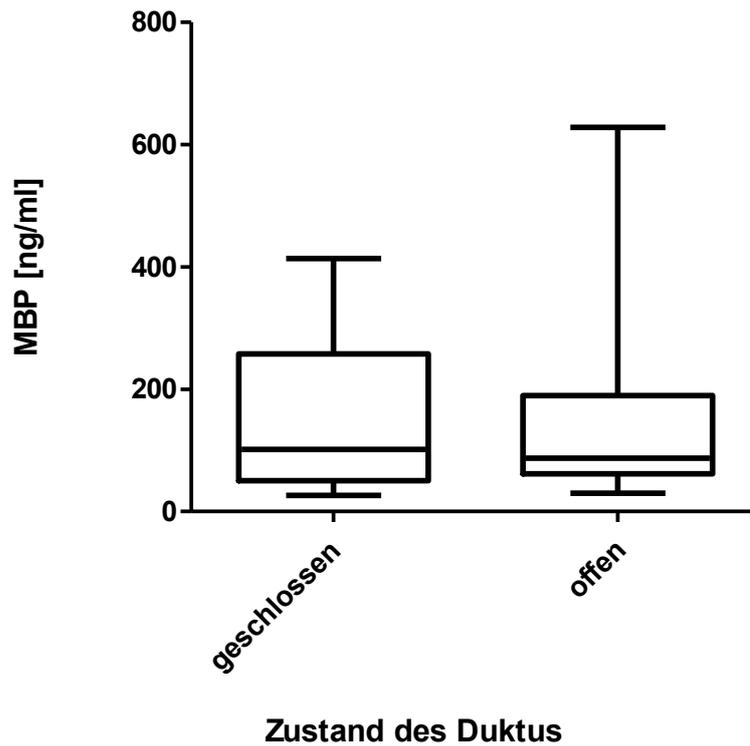
---

MBP: Myelin basic protein, MBP-Konzentration in [ng/ml],  $p = 0.0054$ , Duktus geschlossen: Mean  $\pm$  SEM:  $197.7 \pm 43.18$ ,  $n = 22$ , Duktus offen: Mean  $\pm$  SEM:  $68.98 \pm 8.965$ ,  $n = 25$ , 95 % KI: 44.93 bis 212.5

Der Zustand des Duktus wurde routinemäßig via Echokardiografie bestimmt.

---

Die Abbildung 17 zeigt die Konzentrationen von MBP am 2. - 4. Lebenstag abhängig vom Zustand des Duktus. Der Zustand des Duktus wurde genau in diesem Zeitraum, meist am 3. Lebenstag bzw. nach 72 Stunden (2. - 4. Lebenstag) per Echokardiografie festgelegt. Kinder mit geschlossenem Duktus haben am 2. - 4. Lebenstag signifikant höhere MBP-Konzentrationen im Urin.

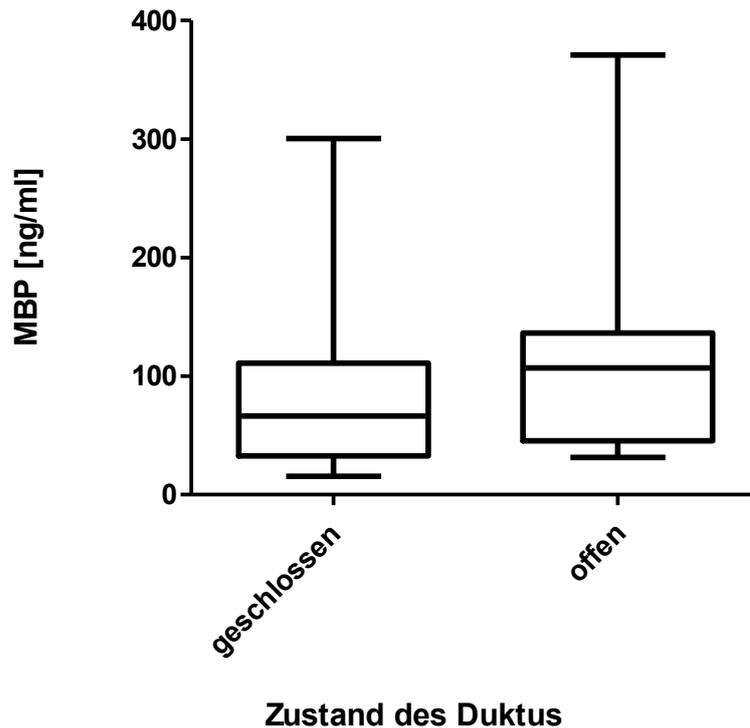


**Abbildung 18: Vergleich der Konzentration von MBP am 6. - 8. Lebensstag mit dem Zustand des Duktus**

MBP: Myelin basic protein, MBP-Konzentration in [ng/ml],  $p = 0.9578$ , Duktus geschlossen: Mean  $\pm$  SEM:  $159.9 \pm 29.62$ ,  $n = 21$ , Duktus offen: Mean  $\pm$  SEM:  $152.4 \pm 30.89$ ,  $n = 24$ , 95 % KI: -79.53 bis 94.47

Der Zustand des Duktus wurde routinemäßig am 2. - 4. Lebensstag via Echokardiografie bestimmt.

Die Abbildung 18 zeigt die Konzentrationen von MBP am 6. - 8. Lebensstag abhängig vom Zustand des Duktus. Der Zustand des Duktus wurde am 2. - 4. Lebensstag per Echokardiografie festgelegt und entspricht hier nicht dem Zustand des Duktus am 6. - 8. Lebensstag. Kinder mit geschlossenem Duktus haben verglichen mit Kindern mit offenem Duktus am 6. - 8. Lebensstag keine erhöhten MBP-Konzentrationen im Urin mehr.



**Abbildung 19: Vergleich der Konzentration von MBP am Entlassungstag mit dem Zustand des Duktus**

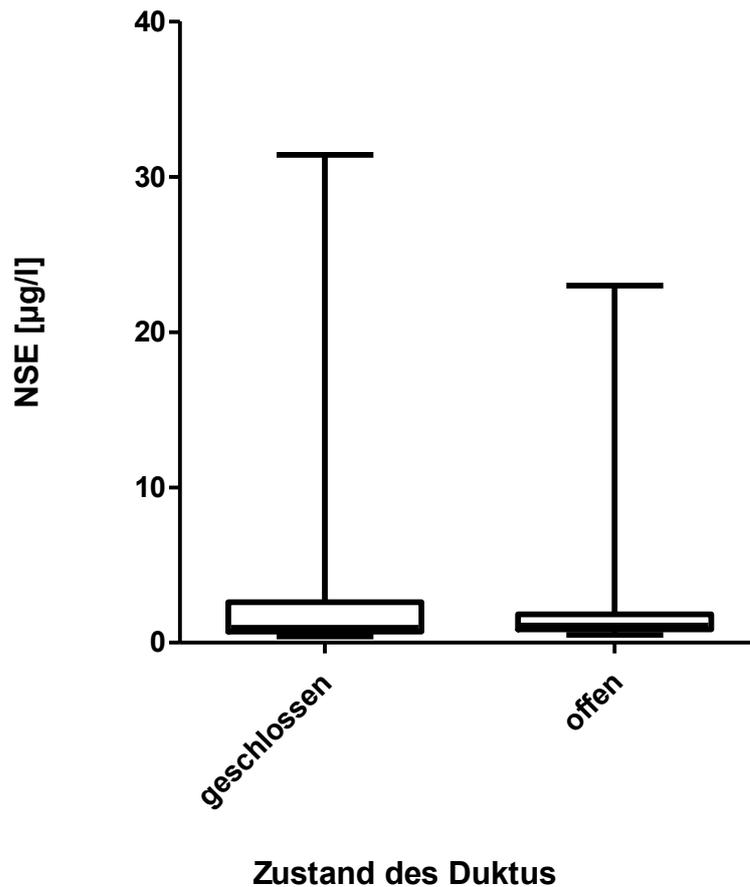
MBP: Myelin basic protein, MBP-Konzentration in [ng/ml], ln: Logarithmus naturalis,  $p = 0.1977$ , Duktus geschlossen: Mean  $\pm$  SEM:  $92.76 \pm 17.91$ ,  $n = 21$ , Duktus offen: Mean  $\pm$  SEM:  $107.0 \pm 15.15$ ,  $n = 24$ , 95 % KI: -61.24 bis 32.77

Der Zustand des Duktus wurde routinemäßig am 2. - 4. Lebenstag via Echokardiografie bestimmt.

Die Abbildung 19 zeigt die Konzentrationen von MBP am Entlassungstag abhängig vom Zustand des Duktus. Der Zustand des Duktus wurde am 2. - 4. Lebenstag per Echokardiografie festgelegt und entspricht hier nicht dem Zustand des Duktus am Entlassungstag. Am Entlassungstag ist kein Unterschied zwischen den Gruppen feststellbar.

### 3.2.3 Vergleich der Gruppen bezüglich der NSE-Konzentrationen

Die Abbildungen 20 - 24 machen deutlich, dass an keinem der vier Messzeitpunkte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen vorhanden ist.

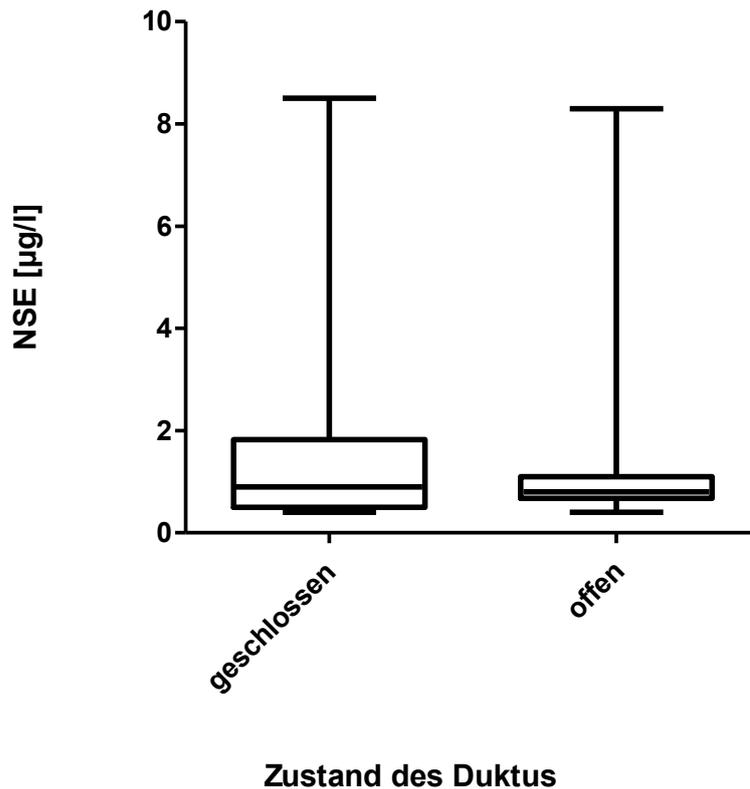


**Abbildung 20: Vergleich der Konzentration von NSE am 0. - 1. Lebenstag mit dem Zustand des Duktus**

NSE: Neuronen-spezifische Enolase, NSE-Konzentration in [µg/l],  $p = 0.8720$ , Duktus geschlossen: Mean  $\pm$  SEM:  $3.182 \pm 1.400$ ,  $n = 22$ , Duktus offen: Mean  $\pm$  SEM:  $2.562 \pm 0.8845$ ,  $n = 26$ , 95 % KI: -2.616 bis 3.857

Der Zustand des Duktus wurde routinemäßig am 2. - 4. Lebenstag via Echokardiografie bestimmt.

Die Abbildung 20 zeigt die Konzentrationen von NSE am Entlassungstag abhängig vom Zustand des Duktus. Der Zustand des Duktus wurde am 2. - 4. Lebenstag per Echokardiografie festgelegt und entspricht hier nicht dem Zustand des Duktus am 0. - 1. Lebenstag. Die NSE-Konzentrationen unterscheiden sich nicht zwischen den beiden Gruppen.

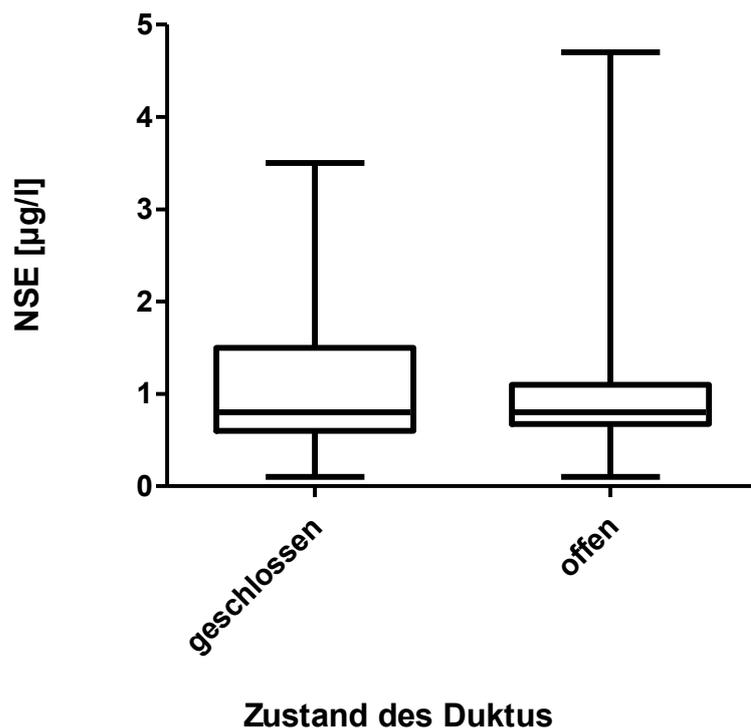


**Abbildung 21: Vergleich der Konzentration von NSE am 2. - 4. Lebenstag mit dem Zustand des Duktus**

NSE: Neuronen-spezifische Enolase, NSE-Konzentration in [µg/l],  $p = 0.4801$ , Duktus geschlossen: Mean  $\pm$  SEM:  $1.714 \pm 0.4592$ ,  $n = 22$ , Duktus offen: Mean  $\pm$  SEM:  $1.300 \pm 0.3216$ ,  $n = 26$ , 95 % KI: -0.6905 bis 1.518

Der Zustand des Duktus wurde routinemäßig via Echokardiografie bestimmt.

Die Abbildung 21 zeigt die Konzentrationen von NSE am 2. - 4. Lebenstag abhängig vom Zustand des Duktus. Der Zustand des Duktus wurde genau in diesem Zeitraum, meist am 3. Lebenstag bzw. nach 72 Stunden (2. - 4. Lebenstag) per Echokardiografie festgelegt. Auch am 2. - 4. Lebenstag finden sich keine Konzentrationsunterschiede.



**Abbildung 22: Vergleich der Konzentration von NSE am 6. - 8. Lebenstag mit dem Zustand des Duktus**

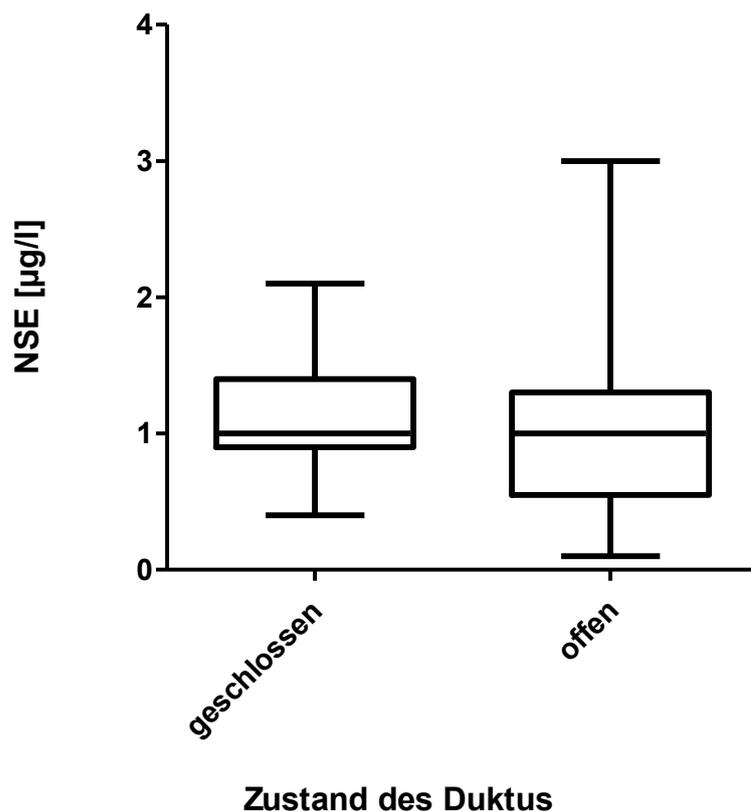
---

NSE: Neuronen-spezifische Enolase, NSE-Konzentration in [ $\mu\text{g/l}$ ],  $p = 0.9395$ , Duktus geschlossen: Mean  $\pm$  SEM:  $1.104 \pm 0.1769$ ,  $n = 23$ , Duktus offen: Mean  $\pm$  SEM:  $1.131 \pm 0.2009$ ,  $n = 26$ , 95 % KI:  $-0.5717$  bis  $0.5189$

Der Zustand des Duktus wurde routinemäßig am 2. - 4. Lebenstag via Echokardiografie bestimmt.

---

Die Abbildung 22 zeigt die Konzentrationen von NSE am 6. - 8. Lebenstag abhängig vom Zustand des Duktus. Der Zustand des Duktus wurde am 2. - 4. Lebenstag per Echokardiografie festgelegt und entspricht hier nicht dem Zustand des Duktus am 6. - 8. Lebenstag. Es wird ersichtlich, dass auch zu diesem Zeitpunkt kein Unterschied zwischen den Gruppen besteht.



**Abbildung 23: Vergleich der Konzentration von NSE am Entlassungstag mit dem Zustand des Duktus**

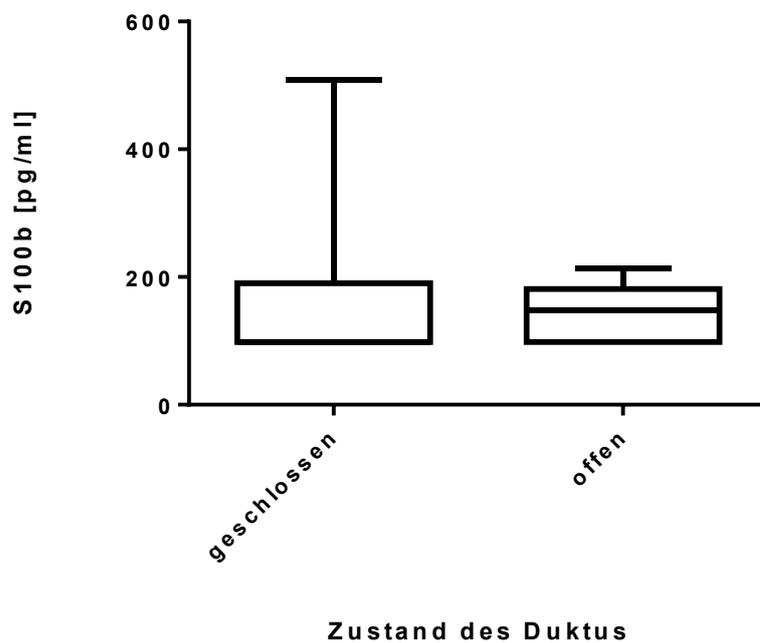
NSE: Neuronen-spezifische Enolase, NSE-Konzentration in [ $\mu\text{g/l}$ ],  $p = 0.0967$ , Duktus geschlossen: Mean  $\pm$  SEM:  $1.210 \pm 0.09854$ ,  $n = 21$ , Duktus offen: Mean  $\pm$  SEM:  $1.004 \pm 0.1235$ ,  $n = 25$ , 95 % KI: -0.1218 bis 0.5328

Der Zustand des Duktus wurde routinemäßig am 2. - 4. Lebenstag via Echokardiografie bestimmt.

Die Abbildung 23 zeigt die Konzentrationen von NSE am Entlassungstag abhängig vom Zustand des Duktus. Der Zustand des Duktus wurde am 2. - 4. Lebenstag per Echokardiografie festgelegt und entspricht hier nicht dem Zustand des Duktus am Entlassungstag. Auch am Entlassungstag findet man keinen Unterschied in den NSE-Konzentrationen.

Betrachtet man den Entlassungstag nochmals gesondert und vergleicht die Konzentrationen der Proteine S100b, MBP und NSE der Kinder, deren Duktus auch bei Entlassung noch offen ist (S100b = 5, MBP:  $n = 4$ , NSE:  $n = 6$ ) mit den Kindern, deren Duktus sich bis zu diesem Zeitpunkt verschlossen hat, so findet man bei keinem der Proteine einen signifikanten

Konzentrationsunterschied Die folgenden Abbildungen 24 - 26 zeigen den Vergleich zwischen diesen, durch den Entlassungstag gesonderten, Gruppen.



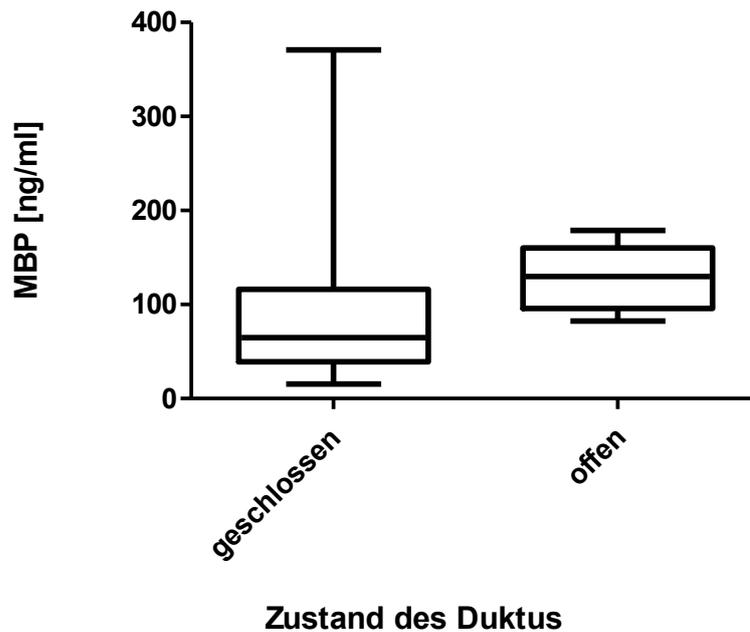
**Abbildung 24: Vergleich der Konzentration von S100b am Entlassungstag mit dem Zustand des Duktus bei Entlassung**

---

S100b-Konzentration in [pg/ml],  $p = 0.9996$ , Duktus geschlossen: Mean  $\pm$  SEM:  $159,9 \pm 20,26$ ,  $n = 31$ , Duktus offen: Mean  $\pm$  SEM:  $141,2 \pm 21,23$ ,  $n = 5$ , 95 % KI: -86,32 bis 123,7

---

Die Abbildung 24 zeigt die Konzentrationen von S100b am Entlassungstag abhängig vom Zustand des Duktus. Der Zustand des Duktus wurde zum Entlassungszeitpunkt per Echokardiografie festgelegt und entspricht hier dem Zustand des Duktus bei Entlassung. Es lässt sich kein Unterschied in der S100b-Konzentration erkennen.



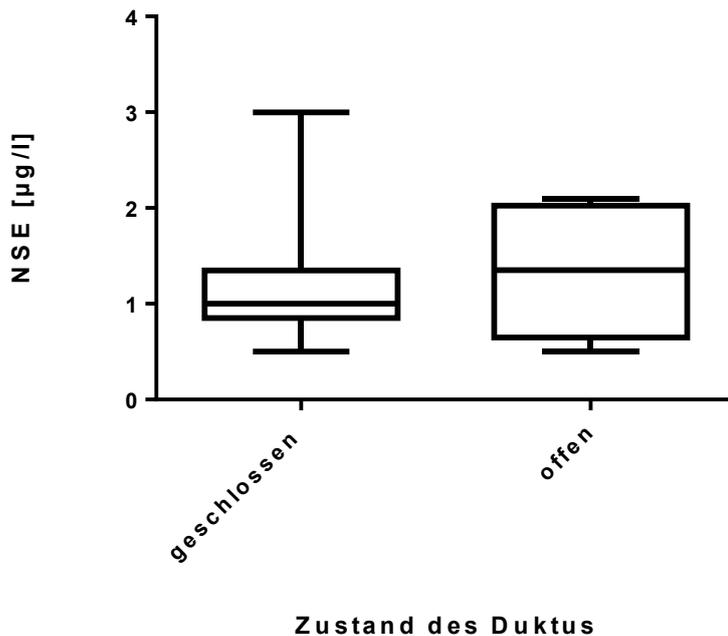
**Abbildung 25: Vergleich der Konzentration von MBP am Entlassungstag mit dem Zustand des Duktus bei Entlassung**

---

MBP: Myelin basic protein, MBP-Konzentration in [ng/ml],  $p = 0.2029$ , Duktus geschlossen: Mean  $\pm$  SEM:  $96.41 \pm 15,45$ ,  $n = 31$ , Duktus offen: Mean  $\pm$  SEM:  $125 \pm 20,41$ ,  $n = 4$ , 95 % KI: - 118,3 bis 61,01

---

Die Abbildung 25 zeigt die Konzentrationen von MBP am Entlassungstag abhängig von Zustand des Duktus. Der Zustand des Duktus wurde zum Entlassungszeitpunkt per Echokardiografie festgelegt und entspricht hier dem Zustand des Duktus bei Entlassung. Auch bei den MBP-Konzentrationen zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.



**Abbildung 26: Vergleich der Konzentration von NSE am Entlassungstag mit dem Zustand des Duktus bei Entlassung**

NSE: Neuronen-spezifische Enolase, NSE-Konzentration in [µg/l]  $p = 0.6479$ , Duktus geschlossen: Mean  $\pm$  SEM:  $1.1795 \pm 0.09577$ ,  $n = 29$ , Duktus offen: Mean  $\pm$  SEM:  $1.33 \pm 0.2813$ ,  $n = 6$ , 95 % KI: -0,6518 bis 0,3438

Die Abbildung 26 zeigt die Konzentrationen von NSE am Entlassungstag abhängig vom Zustand des Duktus. Der Zustand des Duktus wurde zum Entlassungszeitpunkt per Echokardiografie festgelegt und entspricht hier dem Zustand des Duktus bei Entlassung. Es lässt sich kein signifikanter Unterschied der NSE-Konzentrationen feststellen.

### **3.3 Vergleich Kontroll- mit der Interventionsgruppe bezogen auf die Konzentrationen von S100b, MBP und NSE zu den vier Messzeitpunkten**

Die folgenden Tabellen 4 - 6 zeigen den Vergleich der Kontroll- mit der Interventionsgruppe bezüglich der drei Proteine anhand der Mittelwerte, Standardabweichungen und Probandenanzahl. Zudem ist der p-Wert des jeweiligen Messzeitpunktes der Tabelle zu entnehmen.

Bei S100b sowie NSE zeigt sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Die Kontrollgruppe hatte an Tag 0 - 1 sowie 2 - 4 signifikant höhere MBP-Konzentrationen als die Interventionsgruppe.

	Kontrollgruppe			Interventionsgruppe			p
	$\bar{x}$	SD	n	$\bar{x}$	SD	n	
<b>S100b 0. - 1. LT [pg/ml]</b>	587.5	789.8	19	548.8	431.9	7	<b>0.5947</b>
<b>S100b 2. - 4. LT [pg/ml]</b>	499.4	855.9	22	516.5	520.8	8	<b>0.4566</b>
<b>S100b 6. - 8. LT [pg/ml]</b>	479.2	476.4	22	672.6	578.9	8	<b>0.2077</b>
<b>S100b ET [pg/ml]</b>	157.8	103.9	22	237.5	140.0	8	<b>0.0753</b>

**Tabelle 4: Vergleich der Mittelwerte, Standardabweichungen und Probandenanzahl sowie der Ergebnisse des t-Tests der quantitativen S100b-Bestimmung zwischen Kontroll- und der Interventionsgruppe**

LT: Lebenstag, ET: Entlassungstag,  $\bar{x}$ : Mittelwert, SD: Standardabweichung, n: Probandenanzahl

Die Tabelle 4 zeigt, dass zu keinem Messzeitpunkt ein signifikanter Unterschied in der S100b-Konzentration zwischen diesen beiden Gruppen zu verzeichnen ist. Die ersten beiden Messzeitpunkte zeigen, dass die Werte sich hier nahezu gleichen.

	Kontrollgruppe			Interventionsgruppe			p
	$\bar{x}$	SD	n	$\bar{x}$	SD	n	
<b>MBP 0. - 1. LT [ng/ml]</b>	223.1	256.2	21	72.75	34.19	8	<b>0.0484</b>
<b>MBP 2. - 4. LT [ng/ml]</b>	197.7	202.5	22	58.52	35.28	8	<b>0.0378</b>
<b>MBP 6.-8 LT [ng/ml]</b>	159.9	135.7	21	146.3	142.40	8	<b>0.9748</b>
<b>MBP ET [ng/ml]</b>	92.76	82.05	21	133.6	110.40	8	<b>0.2419</b>

**Tabelle 5: Vergleich der Mittelwerte, Standardabweichungen und Probandenanzahl sowie der Ergebnisse des t-Tests der quantitativen MBP-Bestimmung zwischen Kontroll- und der Interventionsgruppe**

LT: Lebenstag, ET: Entlassungstag,  $\bar{x}$ : Mittelwert, SD: Standardabweichung, n: Probandenanzahl

Die Tabelle 5 zeigt, dass Kinder der Kontrollgruppe signifikant höhere MBP-Konzentrationen am 0. - 1. sowie am 2. - 4. Lebenstag haben. Zu den späteren Messzeitpunkten ist kein Unterschied zwischen den Gruppen mehr festzustellen.

	Kontrollgruppe			Interventionsgruppe			p
	$\bar{x}$	SD	n	$\bar{x}$	SD	n	
<b>NSE 0. - 1. LT [<math>\mu\text{g/l}</math>]</b>	3.182	6.568	22	1.188	0.5276	8	<b>0.3893</b>
<b>NSE 2. - 4. LT [<math>\mu\text{g/l}</math>]</b>	1.714	2.154	22	1.138	0.6968	8	<b>0.6815</b>
<b>NSE 6. -8. LT [<math>\mu\text{g/l}</math>]</b>	1.104	0.8482	23	1.113	1.471	8	<b>0.6508</b>
<b>NSE ET [<math>\mu\text{g/l}</math>]</b>	1.210	0.4516	21	1.171	1.019	7	<b>0.3731</b>

**Tabelle 6: Vergleich der Mittelwerte, Standardabweichungen und Probandenanzahl sowie der Ergebnisse des t-Tests der quantitativen NSE-Bestimmung zwischen der Kontroll- und der Interventionsgruppe**

LT: Lebenstag, ET: Entlassungstag,  $\bar{x}$ : Mittelwert, SD: Standardabweichung, n: Probandenanzahl

Die Tabelle 6 zeigt, dass zu keinem Messzeitpunkt ein signifikanter Unterschied in der NSE-Konzentration zwischen diesen beiden Gruppen zu verzeichnen ist.

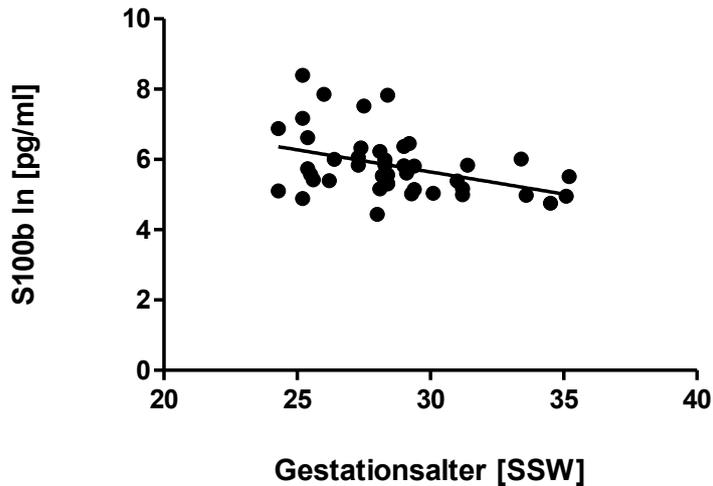
### **3.4 Korrelation der Konzentrationen der Proteine S100b, NSE und MBP an allen vier Messzeitpunkten mit dem Gestationsalter**

Die folgenden Ergebnisse zeigen die Korrelation der Konzentrationen der Proteine S100b, MBP und NSE zu den vier Messzeitpunkten 0. - 1., 2. - 4., 6 - 8. Lebenstag und Entlassungstag mit dem Gestationsalter der Kinder.

Im Folgenden wird in den Legenden der Graphen bei der linearen Regression die Steigung der Regressionsgeraden mit  $b$  und der  $y$ -Achsenabschnitt mit  $a$  bezeichnet.

#### **3.4.1 Korrelation von S100b mit dem Gestationsalter**

S100b zeigt am 0. - 1. Lebenstag sowie am 6. - 8. Lebenstag eine signifikante Korrelation mit dem Gestationsalter. Es zeigt sich, dass Kinder mit einem niedrigen Gestationsalter erhöhte S100b-Konzentrationen im Urin aufweisen (0. - 1. Lebenstag  $p = 0.0070$ , 6. - 8. Lebenstag  $p = 0.0149$ ). Dies verdeutlichen Abbildungen 27 und 29 in denen ein Abfall der S100b-Konzentration mit zunehmendem Gestationsalter zu sehen ist. Am 6. – 8. Lebenstag findet sich jedoch eine größere Streuung der Werte. Wie zuvor beschrieben zeigen die Kinder der PDA-Gruppe mit einem Mittelwert von 27.56 SSW (Median: 28.15 SSW) ein niedrigeres Gestationsalter als die Kontrollgruppe mit einem Mittelwert von 29.78 SSW (Median: 29.35 SSW). Am 2. - 4. Lebenstag ist die Korrelation zwischen S100b und dem Gestationsalter nicht zu erkennen, jedoch lässt sich bei einem  $p$ -Wert von 0.0783 ein Trend vermuten (Abbildung 28). Auch am Entlassungstag findet sich keine signifikante Korrelation. Hier sind Konzentrationen an der Messgrenze von 98 pg/ml von Kindern aller Gestationsalter zu finden (Abbildung 30).

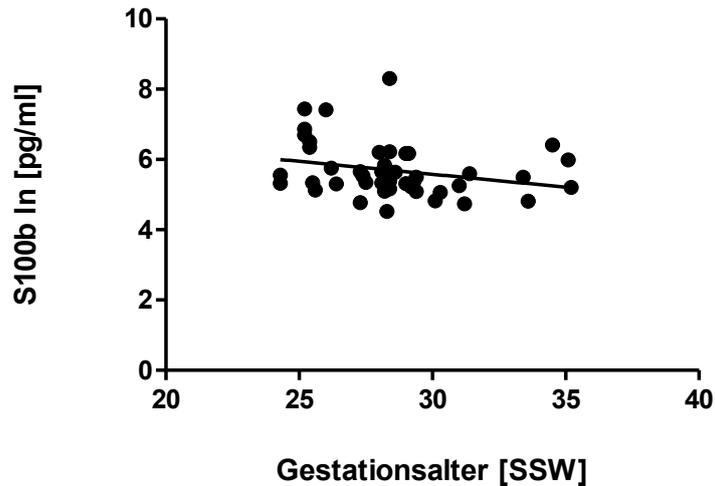


**Abbildung 27: Korrelation zwischen S100b am 0. - 1. Lebenstag und dem Gestationsalter**

Die Daten der S100b-Konzentrationen wurden mit dem Logarithmus naturalis transformiert und anschließend mit dem Gestationsalter korreliert.

S100b-Konzentration in pg/ml, SSW: Schwangerschaftswochen, ln: Logarithmus naturalis, n = 44,  
 $r = -0.4010$ , 95 % KI: -0.6237 bis -0.1181,  $p = 0.0070$ ,  $b = -0.1260 \pm 0.0441$ ,  $a = 9.425 \pm 1.274$ ,  
 $r^2 = 0.1608$

Die Abbildung 27 zeigt die Korrelation zwischen der S100b-Konzentration am 0. - 1. Lebenstag und dem Gestationsalter. Unreife Kinder haben am 0. - 1. Lebenstag eine höhere S100-Konzentration im Urin als reifere Kinder.

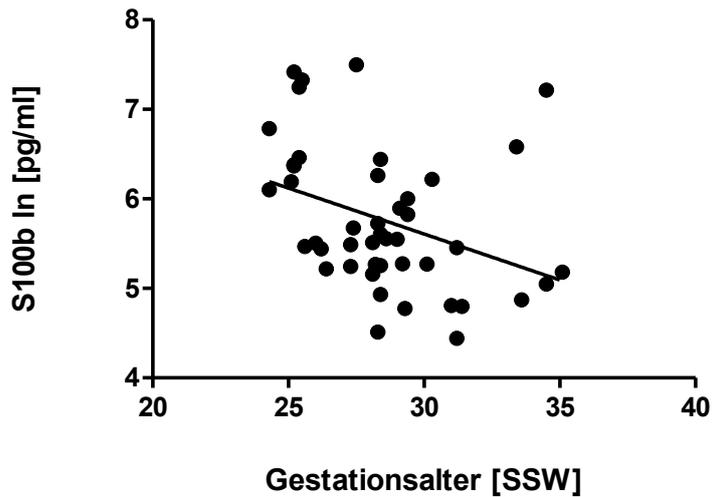


**Abbildung 28: Korrelation zwischen S100b am 2. - 4. Lebenstag mit dem Gestationsalter**

Die Daten der S100b-Konzentrationen wurden mit dem Logarithmus naturalis transformiert und anschließend mit dem Gestationsalter korreliert.

S100b-Konzentration in pg/ml, SSW: Schwangerschaftswochen, ln: Logarithmus naturalis, n = 46,  
 $r = -0.2623$ , 95 % KI: -0.5135 bis 0.03040,  $p = 0.0783$ ,  $b = -0.07360 \pm 0.04083$ ,  
 $a = 07.788 \pm 1.17$ ,  $r^2 = 0.06879$

Die Abbildung 28 zeigt die Korrelation zwischen der S100b-Konzentration am 2. - 4. Lebenstag und dem Gestationsalter. Hier lässt sich im Gegensatz zum 0. - 1. Lebenstag keine signifikante Korrelation feststellen.

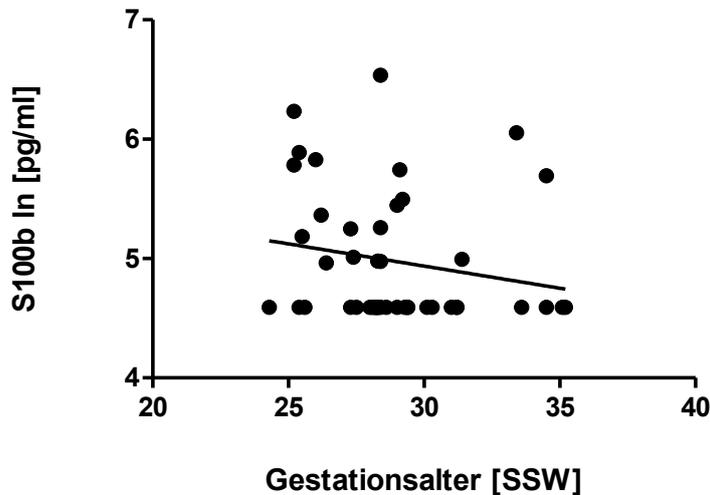


**Abbildung 29: Korrelation zwischen S100b am 6. - 8. Lebenstag mit dem Gestationsalter**

Die Daten der S100b-Konzentrationen wurden mit dem Logarithmus naturalis transformiert und anschließend mit dem Gestationsalter korreliert.

S100b-Konzentration in pg/ml, SSW: Schwangerschaftswochen, In: Logarithmus naturalis, n = 45, r = -0.3607, 95 % KI: -0.5917 bis -0.07508, p = 0.0149, b = -0.1028 ± 0.04052, a = 8.69 ± 1.16, r<sup>2</sup> = 0.1301

Die Abbildung 29 zeigt die Korrelation zwischen der S100b-Konzentration am 6. - 8. Lebenstag und dem Gestationsalter. Es zeigt sich wie bereits am 0. - 1. Lebenstag eine signifikante Korrelation. Unreife Kinder haben am 6. - 8. Lebenstag eine höhere S100b-Konzentration im Urin als reifere Kinder.



**Abbildung 30: Korrelation zwischen S100b am Entlassungstag mit dem Gestationsalter**

Die Daten der S100b-Konzentration wurden mit dem Logarithmus naturalis transformiert und mit dem Gestationsalter korreliert. Hier wurde der Grenzwert 98 pg/ml bzw. als transformierte Form 4,59005655 verwendet. Der ELISA kann nur bis zu diesem Wert messen, sodass er die kleinste mögliche Konzentration darstellt.

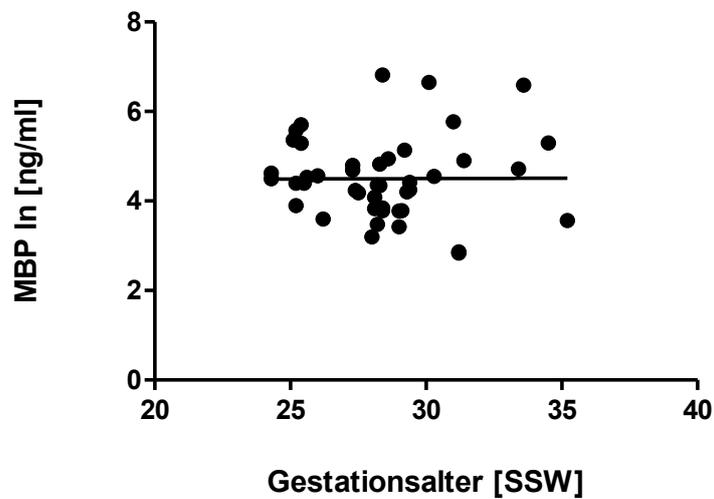
S100b-Konzentration in pg/ml, SSW: Schwangerschaftswochen, ln: Logarithmus naturalis, n = 45,  $r = -0.1886$ , 95 % KI: -0.4569 bis -0.1112,  $p = 0.2148$ ,  $b = -0.03716 \pm 0.02951$ ,  $a = 6.052 \pm 10.8565$ ,  $r^2 = 0.03556$

Die Abbildung 30 zeigt die Korrelation zwischen der S100b-Konzentration am Entlassungstag und dem Gestationsalter. Es zeigt sich keine signifikante Korrelation zwischen S100b und dem Gestationsalter am Entlassungstag. Ersichtlich wird jedoch ein Abfall der Konzentrationen von S100b zum Entlassungstag bei der Mehrzahl der Kinder.

### **3.4.2 Korrelation von Myelin *basic protein* mit dem Gestationsalter**

MBP zeigt am 0. - 1. Lebenstag keine Korrelation mit dem Gestationsalter. Die Kinder aller Gestationsalter haben in etwa gleiche Konzentrationen ( $p = 0.9740$ ) (Abbildung 31). Am 2. - 4. Lebenstag lässt sich dann eine deutliche Steigung des Graphen erkennen. Kinder mit einem höheren Gestationsalter haben höhere Konzentrationen von MBP im Urin. Die Korrelation ist hoch signifikant (Abbildung 32). Kinder der Kontrollgruppe haben ein höheres Gestationsalter und somit auch höhere MBP-Konzentrationen zu diesem Messzeitpunkt als die PDA-Gruppe. Der Zusammenhang lässt sich am 6. - 8. Lebenstag nicht mehr feststellen ( $p = 0.5985$ ) und auch am Entlassungstag ist kein Zusammenhang

zwischen der MBP-Konzentration und dem Gestationsalter erkennen ( $p = 0.5669$ ) (Abbildungen 33 und 34).



**Abbildung 31: Korrelation zwischen MBP am 0. - 1. Lebenstag und dem Gestationsalter**

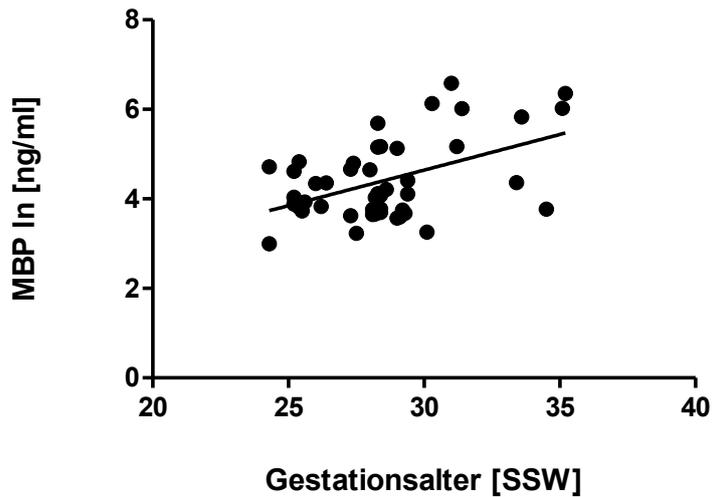
---

Die Daten der MBP-Konzentrationen wurden mit dem Logarithmus naturalis transformiert und anschließend mit dem Gestationsalter korreliert.

MBP: Myelin basic protein, MBP-Konzentration in [ng/ml], SSW: Schwangerschaftswochen,  
ln: Logarithmus naturalis,  $n = 45$ ,  $r = 0.004992$ , 95 % KI: -0.2890 bis 0.2982,  $p = 0.9740$ ,  
 $b = 0.001732 \pm 0.05290$ ,  $a = 4.449 \pm 1.509$ ,  $r^2 = 0.00002492$

---

Die Abbildung 31 zeigt die Korrelation zwischen der MBP-Konzentration am 0. - 1. Lebenstag und dem Gestationsalter der Kinder. Es lässt sich keine signifikante Korrelation feststellen.

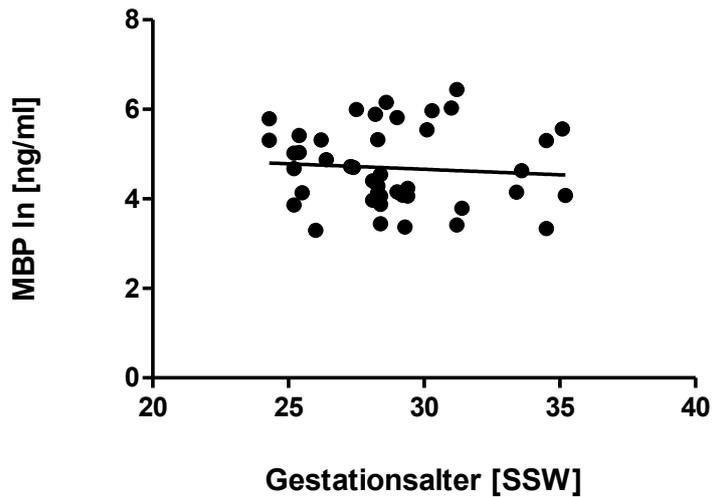


**Abbildung 32: Korrelation zwischen MBP am 2. - 4. Lebenstag und dem Gestationsalter**

Die Daten der MBP-Konzentrationen wurden mit dem Logarithmus naturalis transformiert und anschließend mit dem Gestationsalter korreliert.

MBP: Myelin basic protein, MBP-Konzentration in [ng/ml], SSW: Schwangerschaftswochen, ln: Logarithmus naturalis,  $n = 46$ ,  $r = 0.4836$ , 95 % KI: 0.2248 bis 0.6787,  $p = 0.0007$ ,  $b = 0.1591 \pm 0.04342$ ,  $a = -0.1300 \pm 1.244$ ,  $r^2 = 0.2339$

Die Abbildung 32 zeigt die Korrelation zwischen der MBP-Konzentration am 2. - 4. Lebenstag und dem Gestationsalter der Kinder. Es stellt sich ein signifikanter Anstieg des MBP mit zunehmendem Gestationsalter dar. Somit ist am 2. - 4. Lebenstag die MBP-Konzentration bei reiferen Kindern höher als bei unreifen Kindern.

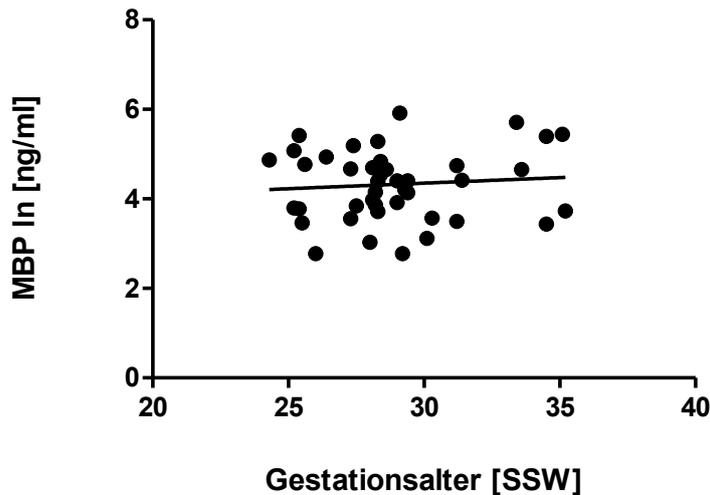


**Abbildung 33: Korrelation zwischen MBP am 6. - 8. Lebenstag und dem Gestationsalter**

Die Daten der MBP-Konzentrationen wurden mit dem Logarithmus naturalis transformiert und anschließend mit dem Gestationsalter korreliert.

MBP: Myelin basic protein, MBP-Konzentration in [ng/ml], SSW: Schwangerschaftswochen, ln: Logarithmus naturalis, n = 44, r = -0.08160, 95 % KI: -0.3696 bis 0.2207, p = 0.5985, b = -0.02469 ± 0.04654, a = 5.403 ± 1.349, r<sup>2</sup> = 0.006658

Die Abbildung 33 zeigt die Korrelation zwischen der MBP-Konzentration am 6. - 8. Lebenstag und dem Gestationsalter der Kinder. Im Gegensatz zum 2. - 4. Lebenstag findet sich nun kein signifikanter Anstieg des MBP mit zunehmendem Gestationsalter mehr.



**Abbildung 34: Korrelation zwischen MBP am Entlassungstag mit dem Gestationsalter**

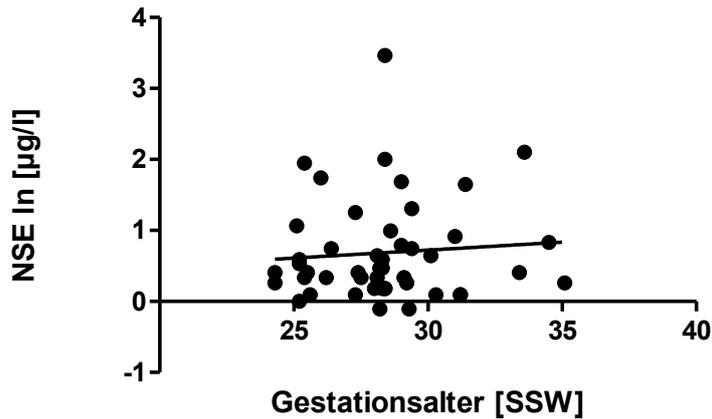
Die Daten der MBP-Konzentrationen wurden mit dem Logarithmus naturalis transformiert und anschließend mit dem Gestationsalter korreliert.

MBP: Myelin basic protein, MBP-Konzentration in [ng/ml], SSW: Schwangerschaftswochen, ln: Logarithmus naturalis,  $n = 44$ ,  $r = 0.08871$ , 95 % KI: -0.2139 bis 0.3758,  $p = 0.5669$ ,  $b = 0.02488 \pm 0.04311$ ,  $a = 3.605 \pm 1.251$ ,  $r^2 = 0.007869$

Die Abbildung 34 zeigt die Korrelation zwischen der MBP-Konzentration am Entlassungstag und dem Gestationsalter der Kinder. Es lässt sich keine signifikante Korrelation feststellen.

### 3.4.3 Korrelation der Neuronen-spezifischen Enolase mit dem Gestationsalter

Insgesamt ist zu keinem Messzeitpunkt eine Korrelation zwischen den Konzentrationen der Neuronen-spezifischen Enolase und dem Gestationsalter zu verzeichnen. Am 0. - 1. Lebenstag liegt der p-Wert bei 0.5868 und auch am 2. - 4. Lebenstag lässt sich keine Korrelation erkennen ( $p = 0.6081$ ). Es zeigen sich in den Graphen lediglich minimale Steigungen der Geraden mit zunehmendem Gestationsalter (Abbildungen 35 und 36). Am 6. - 8. Lebenstag lässt sich eine Angleichung der Konzentrationen erkennen, welche durch einen p-Wert von 0.9162 verdeutlicht wird und sich auch im Graphen als nahezu horizontale Gerade darstellt. Am Entlassungstag zeigt sich wieder eine leichte Steigung der Geraden, welche jedoch mit einem p-Wert von 0.3643 nicht signifikant ist (Abbildungen 37 und 38).



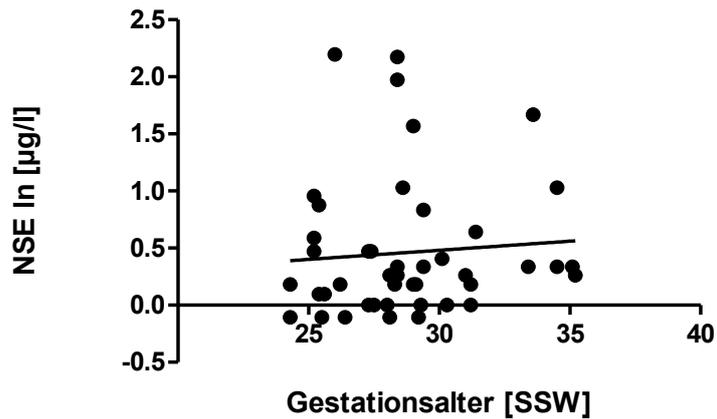
**Abbildung 35: Korrelation zwischen NSE am 0. - 1. Lebenstag und dem Gestationsalter**

Die Daten der NSE-Konzentrationen wurden mit dem Logarithmus naturalis transformiert und anschließend mit dem Gestationsalter korreliert.

NSE: Neuronen-spezifische Enolase, NSE-Konzentration in [µg/l],

SSW: Schwangerschaftswochen, ln: Logarithmus naturalis, n = 47, r = 0.08134, 95 % KI: -0.2108 bis 0.3602, p = 0.5868, b = 0.02242 ± 0.04095, a = 0.05025 ± 1.166, r<sup>2</sup> = 0.006615

Die Abbildung 35 zeigt die Korrelation zwischen der NSE-Konzentration und dem Gestationsalter der Kinder. Die NSE-Konzentrationen zeigen keine signifikante Korrelation zum Gestationsalter.



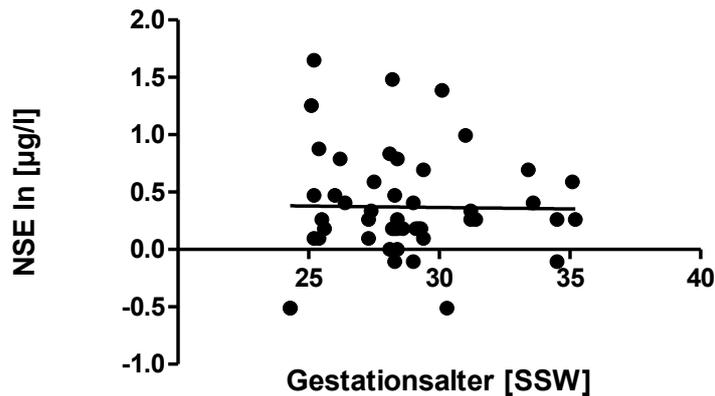
**Abbildung 36: Korrelation zwischen NSE am 2. - 4. Lebenstag und dem Gestationsalter**

Die Daten der NSE-Konzentrationen wurden mit dem Logarithmus naturalis transformiert und anschließend mit dem Gestationsalter korreliert.

NSE: Neuronen-spezifische Enolase, NSE-Konzentration in [ $\mu\text{g/l}$ ],

SSW: Schwangerschaftswochen, ln: Logarithmus naturalis,  $n = 47$ ,  $r = 0.07675$ , 95 % KI:  $-0.2152$  bis  $0.3561$ ,  $p = 0.6081$ ,  $b = 0.01596 \pm 0.03090$ ,  $a = 0.02014 \pm 0.89$ ,  $r^2 = 0.005890$

Die Abbildung 36 zeigt die Korrelation zwischen der NSE-Konzentration am 2. - 4. Lebenstag und dem Gestationsalter der Kinder. Auch am 2. – 4. Lebenstag lässt sich keine signifikante Korrelation erkennen.



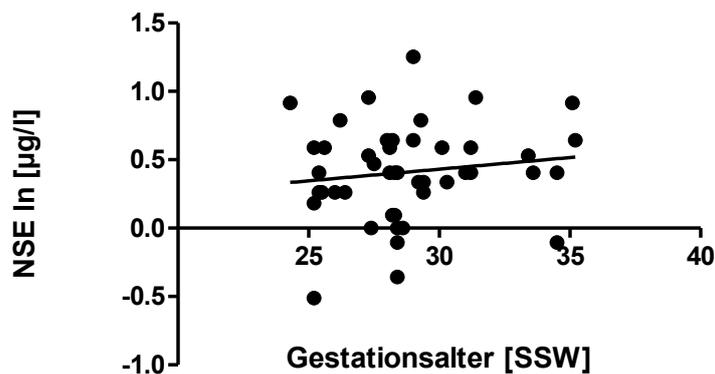
**Abbildung 37: Korrelation zwischen NSE am 6. - 8. Lebenstag und dem Gestationsalter**

Die Daten der NSE-Konzentrationen wurden mit dem Logarithmus naturalis transformiert und anschließend mit dem Gestationsalter korreliert.

NSE: Neuronen-spezifische Enolase, NSE-Konzentration in [µg/l],

SSW: Schwangerschaftswochen, ln: Logarithmus naturalis, n = 48, r = -0.01560, 95 % KI: -0.2985 bis 0.2698, p = 0.9162, b = -0.002533 ± 0.02394, a = 0.4421 ± 0.06890, r<sup>2</sup> = 0.0002435

Die Abbildung 37 zeigt die Korrelation zwischen der NSE-Konzentration am 6. - 8. Lebenstag und dem Gestationsalter der Kinder. Auch am 6. – 8. Lebenstag findet sich keine signifikante Korrelation.



**Abbildung 38: Korrelation zwischen NSE am Entlassungstag und dem Gestationsalter**

Die Daten der NSE-Konzentrationen wurden mit dem Logarithmus naturalis transformiert und anschließend mit dem Gestationsalter korreliert.

NSE: Neuronen-spezifische Enolase, NSE-Konzentration in [µg/l],

SSW: Schwangerschaftswochen, ln: Logarithmus naturalis, n = 45, r = 0.1385, 95 % KI: -0.1617 bis 0.4152, p = 0.3643, b = 0.01705 ± 0.01859, a = -0.8050 ± 0.5380, r<sup>2</sup> = 0.01917

Die Abbildung zeigt die Korrelation zwischen der NSE-Konzentration am Entlassungstag und dem Gestationsalter der Kinder. Wie in Abbildungen 35 - 38 deutlich wird, lässt sich zu keinem Messzeitpunkt eine signifikante Korrelation mit dem Gestationsalter feststellen.

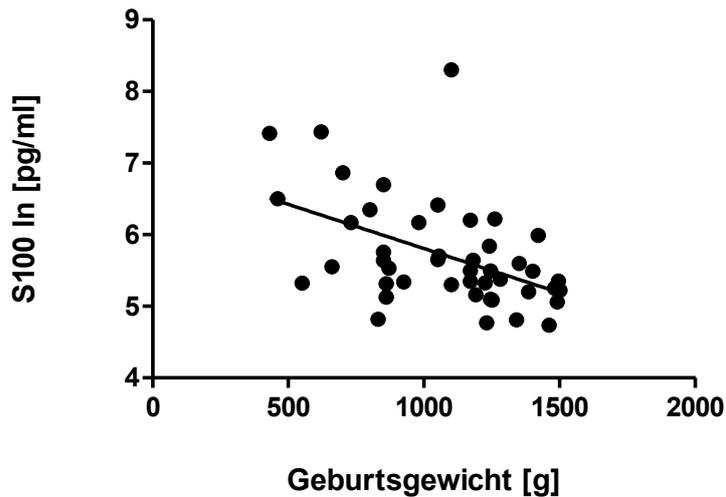
### **3.5 Korrelation der Konzentrationen der Proteine S100b, MBP und NSE am 2. - 4. Lebenstag mit dem Geburtsgewicht**

Die folgenden Abbildungen 39 - 41 zeigen die Korrelation zwischen dem Geburtsgewicht der Kinder und den Proteinkonzentrationen am 2. - 4. Lebenstag.

Im Folgenden wird in den Legenden der Graphen bei der linearen Regression die Steigung der Regressionsgeraden mit  $b$  und der y-Achsenabschnitt mit  $a$  bezeichnet.

#### **3.5.1 Korrelation der Konzentration von S100b mit dem Geburtsgewicht**

S100b zeigt am 2. - 4. Lebenstag einen starken Abfall der Konzentrationen mit zunehmendem Geburtsgewicht. Kinder mit einem niedrigen Geburtsgewicht haben deutlich höhere Konzentrationen von S100b im Urin als Kinder mit einem hohen Geburtsgewicht (bis 1500 g). Diese Korrelation ist hoch signifikant (Abbildung 39). Die Kinder mit geringem Geburtsgewicht sind auch eher jene Kinder, deren Duktus zum Messzeitpunkt noch offen ist (Mittelwert: 1024 g, Median: 980 g). Der Unterschied zwischen der Kontroll- und der PDA-Gruppe war bezogen auf das Gewicht nicht signifikant. Allerdings zeigt sich, dass gerade die Kinder, deren PDA einer Intervention bedurfte (Interventionsgruppe) im Vergleich ein geringes Geburtsgewicht (Mittelwert: 770,7 g, Median: 850 g) aufweisen. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe ( $p = 0.0114$ ) sowie mit den Kindern der PDA-Gruppe ohne Intervention ( $p = 0.0012$ ) war dieser Unterschied signifikant. Somit sind die Kinder, deren Duktus einer Intervention bedurfte auch jene, welche ein geringes Geburtsgewicht und somit erhöhte Konzentrationen von S100b im Urin aufweisen.



**Abbildung 39: Korrelation zwischen S100b am 2. - 4. Lebenstag und dem Geburtsgewicht**

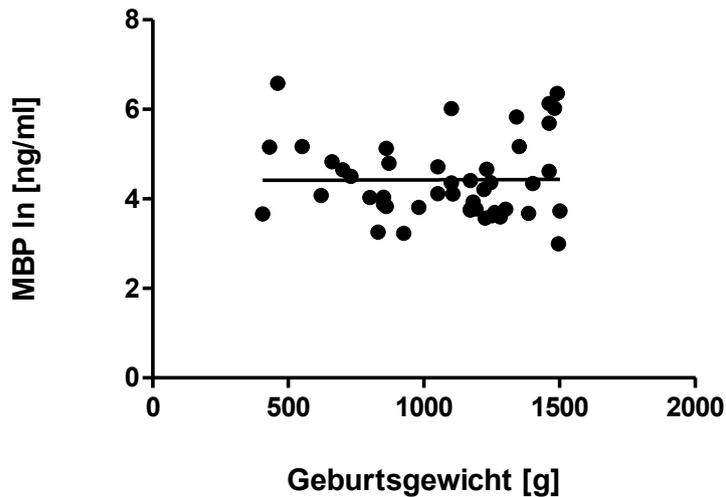
Die Daten der S100b-Konzentrationen wurden mit dem Logarithmus naturalis transformiert und anschließend mit dem Geburtsgewicht korreliert

S100b in [pg/ml], La/Ao-ratio, ln: Logarithmus naturalis, n = 45, r = -0.4809, 95 % KI -0.6787 bis -0.02181, p = 0.0008, b = -0.001234 ± 0.0003431, a = 7.04 ± 0.3818, r<sup>2</sup> = 0.2313

Die Abbildung 39 zeigt die Korrelation des Markers S100b am 2. - 4. Lebenstag mit dem Geburtsgewicht der Kinder. Mit steigendem Geburtsgewicht fallen die S100b-Werte. Hohe S100b-Werte finden sich somit bei Kindern mit einem geringen Gestationsalter, geringer Reife bzw. einem geringen Geburtsgewicht.

### 3.5.2 Korrelation von MBP mit dem Geburtsgewicht

MBP zeigt am 2. - 4. Lebenstag keine Korrelation mit dem Geburtsgewicht. Wie in Abbildung 40 ersichtlich und durch p = 0.9639 verdeutlicht lässt sich kein Zusammenhang erkennen.



**Abbildung 40: Korrelation zwischen MBP am 2. - 4. Lebenstag und dem Geburtsgewicht**

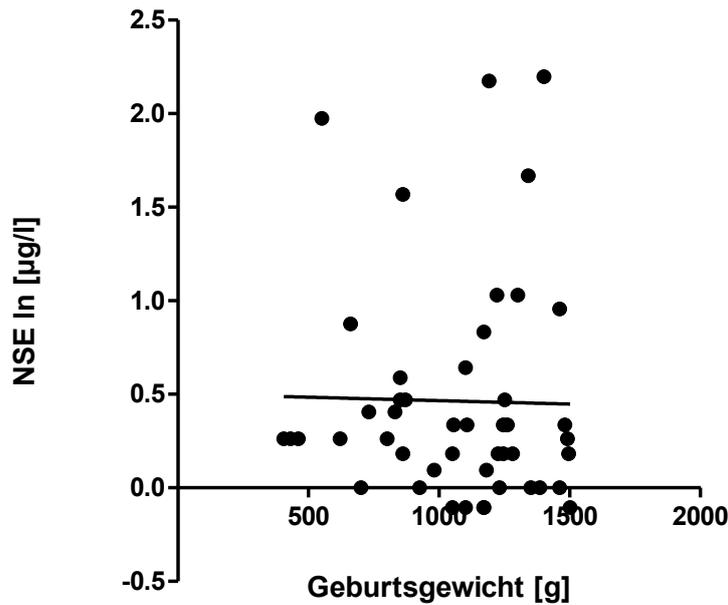
Die Daten der MBP-Konzentrationen wurden mit dem Logarithmus naturalis transformiert und anschließend mit dem Geburtsgewicht korreliert.

MBP: Myelin basic protein, MBP in [ng/ml], Geburtsgewicht in Gramm [g], ln: Logarithmus naturalis, n = 46, r = 0.006869, 95 % KI -0.2841 bis 0.2966, p = 0.9639, b = 0.00001958 ± 0.0004298, a = 4.406 ± 0.4810, r<sup>2</sup> = 0.00004718

Die Abbildung 40 zeigt die Korrelation des Markers MBP am 2. - 4. Lebenstag mit dem Geburtsgewicht der Kinder.

### 3.5.3 Korrelation von NSE mit dem Geburtsgewicht

Auch die Konzentration der NSE am 2. - 4. Lebenstag zeigt keine Korrelation mit dem Geburtsgewicht (Abbildung 41). Hier liegt zudem eine große Streuung der Konzentrationen über die gesamte Geburtsgewichtsspanne vor (p = 0.9).



**Abbildung 41: Korrelation zwischen NSE am 2. - 4. Lebenstag und dem Geburtsgewicht**

Die Daten der NSE-Konzentrationen wurden mit dem Logarithmus naturalis transformiert und anschließend mit dem Geburtsgewicht korreliert.

NSE: Neuronen spezifische Enolase, NSE in [ $\mu\text{g/l}$ ], Geburtsgewicht in Gramm [g], ln: Logarithmus naturalis,  $n = 47$ ,  $r = -0.01883$ , 95 % KI  $-0.3044$  bis  $0.2699$ ,  $p = 0.9$ ,  $b = -0.00003672 \pm 0.0002907$ ,  $a = 0.5025 \pm 0.3233$ ,  $r^2 = 0.0003545$

Die Abbildung 41 zeigt die Korrelation des Markers NSE am 2. - 4. Lebenstag mit dem Geburtsgewicht der Kinder. Es lässt sich kein Zusammenhang feststellen.

### **3.6 Korrelation der Proteine S100, MBP und NSE am 2. - 4. Lebenstag mit der La/Ao-ratio**

Die La/Ao-ratio wurde am 2. - 4. Lebenstag, meistens nach 72 Lebensstunden, per routinemäßiger Echokardiografie bestimmt. Der Urin wurde zum gleichen Zeitpunkt gesammelt.

Es lässt sich bei keinem der untersuchten Proteine eine Korrelation feststellen.

### 3.6.1 Korrelation von S100b am 2. - 4. Lebenstag mit der La/Ao-ratio

S100b zeigt keine Korrelation mit der La/Ao-ratio. Wie Abbildung 42 deutlich macht unterscheiden sich die Konzentrationen dieses Proteins nicht zwischen den Kindern mit einer großen und einer kleinen La/Ao-ratio.

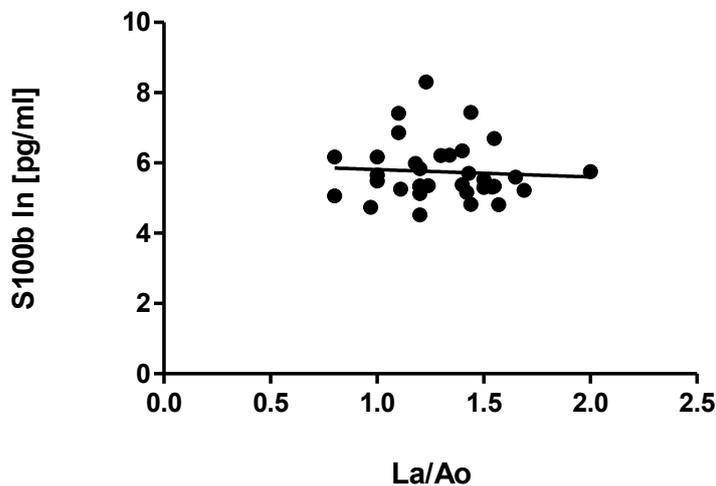


Abbildung 42: Korrelation zwischen S100b am 2. - 4. Lebenstag und der La/Ao-ratio

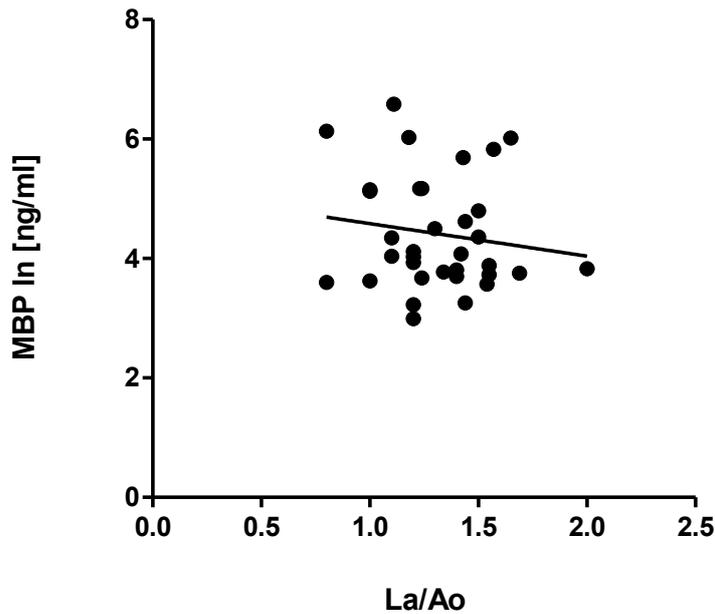
Die Daten der S100b-Konzentrationen wurden mit dem Logarithmus naturalis transformiert und anschließend mit der La/Ao-ratio korreliert.

S100b-Konzentration in [pg/ml], La/Ao-ratio, ln: Logarithmus naturalis,  $n = 34$ ,  $r = -0.06637$ ,  
95 % KI: -0.3957 bis 0.2781,  $p = 0.7092$ ,  $b = -0.2111 \pm 0.5610$ ,  $a = 6.023 \pm 0.7443$ ,  $r^2 = 0.004405$

Die Abbildung 42 zeigt die Korrelation des Markers S100b am 2. - 4. Lebenstag mit der La/Ao-ratio, welche per Echokardiografie am 2. - 4. Lebenstag gemessen wurde. Bei Kindern mit einer großen La/Ao-ratio finden sich keine erhöhten S100b Werte im Urin.

### 3.6.2 Korrelation von MBP am 2. - 4. Lebenstag mit der La/Ao-ratio

Auch MBP zeigte keine signifikante Korrelation. Hier lässt sich anhand des Graphen lediglich ein minimaler Trend erkennen, welcher den Anschein macht, dass Kinder mit einer kleinen La/Ao-ratio höhere MBP-Konzentrationen haben könnten, allerdings liegt hier, wie in Abbildung 43 zu sehen, auch eine große Streubreite über alle La/Ao-Werte (x-Achse) vor.



**Abbildung 43: Korrelation zwischen MBP am 2. - 4. Lebensstag und der La/Ao-ratio**

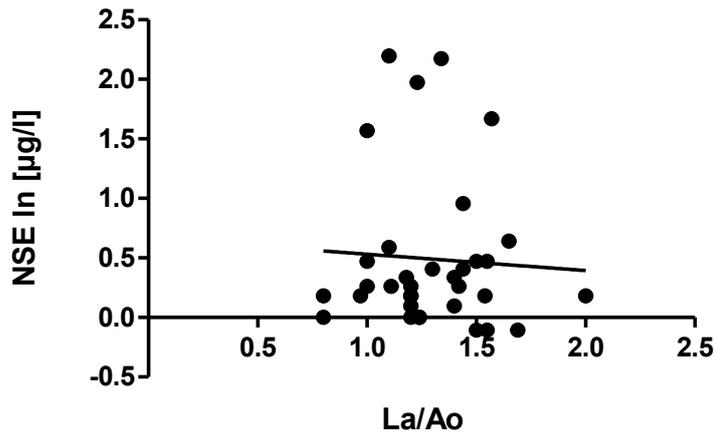
Die Daten der MBP-Konzentrationen wurden mit dem Logarithmus naturalis transformiert und anschließend mit der La/Ao-ratio korreliert.

MBP: Myelin basic protein, MBP-Konzentration in [ng/ml], La/Ao-ratio, In: Logarithmus naturalis,  $n = 34$ ,  $r = -0.1468$ , 95 % KI -0.4621 bis 0.2015,  $p = 0.4075$ ,  $b = -0.5453 \pm 0.6497$ ,  $a = 5.130 \pm 0.8663$ ,  $r^2 = 0.02154$

Die Abbildung 43 zeigt die Korrelation des Markers MBP am 2. - 4. Lebensstag mit der La/Ao-ratio, welche per Echokardiografie am 2. - 4. Lebensstag gemessen wurde. Es lässt sich keine signifikante Korrelation erkennen.

### 3.6.3 Korrelation von NSE am 2. - 4. Lebensstag mit der La/Ao-ratio

Die NSE-Konzentrationen zeigen ebenfalls keine Korrelation mit der La/Ao-ratio. Es lässt sich jedoch erkennen, dass über die La/Ao-Weite (x-Achse) hinweg, viele Kinder ähnlich niedrige Konzentrationen aufweisen. Dem gegenüberzustellen sind einige Kinder mit deutlich höheren Werten. Unter diesen befinden sich jedoch Kinder mit unterschiedlich großen La/Ao-ratios (Abbildung 44).



**Abbildung 44: Korrelation zwischen NSE am 2. - 4. Lebenstag und der La/Ao-ratio**

Die Daten der NSE-Konzentration wurden mit dem Logarithmus naturalis transformiert und anschließend mit der La/Ao-ratio korreliert.

NSE: Neuronen-spezifische Enolase, NSE-Konzentration in [ $\mu\text{g/l}$ ], La/Ao-ratio, ln: Logarithmus naturalis,  $n = 34$ ,  $r = -0.05526$ , 95 % KI:  $-0.3863$  bis  $0.2884$ ,  $p = 0.7563$ ,  $b = -0.1376 \pm 0.4395$ ,  $a = 0.6689 \pm 0.5807$ ,  $r^2 = 0.003054$

Die Abbildung 44 zeigt die Korrelation des Markers NSE am 2. - 4. Lebenstag mit der La/Ao-ratio, welche per Echokardiografie am 2. - 4. Lebenstag gemessen wurde. Es wird kein Zusammenhang ersichtlich.

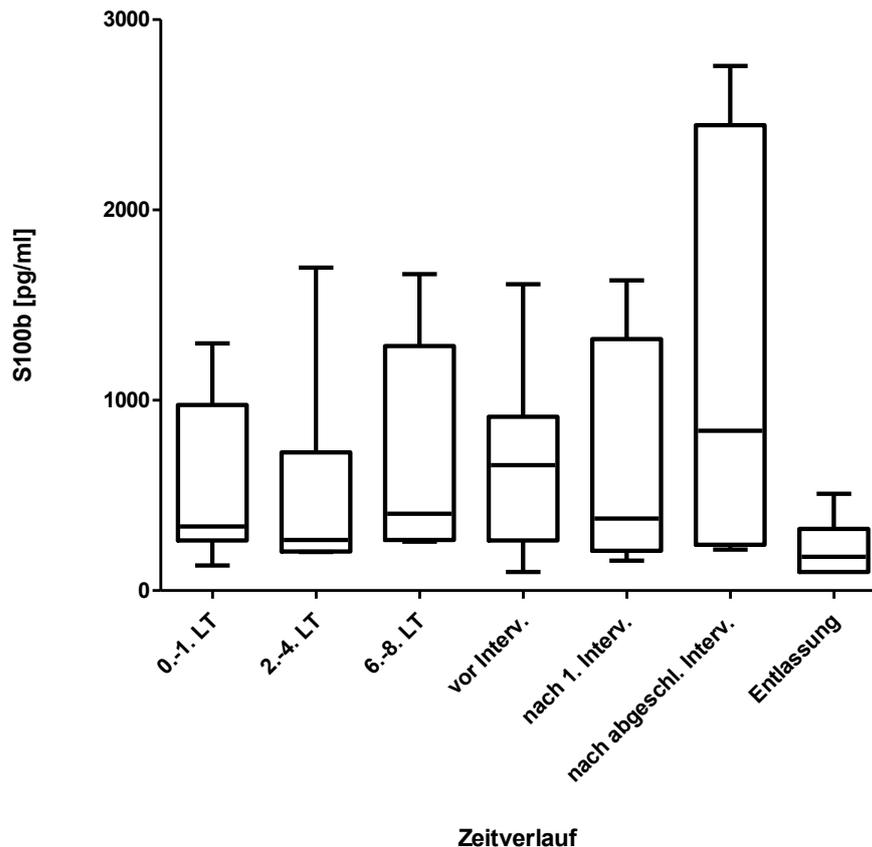
### **3.7 Konzentrationsunterschiede der Proteine S100b, MBP und NSE in Bezug auf die therapeutische Intervention des PDA**

Im Folgenden finden sich die Konzentrationsunterschiede der Proteine S100b, MBP und MBP bei der gesonderten Betrachtung der acht Kinder der Interventionsgruppe.

#### **3.7.1 Verlauf der S100b-Konzentrationen der Interventionsgruppe**

Die Mittelwerte der S100b Konzentrationen bleiben vom 0. - 1. Lebenstag bis zum 2. - 4. Lebenstag weitgehend konstant (0. - 1. Lebenstag: 548.8 pg/ml, 2. - 4. Lebenstag: 516.5 pg/ml, Median: 417.8 pg/ml; 280.6 pg/ml). Danach steigen die Werte und halten sich vom 6. - 8. Lebenstag bis nach der 1. Intervention. (6. - 8. Lebenstag: Mittelwert: 672.6 pg/ml, Median: 404.3 pg/ml, vor Intervention: Mittelwert: 663.9 pg/ml, Median: 659.7 pg/ml, nach 1. Intervention: Mittelwert: 636,2 pg/ml, Median: 378.7 pg/ml). Nach

abgeschlossener Intervention steigt der Mittelwert auf ein Maximum von 1207 pg/ml (Median: 840.1 pg/ml), um dann bis zur Entlassung auf einen minimalen Mittelwert von 238,4 pg/ml (Median: 177,8 pg/ml) zu fallen (Abbildung 45). Im Gegensatz zur Kontrollgruppe (Mittelwert: 157.8 pg/ml) liegen die Werte bei Entlassung hier etwas höher. Es ist somit ein Anstieg durch die Intervention zu verzeichnen, welcher sich jedoch bis zur Entlassung auf Minimalwerte reduziert. Der Tabelle 7 sind die genauen Werte zu den jeweiligen Zeitpunkten zu entnehmen.



**Abbildung 45: Verlauf der S100b-Konzentrationen der Interventionsgruppe**

LT: Lebenstag, Interv.: Intervention mit Ibuprofen, abgeschl. : abgeschlossen, S100b in [pg/ml]

Die Abbildung 45 zeigt den Verlauf der S100b-Konzentrationen der Interventionsgruppe vom 0. - 1. Lebenstag bis zur Entlassung. Insgesamt ist nach einem Anstieg nach der therapeutischen Intervention ein starker Abfall der S100b-Konzentrationen bis zum Entlassungstag zu verzeichnen.

	$\bar{x}$	SD	Minimum	Maximum	n
<b>S100b 0. - 1. LT [pg/ml]</b>	548.8	431.9	132.3	1299.0	7
<b>S100b 2. - 4. LT [pg/ml]</b>	516.5	520.8	202.9	1697.0	8
<b>S100b 6. - 8. LT [pg/ml]</b>	672.6	578.9	256.6	1663.0	8
<b>S100b vor Interv. [pg/ml]</b>	663.9	504.5	98.0	1610.0	7
<b>S100b nach 1. Interv. [pg/ml]</b>	636.2	670.8	157.5	1630.0	4
<b>S100b nach abgeschl. Interv. [pg/ml]</b>	1207.0	1099.0	216.0	2757.0	6
<b>S100b ET [pg/ml]</b>	238.4	151.2	98.0	509.4	7

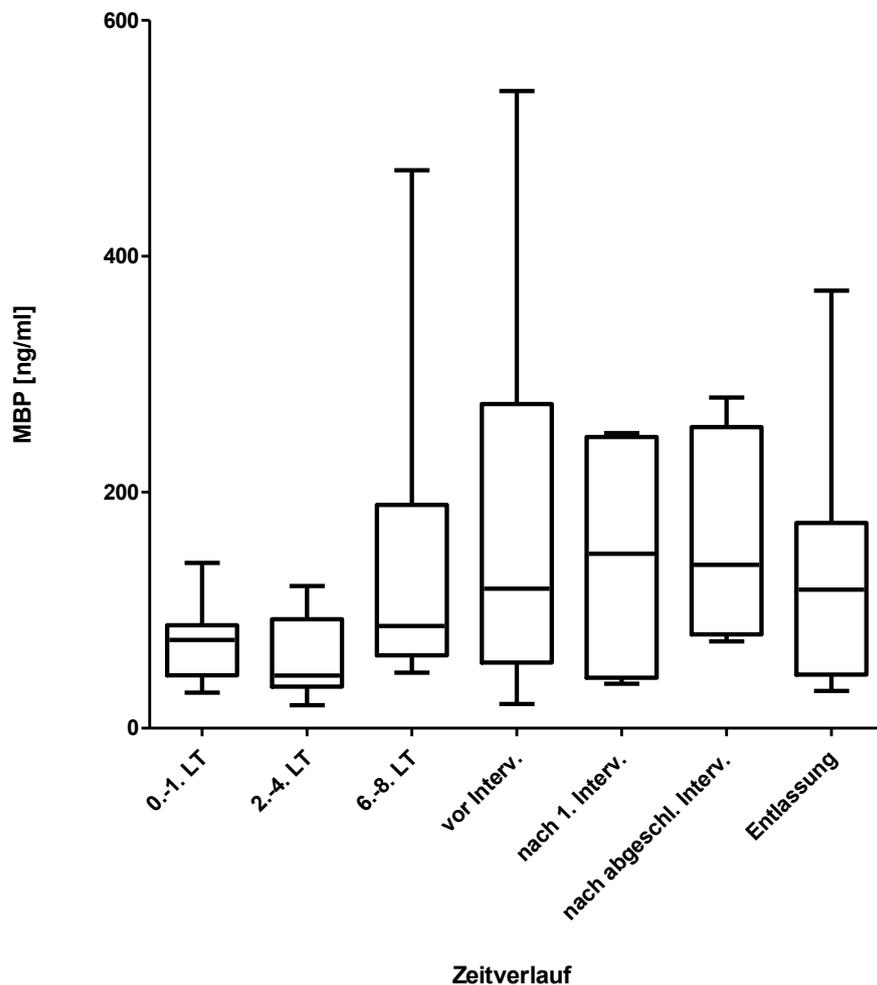
**Tabelle 7: Mittelwerte, Standardabweichungen, Minima und Maxima sowie Probandenanzahl der S100b-Messungen zu allen Probezeitpunkten der Interventionsgruppe**

LT: Lebenstag, ET: Entlassungstag, Interv.: Intervention mit Ibuprofen, abgeschl. : abgeschlossen, S100b in pg/ml,  $\bar{x}$  : Mittelwert, SD: Standardabweichung, Min. : Minimum, Max.: Maximum, n: Anzahl der Probanden

### 3.7.2 Verlauf der MBP-Konzentrationen der Interventionsgruppe

Abbildung 46 zeigt den Verlauf der MBP-Konzentrationen der Interventionsgruppe vom 0. - 1. Lebenstag bis zur Entlassung. Zu den ersten beiden Probezeitpunkten halten sich die MBP-Konzentrationen relativ konstant (0. - 1. Lebenstag Mittelwert: 72.75 ng/ml, Median: 74.70 ng/ml, 2. - 4. Lebenstag Mittelwert: 58.52 ng/ml, Median: 44.67 ng/ml). Danach ist ein Anstieg der MBP-Konzentrationen festzustellen. Am 6. - 8. Lebenstag hat sich der Mittelwert der Konzentrationen im Urin mehr als verdoppelt (von 58.52 ng/ml auf 146.3 ng/ml, Median: 86.67 ng/ml). Danach steigen die Werte auf ein relativ konstantes Niveau von vor der Intervention mit einem Mittelwert von 175.1 ng/ml über 145.8 ng/ml nach dem 1. Zyklus der Intervention bis zur abgeschlossenen Intervention mit einem Mittelwert von 157.7 ng/ml (Mediane: 118.2 ng/ml, 147.8 ng/ml, 138.5 ng/ml). Bis zur Entlassung fallen die Werte wieder leicht auf einen Mittelwert von 133.6 ng/ml und einen Median von 117.4 ng/ml. Der Mittelwert ist vor der Intervention am höchsten. Vergleicht man die MBP-Konzentration bei Entlassung der Interventionsgruppe mit dem Mittelwert der

Kontrollgruppe, so haben die Interventionskinder mit 133.6 ng/ml im Gegensatz zur Kontrollgruppe mit 92.8 ng/ml einen höheren Mittelwert. Der Tabelle 8 sind die genauen Werte zu den jeweiligen Zeitpunkten zu entnehmen.



**Abbildung 46: Verlauf der MBP-Konzentrationen der Interventionsgruppe**

MBP: Myelin basic protein, MBP in [ng/ml], LT: Lebenstag, Interv.: Intervention mit Ibuprofen, abgeschl.: abgeschlossen

In Abbildung 46 wird der Verlauf der MBP-Konzentrationen der Interventionsgruppe vom 0. - 1. Lebenstag bis zur Entlassung dargestellt. Insgesamt steigen die Werte von vor der Intervention bis nach Abschluss der Intervention, um bis zur Entlassung wieder zu fallen.

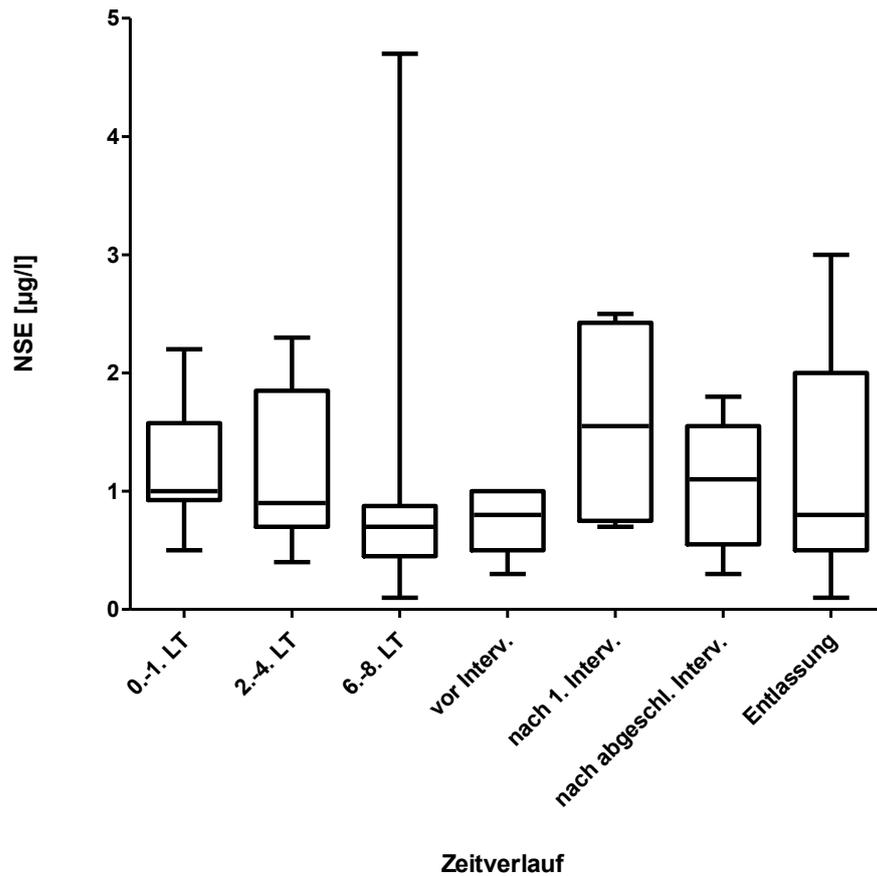
	$\bar{x}$	SD	Min.	Max.	n
<b>MBP 0. - 1. LT [ng/ml]</b>	72.75	34.19	30.10	140.0	8
<b>MBP 2. - 4. LT [ng/ml]</b>	58.52	35.28	19.46	120.6	8
<b>MBP 6. - 8. LT [ng/ml]</b>	146.3	142.4	47.09	472.9	8
<b>MBP vor Interv. [ng/ml]</b>	175.1	188.2	20.50	540.1	6
<b>MBP nach 1. Interv. [ng/ml]</b>	145.8	113.3	37.55	250.1	4
<b>MBP nach abgeschl. Interv. [ng/ml]</b>	157.7	93.50	73.50	280.3	4
<b>MBP ET [ng/ml]</b>	133.6	110.4	31.49	370.9	8

**Tabelle 8: Mittelwerte, Standardabweichungen, Minima und Maxima sowie Probandenanzahl der MBP-Messungen zu allen Probezeitpunkten der Interventionsgruppe**

LT: Lebenstag, ET: Entlassungstag, Interv.: Intervention mit Ibuprofen, abgeschl. : abgeschlossen, MBP: Myelin *basic protein*, MBP in ng/ml,  $\bar{x}$ : Mittelwert, SD: Standardabweichung, Min. : Minimum, Max.: Maximum, n: Anzahl der Probanden.

### 3.7.3 Verlauf der NSE-Konzentrationen der Interventionsgruppe

Die Abbildung 47 zeigt den Verlauf der NSE-Konzentrationen der Interventionsgruppe vom 0. - 1. Lebenstag bis zur Entlassung. Es ist kein eindeutiger Trend festzustellen. Die ersten drei Messzeitpunkte weisen relativ konstante Konzentrationen auf (Mittelwert 0. - 1. Lebenstag: 1.188  $\mu\text{g/l}$ , Median: 1.000  $\mu\text{g/l}$ , 2. - 4. Lebenstag: Mittelwert: 1.138  $\mu\text{g/l}$ , Median: 0.900  $\mu\text{g/l}$ , 6. - 8. Lebenstag: Mittelwert: 1.113  $\mu\text{g/l}$ , Median: 0.7  $\mu\text{g/l}$ ). Vor der Intervention fällt der Mittelwert auf 0.729  $\mu\text{g/l}$  (Median: 0.800  $\mu\text{g/l}$ ). Unter der Intervention steigt die NSE-Konzentration auf einen Mittelwert von 1.575  $\mu\text{g/l}$  und einen Median von 1.575  $\mu\text{g/l}$  an. Die Konzentration fällt jedoch nach Abschluss der Intervention wieder (Mittelwert: 1.060  $\mu\text{g/l}$ , Median: 1.100  $\mu\text{g/l}$ ) und weist bei Entlassung einen Mittelwert von 1,171  $\mu\text{g/l}$  und einen Median von 0.800  $\mu\text{g/l}$  auf. Zur Entlassung liegt der Mittelwert der Interventionsgruppe (Mittelwert: 1.171  $\mu\text{g/l}$ ) knapp unter dem der Kontrollgruppe (Mittelwert: 1.210  $\mu\text{g/l}$ ). Der Tabelle 9 sind die genauen Werte zu den jeweiligen Zeitpunkten zu entnehmen.



**Abbildung 47: Verlauf der NSE-Konzentrationen der Interventionsgruppe**

NSE: Neuronen spezifische Enolase, NSE in [ $\mu\text{g/l}$ ], LT: Lebenstag, Interv.: Intervention mit Ibuprofen, abgeschl. : abgeschlossen, NSE: Neuronen-spezifische Enolase, NSE in [ $\mu\text{g/l}$ ]

Abbildung 47 stellt den Verlauf der NSE-Konzentrationen der Interventionsgruppe vom 0. - 1. Lebenstag bis zur Entlassung dar. Zu den ersten drei Messzeitpunkten halten sich die Konzentrationen recht konstant. Während der Intervention steigen die Konzentrationen. Nach Abschluss der Intervention beginnen sie zu sinken, um bis zur Entlassung wieder deutlich zu fallen.

	$\bar{x}$	SD	Min.	Max.	n
<b>NSE 0. - 1. LT [<math>\mu\text{g/l}</math>]</b>	1.188	0.5276	0.5	2.2	8
<b>NSE 2. - 4. LT [<math>\mu\text{g/l}</math>]</b>	1.138	0.6968	0.4	2.3	8
<b>NSE 6. - 8. LT [<math>\mu\text{g/l}</math>]</b>	1.113	1.4710	0.1	4.7	8
<b>NSE vor Interv. [<math>\mu\text{g/l}</math>]</b>	0.7286	0.2690	0.3	1.0	7
<b>NSE nach 1. Interv. [<math>\mu\text{g/l}</math>]</b>	1.575	0.9069	0.7	2.5	4
<b>NSE nach abgeschl. Interv. [<math>\mu\text{g/l}</math>]</b>	1.060	0.5595	0.3	1.8	5
<b>NSE ET [<math>\mu\text{g/l}</math>]</b>	1.171	1.019	0.1	3.0	7

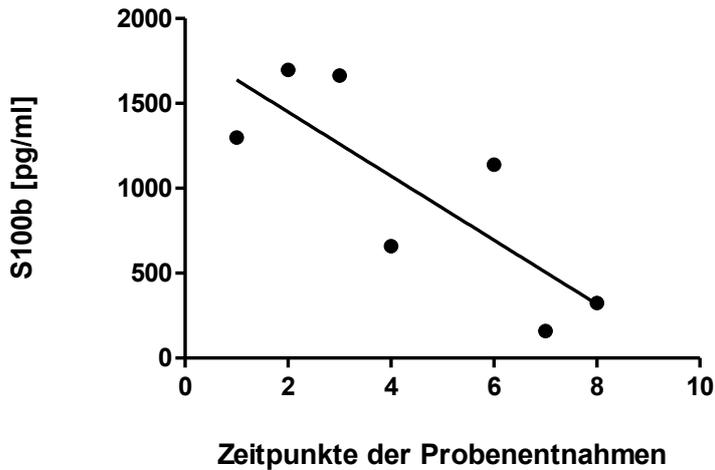
**Tabelle 9: Mittelwerte, Standardabweichungen, Minima und Maxima sowie Probandenanzahl der NSE-Messungen zu allen Probezeitpunkten der Interventionsgruppe**

LT: Lebenstag, ET: Entlassungstag, Interv.: Intervention mit Ibuprofen, abgeschl. : abgeschlossen, NSE: Neuronen-spezifische Enolase, NSE in  $\mu\text{g/l}$ ,  $\bar{x}$  : Mittelwert, SD: Standardabweichung, Min. : Minimum, Max.: Maximum, n: Anzahl der Probanden

### **3.8 Exemplarische Darstellung eines Kindes mit operativer Ligatur**

Im Folgenden wird exemplarisch ein Kind, welches nach erfolgloser pharmakologischer Intervention eine Duktusligatur erhielt, vorgestellt. Abbildungen 48 - 50 zeigen die Konzentrationen der Proteine S100b, MBP und NSE zu allen 8 Messzeitpunkten vom 0. - 1. Lebenstag über die pharmakologische Intervention, die Ligatur bis hin zur Entlassung. Den Tabellen 10 - 12 sind die genauen Konzentrationen zu den einzelnen Messzeitpunkten zu entnehmen. Eine Probensammlung nach dem 1. Zyklus der pharmakologischen Intervention war nicht möglich.

### 3.8.1 Verlauf der S100b-Konzentrationen



**Abbildung 48: Verlauf der S100b-Konzentrationen bei einem Kind mit operativer Ligatur des Duktus nach erfolgloser pharmakologischer Intervention**

S100b in [pg/ml], Zeitpunkte der Probenentnahme: 1) 0. - 1. Lebenstag, 2) 2. - 4. Lebenstag, 3.) 6 - 8. Lebenstag, 4) vor pharmakologischer Intervention, 5) nach 1. pharmakologischer Intervention (hier: keine Probe möglich), 6) nach abgeschlossener pharmakologischer Intervention, 7) nach Ligatur, 8) Entlassung,

$$b = -188.8 \pm 62.96, a = 1828 \pm 318.4, r^2 = 0.6426$$

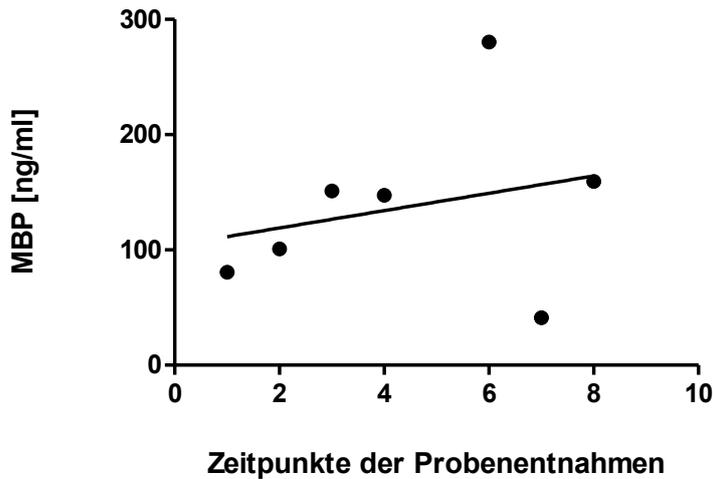
Die Abbildung 48 zeigt den exemplarischen Verlauf eines Kindes, welches nach erfolgloser Intervention eine operative Ligatur des Duktus erhielt. Insgesamt betrachtet erkennt man einen Abfall der Konzentration von S100b zur Entlassung hin. Zudem erkennt man einen deutlichen Abfall nach der Operation. Die genauen Werte sind Tabelle 10 zu entnehmen.

	0. - 1. LT	2. - 4. LT	6. - 8. LT	vor Interv.	nach 1. Interv.	nach abg. Interv.	nach Ligatur	ET
<b>S100b [pg/ml]</b>	1298.5	1697.2	1663.4	660.0	x	1139.4	159.5	324.2

**Tabelle 10: Verlauf der S100b-Konzentrationen vom 0. - 1. Lebenstag bis Entlassung bei einem Kind der Interventionsgruppe, welches eine Ligatur erhielt**

LT: Lebenstag, ET: Entlassungstag, Interv.: Intervention, abg Interv.: abgeschlossene Intervention  
x: keine Messung möglich

### 3.8.2 Verlauf der MBP-Konzentrationen



**Abbildung 49** Verlauf der MBP-Konzentrationen bei einem Kind mit operativer Ligatur des Duktus nach erfolgloser pharmakologischer Intervention

MBP: Myelin basic protein, MBP in [ng/ml], Zeitpunkte der Probenentnahme: 1) 0. - 1. Lebenstag, 2) 2. - 4. Lebenstag, 3.) 6. - 8. Lebenstag, 4) vor pharmakologischer Intervention, 5) nach 1. pharmakologischer Intervention (hier: keine Probe möglich), 6) nach abgeschlossener pharmakologischer Intervention, 7) nach Ligatur, 8) Entlassung

$$b = 7.533 \pm 12.51, a = 103.9 \pm 63.27, r^2 = 0.06759$$

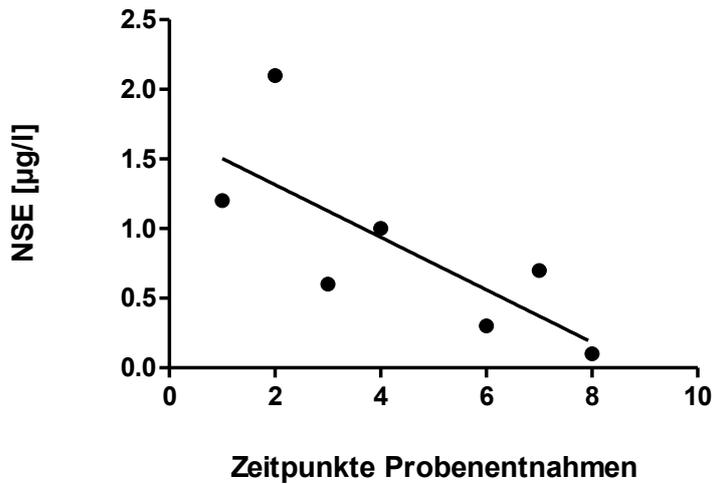
Die Abbildung 49 zeigt den exemplarischen Verlauf eines Kindes, welches nach erfolgloser Intervention eine operative Ligatur des Duktus erhielt. Es lässt sich ein Anstieg der Konzentration von MBP zur Entlassung hin verzeichnen. Die genauen Werte sind Tabelle 11 zu entnehmen.

	0. - 1. LT	2. - 4. LT	6. - 8. LT	vor Interv.	nach 1. Interv.	nach abg. Interv.	nach Ligatur	ET
<b>MBP [ng/ml]</b>	80.694	100.91	151.2	147.5	x	280.33	41.098	159.31

**Tabelle 11** Verlauf der MBP-Konzentrationen vom 0. - 1. Lebenstag bis zur Entlassung ei einem Kind der Interventionsgruppe welches eine Ligatur erhielt

LT: Lebenstag, ET: Entlassungstag, Interv.: Intervention, abg Interv.: abgeschlossene Intervention, x: keine Messung möglich

### 3.8.3 Verlauf der NSE-Konzentrationen



**Abbildung 50: Verlauf der NSE-Konzentrationen bei einem Kind mit operativer Ligatur des Duktus nach erfolgloser pharmakologischer Intervention**

NSE: Neuronen-spezifische Enolase, NSE in [µg/l], Zeitpunkte der Probenentnahme:

1) 0. - 1. Lebenstag, 2) 2. - 4. Lebenstag, 3.) 6 - 8. Lebenstag, 4) vor pharmakologischer Intervention, 5) nach 1. pharmakologischer Intervention (hier: keine Probe möglich), 6) nach abgeschlossener pharmakologischer Intervention, 7) nach Ligatur, 8) Entlassung

$$b = -0.1887 \pm 0,07498, a = 1.693 \pm 0.3790, r^2 = 0.5590$$

Die Abbildung 50 zeigt den exemplarischen Verlauf eines Kindes, welches nach erfolgloser Intervention eine operative Ligatur des Duktus erhielt. Es wird ein Abfall der Konzentration von NSE zur Entlassung hin ersichtlich. Man erkennt einen Abfall nach angeschlossener Intervention, jedoch auch wieder einen Anstieg nach der Ligatur. Zur Entlassung sind der Wert auf ein Minimum gefallen. Die genauen Werte sind Tabelle 12 zu entnehmen.

	0. - 1. LT	2. - 4. LT	6. - 8. LT	vor Interv.	nach 1. Interv.	nach abg. Interv.	nach Ligatur	ET
NSE [µg/l]	1.2	2.1	0.6	1.0	x	0.3	0.7	0.1

**Tabelle 12: Verlauf der NSE-Konzentrationen vom 0. - 1. Lebenstag bis Entlassung bei einem Kind der Interventionsgruppe welches eine Ligatur erhielt**

LT: Lebenstag, ET: Entlassungstag, Interv.: Intervention, abg Interv.: abgeschlossene Intervention, x: keine Messung möglich

## 4. Diskussion

Biomarker sind in den letzten Jahren zu einem aussichtsvollen Gegenstand der Forschung geworden, da sie Früherkennung von benignen sowie malignen Erkrankungen versprechen. Viele dieser Marker sind bereits etabliert bzw. haben Einzug in die Klinik genommen, bedürfen aber häufig einer invasiven Methode wie einer Blutentnahme oder Lumbalpunktion. So wird es immer wichtiger Marker zu finden, die möglichst nicht-invasiv messbar sind.

Gerade im Bereich der Neonatologie spielen die Probleme einer invasiven Diagnostik eine enorme Rolle. Vor allem bei den *very low birth weight infants*, Kindern, die mit einem Gewicht von unter 1500 g geboren werden, konnte gezeigt werden, dass diese vom *minimal handling*, also einer Beschränkung auf die, für eine sichere Behandlung unerlässlichen, pflegerischen und ärztlichen Maßnahmen, profitieren (Dahl and Kamper, 2006; Jacobsen et al., 1993). Die Bestimmung von Markern im Urin ist gerade aus diesem Grund von besonderem Interesse. Urin kann jederzeit non-invasiv durch das Kleben von Urinbeuteln oder, wie in unserer Studie, über Mulltupfer in den Windeln der Kinder gesammelt werden. Die Kinder werden bei den routinemäßigen Pflegerunden somit nicht zusätzlich gestört.

Da der PDA und dessen Einfluss auf die Hämodynamik ein sehr häufiges sowie weiterhin aktuelles Problem darstellt und die Indikation zur Therapie noch nicht einheitlich festgelegt wurde, ist gerade dies eine Problematik, welche nach Biomarkern verlangt. So hat sich in Studien das *B-type natriuretic peptide* im Plasma als hilfreicher Marker bei der Einschätzung eines hämodynamisch signifikanten PDA herausgestellt (Farombi-Oghuvbu et al., 2008; Sanjeev et al., 2005).

Unsere Studie versuchte Marker zu finden, die im Urin nachweisbar sind und eine Aussage über den Gehirnzellabbau, welcher möglicherweise durch einen hämodynamisch signifikanten PDA bedingt sein könnte, treffen können. Außerdem sollten die Marker die Möglichkeit bieten, Hinweise auf die betroffene Zellreihe zu geben.

Im Folgenden wird auf die Marker S100b, NSE und MBP im Detail eingegangen.

Erhöhte Werte von S100b sind bei multiplen neurologischen Erkrankungen, traumatischen und atraumatischen Hirnschäden beschrieben worden (Büttner et al., 1997; Missler et al., 1997; Raabe et al., 1999). Zudem hat sich S100b bei anderen neonatologischen Problemen wie der perinatalen Asphyxie (Ruetzler et al., 2006) und intraventrikulären Hirnblutungen

(Gazzolo et al., 1999) als positiv prädiktiver Marker herausgestellt. Auch bei akuten ischämischen Schlaganfällen konnte durch erhöhte S100b-Werte eine Einschätzung über das Infarktareal und über das neurologische *outcome* getroffen werden (Missler et al., 1997). Alle diese Erkrankungen gehen mit einer möglichen Hypoxie bzw. einem potentiellen Zellschaden einher. So war es naheliegend diesen Marker auch für die Einschätzung einer eventuellen Sauerstoffminderversorgung des Gehirns, welche durch einen hsPDA geschuldet sein könnte, zu untersuchen.

Unsere Studie konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kindern mit einem PDA und ohne PDA (am 2. - 4. Lebenstag) ausmachen. Auch der Vergleich der Kontroll- mit der Interventionsgruppe brachte keinen Unterschied hervor. Dies kann zum einen an der zu kleinen Probandenzahl liegen, zum anderen aber auch an der Messweise im Urin. Zudem kann man die Hypothese aufstellen, dass kein Hirnzellabbau stattfindet oder dieser durch unser Verfahren nicht messbar ist. Zum anderen könnte die Behandlung der Proben und deren Lagerung dazu beigetragen haben, dass Proteine zerfallen sind.

Ruetzler et al. (2006) konnten zeigen, dass im Urin gemessenes S100b als Marker für eine schwere Asphyxie bei reifen Neugeborenen dienen kann, erhöhte S100b Werte bei Frühgeborenen jedoch mit Unreife assoziiert sind. In dieser Untersuchung ist jedoch die geringe Probandenzahl von 18 Patienten zu berücksichtigen. Der Urin wurde hier wie auch in der Studie von Tosse et al (2012) mit dünnen Damenbinden gesammelt. Wir verwarfen dieses anfänglich übernommene Konzept nach einigen Monaten, da es vermehrt zur Zerstörung der Proben durch Ausflocken bzw. Kristallisieren des in der Binde befindlichen saugfähigen Materials kam. Ruetzler et al. (2006) kühlten den Urin maximal 48 Stunden bei 4 °C bevor dieser anschließend zentrifugiert wurde. In unserer Studie wurden die Binden bzw. Mulltupfer für maximal 24 Stunden gekühlt und anschließend zentrifugiert. Danach wurde der Urin mit einer Frist von maximal einem Jahr bei -80 °C tiefgefroren, gelagert und anschließend mit Hilfe eines ELISAs gemessen. Es findet sich in der Arbeit von Ruetzler et al. (2006) keine Angabe dazu, wie die Proben nach Zentrifugation weiterverarbeitet wurden. Unsere Probengewinnung sowie Asservierung ist angelehnt an Tosse et al. (2012), die erfolgreich Proteine im Urin in Zusammenhang mit einem PDA untersuchten. So ist anzunehmen, dass unser Verfahren Proteine wie S100b nicht schädigt. Unsere Annahme wird durch Sannia et al. (2010) untermauert, die Urin bei -70 °C eingefroren haben und ebenfalls signifikante Ergebnisse für S100b erhielten. Diese Arbeitsgruppe verwendete allerdings ein anderes Verfahren als unsere Studie, einen immuno-luminometrischen *assay*.

Wir konnten zeigen, dass unreife Kinder signifikant höhere S100b Konzentrationen im Urin aufweisen. Daher gehen wir davon aus, dass unsere Methode geeignet ist, Konzentrationsunterschiede zu messen. Bezogen auf die Probandenanzahl muss man bemerken, dass viele der Studien, welche eine Assoziation von S100b mit verschiedenen Erkrankungen belegen konnten, auf geringere Probandenzahlen als unsere Studie aufbauen (Gazzolo et al., 1999; Roka et al., 2012; Ruetzler et al., 2006). Somit ist anzunehmen, dass ein möglicher Effekt bzw. der Anstieg von S100b bei Gehirnzellschädigung auch in unserer Studie aufgezeigt werden müsste.

Die Mehrzahl der Studien, die S100b in Bezug auf neurologische Erkrankungen bzw. Hirnschädigungen untersucht haben, haben die Bestimmung von S100b aus dem Blut gewählt (Büttner et al., 1997; Gazzolo et al., 1999; Johnsson et al., 1995; Kleine et al., 2003; Missler et al., 1997; Roka et al., 2012). Hier fanden jedoch auch verschiedene Methoden bzw. *assays* wie der *two-site immunoradiometric assay* (IRMA) (Gazzolo et al., 1999), *two-site immunoluminometric assay* (LIA) (Kleine et al., 2003), *non-isotopic immunoassay* (Missler et al., 1997) sowie der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) Verwendung (Roka et al., 2012). Letzteres Verfahren verwendeten wir ebenfalls in unserer Studie, allerdings im Urin. Leite et al. konnten in 2 Protokollen von ELISAs zeigen, dass die Erfassung von S100b vom Oxidationszustand des S100b abhängt. Dies ist bei der Verwendung der Methode zu berücksichtigen, vorausgesetzt man nimmt an, dass reduzierte und oxidierte Formen des Proteins *in vivo* coexistieren und durch beispielsweise oxidativen Stress modifiziert werden könnten (Leite et al., 2008).

Auch konnten gute Ergebnisse von van Engelen et al. in der Bestimmung von S100b mit dem *particle counting immunoassay* (PACIA) im Liquor gezeigt werden (van Engelen et al., 1992). Die Bestimmung aus dem Liquor wurde bereits vielfach untersucht (Hårdemark et al., 1989; Sindic et al., 1982), vermag aber, aufgrund seiner invasiven Gewinnung sowie den möglichen Komplikationen und Nebenwirkungen keinen Einzug in die neonatologische Praxis gewinnen.

In Zusammenschau der erwähnten Studien lässt sich S100b als ein vielversprechender potentieller Marker für Hirnschäden identifizieren. In Anbetracht der zahlreichen Methoden, S100b in den verschiedenen Körperflüssigkeiten zu quantifizieren, sind sicherlich noch weitere Studien nötig, um eine möglichst genaue und nicht-invasive Möglichkeit der Bestimmung dieses Proteins zu finden. Unsere Studie konnte keinen Zusammenhang

zwischen S100b und einem persistierenden Duktus finden. Dennoch ist anzunehmen, dass unsere Methode fähig ist, auf einen vorhandenen Hirnzellschaden hinzuweisen. Dies wird unter anderem dadurch deutlich, dass bei uns, wie bereits Ruetzler et al. (2006) zeigten, S100b bei unreifen Kindern signifikant erhöht war. So konnten wir eine signifikante Korrelation zwischen dem Gestationsalter und S100b am 0. - 1. Lebenstag sowie am 6. – 8. Lebenstag ( $p = 0.007$ ,  $p = 0.0149$ ) nachweisen. Betrachtet man die Korrelation des Geburtsgewichts mit der Konzentration von S100b am 2. - 4. Lebenstag, zeigt sich ein hochsignifikanter Zusammenhang. Kinder mit einem geringen Geburtsgewicht weisen deutlich höhere S100b-Konzentrationen im Urin auf als Kinder mit einem höheren Geburtsgewicht ( $p = 0.0008$ ). Der Vergleich zwischen der Kontroll- und der PDA-Gruppe zeigte keinen Unterschied bezüglich der S100b-Konzentrationen. Im Vergleich der Kontroll- und der Interventionsgruppe, also den reifsten Kindern ohne PDA und den unreifen Kindern mit PDA, welche einer Therapie bedurfte, konnte ebenfalls kein Unterschied in der S100b-Konzentration an allen vier Messzeitpunkten festgestellt werden.

Aufgrund der signifikanten Ergebnisse bezogen auf Gestationsalter und Geburtsgewicht kann angenommen werden, dass trotz geringer Patientenzahl und einer bisher nicht etablierten Methode, unsere Studie den schädigenden Einfluss eines PDAs auf die Gehirnzellen hätte anzeigen können. Somit drängt sich die Frage auf, ob ein Gehirnzellabbau stattfindet bzw. Zellschäden auftreten oder ob diese nicht messbar sind oder in nur geringem Maße Astrozyten betreffen.

NSE hat sich in den letzten Jahren zu einem wichtigen Tumormarker entwickelt. So kommt es beispielsweise als Verlaufsparemeter beim kleinzelligen Bronchialkarzinom zur Anwendung. Hier finden sich bei 60 - 81 % Konzentrationserhöhungen von NSE (Ebert et al., 1997; Lamerz R., 1988). Zudem spielt es eine wesentliche Rolle beim Neuroblastom. Hier kann ein Therapieerfolg anhand der NSE-Konzentration im Urin abgeschätzt werden. In diesem Zusammenhang konnten erhöhte NSE-Konzentrationen durch Tumorzell-Lyse nachgewiesen werden. Das beim Zellzerfall anfallende NSE ist wiederum im Urin nachweisbar (Gotoh et al., 1986).

NSE ist aber, wie der Name dieses Enzyms schon erkennen lässt, ein Neuronen-spezifisches Enzym, welches vornehmlich in dieser Zelllinie des Gehirns vorkommt (Lamerz R., 1988). Zahlreiche Studien haben bereits einen Zusammenhang zwischen neurologischen bzw. zerebralen Erkrankungen und NSE-Erhöhungen nachgewiesen. Es konnten Assoziationen

zu Hirninfarkten (Missler et al., 1997), intrazerebralen Hämatomen (Kuroiwa et al., 1994) und Hirnschäden bei Akutpatienten (Kleine et al., 2003) gefunden werden. Hypoxie bzw. perinatale Asphyxie (Roka et al., 2012) sowie die hypoxisch-ischämische Enzephalopathie (Çeltik et al., 2004b; Ramaswamy et al., 2009) stehen ebenfalls in Verbindung mit erhöhten Konzentrationen von NSE. Es finden sich unterschiedliche Methoden, die sich hinsichtlich des Verfahrens sowie der Wahl des Patientenmaterials unterscheiden. Es finden sich Untersuchungen aus dem Urin (Gotoh et al., 1986), Blut (Kleine et al., 2003; Missler et al., 1997; Roka et al., 2012) und Liquor (Blennow et al., 2001; Ezgü et al., 2002; Garcia-Alix et al., 1994; Mokuno et al., 1983; Persson et al., 1987; van Engelen et al., 1992). Die Bestimmung aus dem Urin, wie sie in unserer Studie Anwendung findet, zeigt nach Ramaswamy et al. (2009) schlechtere Ergebnisse bezogen auf Hirnschäden als die Bestimmung aus dem Liquor, ist jedoch besser fähig systemische Schäden aufzuzeigen. Gleiches gilt für die Bestimmung aus dem Blut. Auch hier zeigt Liquor die bessere Fähigkeit Hirnzellschäden aufzuzeigen (Ramaswamy et al., 2009).

Gerade ältere Studien haben Liquor als Probenmaterial gewählt (Jacobi and Reiber, 1988; Mokuno et al., 1983; van Engelen et al., 1992). Eine Lumbalpunktion ist wesentlich invasiver als die Gewinnung von Urin, birgt jedoch ein relativ geringes Risiko für Nebenwirkungen. Im *setting* einer neonatologischen Intensivstation und der Unreife der Kinder ist sie aber für diese Indikation nicht zumutbar. Hinzu kommen der größere organisatorische und zeitliche Aufwand. Gerade deshalb ist eine Studie wie die unsere notwendig, um neue Methoden der Bestimmung potentieller und etablierter Biomarker zu untersuchen.

Die Patientenpopulationen der einzelnen Studien variieren stark. Auch Studien mit deutlich geringeren Probandenzahlen als unsere Untersuchung haben NSE als möglichen prädiktiven Marker deklariert bzw. Konzentrationserhöhungen in Verbindung mit Hirnzellschädigung gefunden. Daher ist anzunehmen, dass ein möglicher Hirnzellabbau durch einen hsPDA auch auf Basis der Patientenpopulation in unserer Studie hätte nachgewiesen werden können. Hier bleibt jedoch zu beachten, dass wir die Konzentrationsbestimmung aus Urin vorgenommen haben. Da auch Erythrozyten NSE enthalten, kann durch eine Hämaturie und zusätzlich unsachgemäße Zentrifugation eine zu hohe Konzentration gemessen werden. Dieses Problem ist jedoch bei der Bestimmung aus dem Blut, beispielsweise durch Hämolyse, um ein vielfaches wahrscheinlicher. In der Herstelleranleitung des ECLIA's (Cobas, Roche, Mannheim) wird nochmals gesondert auf dieses Problem hingewiesen.

Wir haben zudem einen Test verwendet, welcher für die Bestimmung aus dem Urin nicht etabliert ist. Dies stellt eine weitere Begrenzung in unserer Studie dar. Der Elektro-Chemilumineszenz Immuno-*assay* von Roche ist für die Bestimmung aus dem Serum entwickelt worden. Nach einem positiven Testlauf und nach Rücksprache mit dem Zentrallabor des Uniklinikums Düsseldorf, haben wir uns entschlossen, dieses Verfahren zu nutzen, um NSE im Urin nachzuweisen.

Gotoh et al. (1986) haben die Urinproben zusätzlich mit Glycerol versetzt und bei  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Wir haben den Urin ohne jeglichen Zusatz eingefroren. Ob NSE aufgrund unserer Methodik zerfallen ist oder zerstört wurde, lässt sich auf Basis der wenigen Studien, die NSE im Urin bestimmt haben, nicht abschätzen. Allerdings lässt sich anhand der erheblichen Schwankungen der Konzentrationen von  $0.1\text{ }\mu\text{g/l}$  bis zu  $31.4\text{ }\mu\text{g/l}$  annehmen, dass bei gleicher Behandlung der Proben, solch ein Unterschied nicht gemessen worden wäre, wenn NSE erheblichen Schaden aufgrund der Asservierung genommen hätte.

Basierend auf den bisherigen Studien und den vorwiegend positiven Ergebnissen bezüglich NSE als Marker für Hirnzellschädigung sowie für andere neonatologische Probleme wie der intrakraniellen Blutung, der perinatalen Asphyxie sowie der relativ spezifischen Zugehörigkeit dieses Enzyms zu Neuronen und neuroendokrinen Zellen, haben wir uns dazu entschieden, diesen Marker, in Bezug auf den hsPDA, zu untersuchen. Mokuno et al. (1983) konnten zudem zeigen, dass Messungen von NSE und S100b eine Zuordnung des Hirnzellschadens als neuronal, glial oder gemischtzellig ermöglichen könnten. Zudem konnten Giuseppe et al. (2009) in der ischämischen Phase eines perinatalen zerebralen hypoxisch-ischämischen Insults eine Assoziation zwischen NSE und neuronaler Nekrose feststellen sowie S100b-Erhöhungen als Ausdruck der Reperfusion nach einer zerebralen Ischämie nachweisen. Somit konnten sie beide Proteine als mögliche Biomarker bei der perinatalen Asphyxie identifizieren. Hier haben wir angeknüpft und diese Thesen für unsere Studie übernommen.

Betrachtet man unsere Ergebnisse zu NSE muss man jedoch annehmen, dass entweder kein Hirnzellabbau stattgefunden hat, dieser über NSE nicht messbar ist oder wir die falsche Methode bzw. Patientenprobe verwendet haben. Zu keinem Zeitpunkt konnte eine Signifikanz in Bezug auf NSE-Konzentration verzeichnet werden. Weder Gestationsalter, Geburtsgewicht, sonografische und echokardiografische Parameter, noch die verschiedenen Patientengruppen konnten zu einem Zeitpunkt ein statistisch signifikantes Ergebnis

aufzeigen. Dass sogar die beiden Gruppen mit den extremsten Unterschieden in ihren Eigenschaften, die Kontroll- und die Interventionsgruppe, keinen signifikanten Unterschied in der NSE-Konzentration zeigen, weist darauf hin, dass entweder der hsPDA und die damit verbundene Hämodynamik keinen Einfluss auf Neurone hat oder unsere Methode nicht befähigt ist diesen aufzuzeigen. Angenommen NSE zeigt, wie Ramaswamy et al., (2009) in ihrem Review beschreiben, Hinweise auf das langfristige neurologische *outcome*, so wäre daraus abzuleiten, dass unsere Probandenkinder keine oder kaum neurologische Schäden davon tragen. Jedoch machen die Autoren auch auf die Heterogenität in den Ergebnissen der in ihrem Review eingeschlossenen Studien aufmerksam. Hinsichtlich der Verbindung zu unserer Studie muss man jedoch auch festhalten, dass die Studien, die in diesem Review ausgewertet wurden, selten die Methode der NSE-Bestimmung im Urin gewählt haben.

Ein weiteres Ziel unserer Arbeit war es einen möglichen Hirnschaden einer Zelllinie zuzuordnen zu können. Daher wurde auch das MBP untersucht, welches die dritte große Zelllinie, die Oligodendrozyten, widerspiegeln soll.

MBP spielt mit Proteolipid-Protein eine große Rolle als Bestandteil der Myelinscheiden (Hasegawa et al., 1992). MBP ist im Zytoplasma sich entwickelnder Oligodendroglia vor Beginn der Myelinisierung zu finden (Sternberger et al., 1978). Es konnten Assoziationen zu neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer gefunden werden. Die Immunreaktivität des MBP war beim Morbus Alzheimer im Vergleich mit Patienten, die keine kognitive Einschränkung haben um 28 % vermindert und beim Vergleich mit einer milden kognitiven Störung (*mild cognitive impairment*) um 15 % verringert (Wang et al., 2004). Zudem konnte eine Assoziation von MBP mit dem Krankheitsverlauf einer Multiplen Sklerose gefunden werden. Der Übergang in die chronisch progressive Phase geht mit einem Anstieg von *MBP-like material* im Urin einher (Whitaker et al., 1995).

Bei der Literaturrecherche zeigt sich, dass MBP bisher noch nicht umfassend untersucht worden ist. Es sind jedoch viele Studien zu finden, die die Annahme zulassen, dass dieses Protein dazu in der Lage sein könnte, möglichen Gehirnzellabbau aufzuzeigen. In unserer Studie haben wir versucht MBP insbesondere hinsichtlich seines Verhaltens bei Hypoxie zu untersuchen. Wir konnten keine direkte Assoziation mit den hämodynamischen Auswirkungen eines PDA finden, jedoch werden unsere Ergebnisse, welche am 0. - 1. Lebenstag sowie am 2. - 4. Lebenstag signifikant höhere Werte bei den Kindern mit geschlossenem Duktus gezeigt haben, von bisherigen Studien untermauert. Percy et al.

konnten zeigen, dass altersabhängige Konzentrationsunterschiede des *MBP-like material* im Urin bestehen. So waren die Konzentrationen von *MBP-like material* in Neugeborenen bis zum 12. Lebensmonat signifikant geringer und zwischen dem 2. bis 8. Lebensjahr signifikant höher als bei Erwachsenen. Im Urin nachgewiesenes *MBP-like material* zeigt demnach ein Entwicklungsprofil, welches dem Anfang der physiologischen Myelinisierung entspricht und die Normwerte von Erwachsenen in der Kindheit überschreitet. (Percy et al., 1998). Van Engelen et al. fanden zudem einen relativen Anstieg der MBP-Konzentration im Liquor von 1 % pro Jahr zwischen dem 0.7. - 66. Lebensjahr (medianer Anstieg). Ihre Studie, die auch S100b und NSE als im ZNS vorkommende Proteine untersuchte, verdeutlicht, dass alterskorrelierte Referenzwerte dieser Marker nötig sind, um diese klinisch nutzen zu können. Van Engelen et al. merken zudem an, dass die im Alter zunehmende Durchlässigkeit der Blut-Hirnschranke keine Erklärung für den Anstieg der Konzentration im Liquor über die Jahre sein kann, da keine Transsudation vom Blut in den Liquor stattfindet (van Engelen et al., 1992).

In unserer Studie konnten wir den vorbeschriebenen reifeassoziierten Anstieg der MBP-Konzentration im Urin der Kontrollgruppe nur an zwei Messzeitpunkten feststellen. Da wir in der Literatur keine Studie finden konnten, die Aussagen zu alterskorrelierten Konzentrationen von MBP bei Frühgeborenen treffen, können wir nur anhand der bisherigen Studien, eine altersabhängige Entwicklung der Proteinkonzentration auch bei Frühgeborenen vermuten, da reifere Kinder bzw. die Kinder der Kontrollgruppe zu den frühen Messzeitpunkten signifikant höhere Werte aufwiesen. Daraus lässt sich schließen, dass sich die Werte der unreifen Kinder innerhalb der ersten 6 Lebenstage den der reiferen Kinder anpassen. Dies wird durch die Mittelwerte deutlich, die bei der PDA-Gruppe an den ersten beiden Messzeitpunkten bei 85.22 ng/l (Kontrollgruppe: 223.1 ng/l) und 68.98 ng/l (Kontrollgruppe: 197.7 ng/l) lagen und bis zum 6. – 8. Lebenstag auf 152.4 ng/l (Kontrollgruppe: 159.9 ng/l) angestiegen sind. Dennoch ist es schwer, unsere Ergebnisse in Bezug auf Gehirnzellschädigung bzw. -abbau zu interpretieren.

Viele Studien haben MBP anhand von Sektionsmaterial untersucht (Hasegawa et al., 1992; Wang et al., 2004). Van Engelen et al. (1992), deren Ergebnisse auch unsere Ergebnisse untermauern, verwendeten Liquor zur Bestimmung des MBP. Vergleicht man unsere Methode mit der von Percy et al. (1998), so kann man feststellen, dass diese sich weitestgehend gleichen. Die Arbeitsgruppe verwendete ebenfalls Urin, welcher für maximal 24 Stunden bei +4 °C aufbewahrt wurde und anschließend bei -70 °C bis zur Analyse

eingefroren wurde. Nach Whitaker et al. (1987) auf die in der Studie von Percy et al. (1998) Bezug genommen wird, war MBP unter diesen Bedingungen stabil. Somit ist davon auszugehen, dass auch in unserer Studie MBP durch die Probenbehandlung und -aufbewahrung keinen Schaden genommen hat. Betrachtet man nun die Patientenpopulationen, so muss man feststellen, dass in unserer Studie, im Vergleich zu anderen Studien, nur ein kleines Patientenkollektiv untersucht wurde. Somit ist die Repräsentanz unserer Studie fraglich. Dennoch versprechen unsere Methode und unsere Ergebnisse bezüglich der reifeassoziierten Konzentrationserhöhungen von MBP, dass unsere Ergebnisse den wirklichen Zustand widerspiegeln könnten. Unsere Annahme, dass MBP Gehirnzellschaden aufzeigen könnte, wurde nicht bestätigt. Dies liegt entweder daran, dass kein Gehirnzellschaden stattfindet oder mit unserer Methode nicht messbar ist, unser Patientenkollektiv zu gering ist oder durch reifeassoziierte Konzentrationsänderungen beeinflusst wird. Für uns am wahrscheinlichsten, betrachtet man auch die Ergebnisse der anderen Marker, ist ein Zusammenspiel aus geringem oder keinem nachweisbaren Gehirnzellschaden durch einen hspDA und reifeassoziierten Konzentrationserhöhungen. Betrachtet man den Vergleich zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe, so ist hier am 0. - 1. ( $p = 0,0484$ ) sowie am 2. - 4. Lebenstag ( $p = 0,0378$ ) ein signifikanter Unterschied zu finden. Hier hatten die Kontrollkinder im Gegensatz zu den Interventionskindern höhere Mittelwerte (0. - 1. Lebenstag: 223.1 ng/ml vs. 72.75 ng/l, 2. - 4. Lebenstag: 197.7 ng/ml vs. 58.52 ng/l). Ähnlich wie bei der Gesamtheit der PDA-Kinder haben sich auch die Interventionskinder den Kontrollkindern bis zum 6. - 8. Lebenstag in der MBP-Konzentration angeglichen (159.9 ng/ml vs. 142.4 ng/ml).

Wir konnten in keiner der 3 Zelllinien Astrozyten, Oligodendrozyten und Neurone einen durch unsere Marker zum Ausdruck kommenden Zellschaden feststellen. Es zeigte sich bei S100b und NSE zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied bezüglich der Konzentrationen. MBP zeigt am wahrscheinlichsten einen reifeassoziierten Effekt. Die Untersuchung von S100b erbrachte reifeassoziierte Konzentrationsunterschiede. Die Untersuchung von NSE zeigte in keinem der untersuchten Parameter einen Effekt. Eine signifikante Korrelation zwischen der Konzentration von MBP und dem Gestationsalter ließ sich am 2. - 4. Lebenstag finden.

## 5. Schussfolgerung

Unsere Studie untersuchte erstmals die ZNS-spezifischen Proteine S100b, NSE und MBP im Urin in Hinblick auf einen möglichen Zusammenhang zwischen einer Mangelversorgung des Gehirns und dem hrPDA bei Frühgeborenen unter 1500 g.

Sie zeigt, dass das Therapiekonzept des hrPDA hinsichtlich der Sorge um eine mögliche Mangelversorgung des Gehirns mit Sauerstoff, überdacht werden sollte.

Wir konnten nachweisen, dass ein erhöhter Anfall der untersuchten Proteine sowie generell das Bestehen eines PDA reifeassoziiert sind. Zudem zeigten sich mögliche Parameter zur hämodynamischen Einschätzung des PDA wie die echokardiografisch gemessene *La/Ao-ratio* in unserer Studie als nicht hilfreich bzw. aussagekräftig.

Es konnten keine wegweisenden Parameter zur Einschätzung des PDA gefunden werden.

Es wird weiterhin der subjektiven Einschätzung der Neonatologen überlassen sein, eine Therapieindikation eines PDA zu stellen. Unsere Studie lässt vermuten, dass möglicherweise ein geringer zerebraler Schaden stattfindet. Diese weitgreifende Vermutung könnte Hinweise darauf geben, dass bezüglich der Gehirnentwicklung eine Übertherapie stattfindet bzw. eine zu schnelle Therapieentscheidung getroffen wird. Folgestudien sind notwendig, um diese Frage zu klären.

Insgesamt betrachtet macht unsere Studie deutlich, dass in Bezug auf die ZNS-spezifischen Proteine noch weitere Studien mit größeren Patientenkollektiven folgen müssen. Zudem sollten die Methoden verglichen werden sowie weitere Methoden, die eine nicht-invasive Bestimmung aus dem Urin zulassen, untersucht werden.

## 6. Referenzen

- Alagarsamy, S., Chhabra, M., Gudavalli, M., Nadroo, A.M., Sutija, V.G., Yugrakh, D., **2005**. Comparison of clinical criteria with echocardiographic findings in diagnosing PDA in preterm infants. *J. Perinat. Med.* 33.
- Blennow, M., Sävman, K., Ilves, P., Thoresen, M., Rosengren, L., **2001**. Brain-specific proteins in the cerebrospinal fluid of severely asphyxiated newborn infants. *Acta Paediatr. Oslo Nor.* 1992 90, 1171–1175.
- Boggs, J.M., **2006**. Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cell. Mol. Life Sci.* CMLS 63, 1945–1961.
- Büttner, T., Weyers, S., Postert, T., Sprengelmeyer, R., Kuhn, W., **1997**. S-100 protein: serum marker of focal brain damage after ischemic territorial MCA infarction. *Stroke J. Cereb. Circ.* 28, 1961–1965.
- Cassady, G., Crouse, D.T., Kirklin, J.W., Strange, M.J., Joiner, C.H., Godoy, G., Odrezin, G.T., Cutter, G.R., Kirklin, J.K., Pacifico, A.D., Collins, M.V., Lell, W.A., Satterwhite, C., Phillips, J.B., **1989**. 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.* 320, 1511–1516.
- Çeltik, C., Acunaş, B., Öner, N., Pala, Ö., **2004**. Neuron-specific enolase as a marker of the severity and outcome of hypoxic ischemic encephalopathy. *Brain Dev.* 26, 398–402.
- Chi, J.G., Dooling, E.C., Gilles, F.H., **1977**. Gyral development of the human brain. *Ann. Neurol.* 1, 86–93.
- Chiruvolu, A., Jaleel, M.A., **2009a**. Pathophysiology of patent ductus arteriosus in premature neonates. *Early Hum. Dev.* 85, 143–146.
- Chiruvolu, A., Jaleel, M.A., **2009b**. Therapeutic management of patent ductus arteriosus. *Early Hum. Dev.* 85, 151–155.
- Chiruvolu, A., Punjwani, P., Ramaciotti, C., **2009**. Clinical and echocardiographic diagnosis of patent ductus arteriosus in premature neonates. *Early Hum. Dev.* 85, 147–149.
- Choi, B.M., Lee, K.H., Eun, B.L., Yoo, K.H., Hong, Y.S., Son, C.S., Lee, J.W., **2005**. Utility of Rapid B-Type Natriuretic Peptide Assay for Diagnosis of Symptomatic Patent Ductus Arteriosus in Preterm Infants. *Pediatrics* 115, e255–e261.
- Clyman, R.I., Chorne, N., **2007**. Patent Ductus Arteriosus: Evidence For and Against Treatment. *J. Pediatr.* 150, 216–219.
- Coalson, J.J., Winter, V.T., Siler-Khodr, T., Yoder, B.A., **1999**. Neonatal Chronic Lung Disease in Extremely Immature Baboons. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160, 1333–1346.
- Coceani, F., Olley, P.M., 1973. The response of the ductus arteriosus to prostaglandins. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 51, 220–225.
- Cochran, A.J., Lu, H.F., Li, P.X., Saxton, R., Wen, D.R., 1993. S-100 protein remains a practical marker for melanocytic and other tumours. *Melanoma Res.* 3, 325–330.
- Cunningham, R.T., Watt, M., Winder, J., McKinstry, S., Lawson, J.T., Johnston, C.F., Hawkins, S.A., Buchanan, K.D., **1996**. Serum neurone-specific enolase as an indicator of stroke volume. *Eur. J. Clin. Invest.* 26, 298–303.
- Dahl, M., Kamper, J., **2006**. Physical outcome and school performance of very-low-birthweight infants treated with minimal handling and early nasal CPAP. *Acta Paediatr. Oslo Nor.* 1992 95, 1099–1103.
- Davis P, Turner-Gomes S, Cunningham K, Way C, Roberts R, Schmidt B, **1995**. PRrecision and accuracy of clinical and radiological signs in premature infants at risk of patent ductus arteriosus. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 149, 1136–1141.
- Donato, R., **2001**. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 637–668.

- Donato, R., Cannon, B.R., Sorci, G., Riuzzi, F., Hsu, K., Weber, D.J., Geczy, C.L., **2013**. Functions of S100 proteins. *Curr. Mol. Med.* 13, 24–57.
- Ebert, W., Hoppe, M., Muley, T., Drings, P., **1997**. Monitoring of therapy in inoperable lung cancer patients by measurement of CYFRA 21-1, TPA- TP CEA, and NSE. *Anticancer Res.* 17, 2875–2878.
- El Hajjar, M., Vaksmann, G., Rakza, T., Kongolo, G., Storme, L., **2005**. Severity of the ductal shunt: a comparison of different markers. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 90, F419–F422.
- El-Khuffash, A., Barry, D., Walsh, K., Davis, P.G., Molloy, E.J., **2008**. Biochemical markers may identify preterm infants with a patent ductus arteriosus at high risk of death or severe intraventricular haemorrhage. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 93, F407–412.
- Evans, N., **1993**. Diagnosis of patent ductus arteriosus in the preterm newborn. *Arch. Dis. Child.* 68, 58–61.
- Evans, N., Kluckow, M., **1996**. Early ductal shunting and intraventricular haemorrhage in ventilated preterm infants. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 75, F183–F186.
- Ezgü, F.S., Atalay, Y., Gücüyener, K., Tunç, S., Koç, E., Ergenekon, E., Tıraş, Ü., **2002**. Neuron-Specific Enolase Levels and Neuroimaging in Asphyxiated Term Newborns. *J. Child Neurol.* 17, 824–829.
- Fan, L.L., Campbell, D.N., Clarke, D.R., Washington, R.L., Fix, E.J., White, C.W., **1989**. Paralyzed left vocal cord associated with ligation of patent ductus arteriosus. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 98, 611–613.
- Farombi-Oghuvbu, I., Matthews, T., Mayne, P.D., Guerin, H., Corcoran, J.D., **2008**. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide: a measure of significant patent ductus arteriosus. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 93, F257–260.
- Firth, J., Pickering, D., **1980**. Timing of Indometacin therapy in persistent ductus. *Lancet Lond. Engl.* 2, 144.
- Fowlie, P.W., Davis, P.G., **1996**. Prophylactic intravenous Indometacin for preventing mortality and morbidity in preterm infants, in: *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Friedman, W.F., Hirschklau, M.J., Printz, M.P., Pitlick, P.T., Kirkpatrick, S.E., **1976**. Pharmacologic Closure of Patent Ductus Arteriosus in the Premature Infant. *N. Engl. J. Med.* 295, 526–529.
- Garcia-Alix, A., Cabañas, F., Pellicer, A., Stinis, T.A., Quero, J., Hernanz, A., **1994**. Neuron-Specific Enolase and Myelin Basic Protein: Relationship of Cerebrospinal Fluid Concentrations to the Neurologic Condition of Asphyxiated Full-Term Infants. *Pediatrics* 93, 234–240.
- Gazzolo, D., Vinesi, P., Bartocci, M., Geloso, M.C., Bonacci, W., Serra, G., Haglid, K.G., Michetti, F., **1999**. Elevated S100 blood level as an early indicator of intraventricular hemorrhage in preterm infants: Correlation with cerebral Doppler velocimetry. *J. Neurol. Sci.* 170, 32–35.
- Giuseppe, D., Sergio, C., Pasqua, B., Giovanni, L.V., Salvatore, C., Frigiola, A., Petra, H., Maurizio, A., **2009**. Perinatal Asphyxia in Preterm Neonates Leads to Serum Changes in Protein S-100 and Neuron Specific Enolase. *Curr. Neurovasc. Res.* 6, 110–116.
- Gotoh, Y., Hashimoto, K., Tada, K., **1986**. Urine neuron-specific enolase and its clinical implication in patients with neuroblastoma. *Tohoku J. Exp. Med.* 149, 67–72.
- Haimoto, H., Takahashi, Y., Koshikawa, T., Nagura, H., Kato, K., **1985**. Immunohistochemical localization of gamma-enolase in normal human tissues other than nervous and neuroendocrine tissues. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 52, 257–263.
- Hamrick, S.E.G., Hansmann, G., **2010**. Patent Ductus Arteriosus of the Preterm Infant. *Pediatrics* 125, 1020–1030.
- Hårdemark, H.-G., Ericsson, N., Kotwica, Z., Rundström, G., Mendel-Hartvig, I., Olsson, Y., Pählman, S., Persson, L., **1989**. S-100 protein and neuron-specific enolase in

- CSF after experimental traumatic or focal ischemic brain damage. *J. Neurosurg.* 71, 727–731.
- Hasegawa, M., Houdou, S., Mito, T., Takashima, S., Asanuma, K., Ohno, T., **1992**. Development of myelination in the human fetal and infant cerebrum: A myelin basic protein immunohistochemical study. *Brain Dev.* 14, 1–6.
- Heizmann, C.W., Fritz, G., Schäfer, B.W., **2002**. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 7, d1356–1368.
- Herrman, K., Bose, C., Lewis, K., Laughon, M., **2009**. 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.* 94, F48–50.
- Heymann, M.A., Rudolph, A.M., **1975**. Control of the ductus arteriosus. *Physiol. Rev.* 55, 62–78.
- Heymann, M.A., Rudolph, A.M., Silverman, N.H., **1976**. Closure of the Ductus Arteriosus in Premature Infants by Inhibition of Prostaglandin Synthesis. *N. Engl. J. Med.* 295, 530–533.
- Isobe, T., Okuyama, T., **1978**. The Amino-Acid Sequence of S-100 Protein (PAP I-b Protein) and Its Relation to the Calcium-Binding Proteins. *Eur. J. Biochem.* 89, 379–388.
- Iyer, P., Evans, N., **1994**. Re-evaluation of the left atrial to aortic root ratio as a marker of patent ductus arteriosus. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 70, F112–F117.
- Jacobi, C., Reiber, H., **1988**. Clinical relevance of increased neuron-specific enolase concentration in cerebrospinal fluid. *Clin. Chim. Acta* 177, 49–54.
- Jacobsen, T., Grønvall, J., Petersen, S., Andersen, G.E., **1993**. “Minitouch” treatment of very low-birth-weight infants. *Acta Paediatr. Oslo Nor.* 1992 82, 934–938.
- Johnsson, P., Lundqvist, C., Lindgren, A., Ferencz, I., Alling, C., Ståhl, E., **1995**. Cerebral complications after cardiac surgery assessed by S-100 and NSE levels in blood. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 9, 694–699.
- Jones, L.J., Craven, P.D., Attia, J., Thakkinstian, A., Wright, I., **2011**. Network meta-analysis of Indometacin versus ibuprofen versus placebo for PDA in preterm infants. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 96, F45–52.
- Kamholz, J., de Ferra, F., Puckett, C., Lazzarini, R., **1986**. Identification of three forms of human myelin basic protein by cDNA cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 4962–4966.
- Kepa, L., **2009**. Evaluation of cerebrospinal fluid and plasma neuron-specific enolase (NSE) concentration in patients with purulent, bacterial meningoencephalitis. *Przegląd Epidemiol.* 63, 23–28.
- Kleine, T.O., Benes, L., Zöfel, P., **2003**. Studies of the brain specificity of S100B and neuron-specific enolase (NSE) in blood serum of acute care patients. *Brain Res. Bull.* 61, 265–279.
- Kluckow, M., Evans, N., **1995**. Early echocardiographic prediction of symptomatic patent ductus arteriosus in preterm infants undergoing mechanical ventilation. *J. Pediatr.* 127, 774–779.
- Koch, J., Hensley, G., Roy, L., Brown, S., Ramaciotti, C., Rosenfeld, C.R., **2006**. Prevalence of Spontaneous Closure of the Ductus Arteriosus in Neonates at a Birth Weight of 1000 Grams or Less. *Pediatrics* 117, 1113–1121.
- Kuroiwa, T., Tanabe, H., Arai, M., Ohta, T., **1994**. Measurement of serum neuron-specific enolase levels after subarachnoid hemorrhage and intracerebral hemorrhage. *No Shinkei Geka.* 22, 531–535.
- Lamerz R., **1988**. *Clinical Laboratory Diagnosis*, 5th ed. TH Books, Frankfurt.
- Leal, S.D., Cavallé-Garrido, T., Ryan, G., Farine, D., Heilbut, M., Smallhorn, J.F., **1997**. Isolated ductal closure in utero diagnosed by fetal echocardiography. *Am. J. Perinatol.* 14, 205–210.
- Leite, M.C., Galland, F., Brolese, G., Guerra, M.C., Bortolotto, J.W., Freitas, R., Almeida, L.M.V. de, Gottfried, C., Gonçalves, C.-A., **2008**. A simple, sensitive and widely

- applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J. Neurosci. Methods* 169, 93–99.
- Leonhardt, A., Glaser, A., Wegmann, M., Schranz, D., Seyberth, H., Nusing, R., **2003**. Expression of prostanoid receptors in human ductus arteriosus. *Br. J. Pharmacol.* 138, 655–659.
- Marshall, D.D., Kotelchuck, M., Young, T.E., Bose, C.L., Kruyer, L., O'Shea, T.M., **1999**. Risk factors for chronic lung disease in the surfactant era: a North Carolina population-based study of very low birth weight infants. *North Carolina Neonatologists Association. Pediatrics* 104, 1345–1350.
- McALEESE, S.M., Dunbar, B., Fothergill, J.E., Hinks, L.J., Day, I.N.M., **1988**. Complete amino acid sequence of the neurone-specific  $\gamma$  isozyme of enolase (NSE) from human brain and comparison with the non-neuronal  $\alpha$  form (NNE). *Eur. J. Biochem.* 178, 413–417.
- Michelakis, E., Rebeyka, I., Bateson, J., Olley, P., Puttagunta, L., Archer, S., **2000**. Voltage-gated potassium channels in human ductus arteriosus. *The Lancet* 356, 134–137.
- Missler, U., Wiesmann, M., Friedrich, C., Kaps, M., **1997**. S-100 Protein and Neuron-Specific Enolase Concentrations in Blood as Indicators of Infarction Volume and Prognosis in Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 28, 1956–1960.
- Mokuno, K., Kato, K., Kawai, K., Matsuoka, Y., Yanagi, T., Sobue, I., **1983**. Neuron-specific enolase and S-100 protein levels in cerebrospinal fluid of patients with various neurological diseases. *J. Neurol. Sci.* 60, 443–451.
- Moore, B.W., **1965**. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19, 739–744.
- Mosalli, R., Alfaleh, K., **2008**. Prophylactic surgical ligation of patent ductus arteriosus for prevention of mortality and morbidity in extremely low birth weight infants. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD006181. d
- Moscarello, M.A., **1997**. Myelin Basic Protein, the “Executive” Molecule of the Myelin Membrane, in: Juurlink, B.H.J., Devon, R.M., Doucette, J.R., Nazarali, A.J., Schreyer, D.J., Verge, V.M.K. (Eds.), *Cell Biology and Pathology of Myelin*. Springer US, pp. 13–25.
- Noori, S., McCoy, M., Friedlich, P., Bright, B., Gottipati, V., Seri, I., Sekar, K., **2009**. Failure of Ductus Arteriosus Closure Is Associated With Increased Mortality in Preterm Infants. *Pediatrics* 123, e138–e144.
- Ohlsson, A., Walia, R., Shah, S., **2005**. Ibuprofen for the treatment of patent ductus arteriosus in preterm and/or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst. Rev. Online* CD003481.
- Percy, A.K., Lane, J.B., Goodwin, J., Kachelhofer, R.D., Whitaker, J.N., **1998**. Age-related changes in the level of urinary myelin basic protein-like material during childhood. *Neurology* 51, 1339–1341.
- Perlman, J.M., Hill, A., Volpe, J.J., **1981**. The effect of patent ductus arteriosus on flow velocity in the anterior cerebral arteries: Ductal steal in the premature newborn infant. *J. Pediatr.* 99, 767–771.
- Persson, L., Hårdemark, H.G., Gustafsson, J., Rundström, G., Mendel-Hartvig, I., Esscher, T., Pålman, S., **1987**. S-100 protein and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and serum: markers of cell damage in human central nervous system. *Stroke* 18, 911–918.
- Raabe, A., Grolms, C., Sorge, O., Zimmermann, M., Seifert, V., **1999**. Serum S-100B protein in severe head injury. *Neurosurgery* 45, 477–483.
- Ramaswamy, V., Horton, J., Vandermeer, B., Buscemi, N., Miller, S., Yager, J., **2009**. Systematic Review of Biomarkers of Brain Injury in Term Neonatal Encephalopathy. *Pediatr. Neurol.* 40, 215–226.
- Roka, A., Kelen, D., Halasz, J., Beko, G., Azzopardi, D., Szabo, M., **2012**. Serum S100B and neuron-specific enolase levels in normothermic and hypothermic infants after perinatal asphyxia. *Acta Paediatr. Oslo Nor.* 1992 101, 319–323.

- Ruetzler, K., Bühner, C., Grimmer, I., Müller, C., Nagdyman, N., Obladen, M., **2006**. Urinary S-100B concentrations in term and preterm infants at risk for brain damage. *Biol. Neonate* 89, 260–264.
- Sanjeev, S., Pettersen, M., Lua, J., Thomas, R., Shankaran, S., L'Ecuyer, T., **2005**. Role of plasma B-type natriuretic peptide in screening for hemodynamically significant patent ductus arteriosus in preterm neonates. *J. Perinatol. Off. J. Calif. Perinat. Assoc.* 709–713.
- Sannia, A., Risso, F.M., Serpero, L.D., Frulio, R., Michetti, F., Abella, R., Frigiola, A., Giamberti, A., Gazzolo, D., **2010**. Antenatal glucocorticoid treatment affects preterm infants' S100B urine concentration in a dose-dependent manner. *Clin. Chim. Acta* 411, 1539–1541.
- Schäfer, B.W., Heizmann, C.W., **1996**. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem. Sci.* 21, 134–140.
- Schneider, D.J., Moore, J.W., **2006**. Patent Ductus Arteriosus. *Circulation* 114, 1873–1882.
- Siegal, T., Ovadia, H., Yatsiv, I., Abramsky, O., **1987**. CSF myelin basic protein levels in leptomeningeal metastases: Relationship to disease activity. *J. Neurol. Sci.* 78, 165–173.
- Sindic, C.J., Chalon, M.P., Cambiaso, C.L., Laterre, E.C., Masson, P.L., **1982**. Assessment of damage to the central nervous system by determination of S-100 protein in the cerebrospinal fluid. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 45, 1130–1135.
- Skelton, R., Evans, N., Smythe, J., **1994**. A blinded comparison of clinical and echocardiographic evaluation of the preterm infant for patent ductus arteriosus. *J. Paediatr. Child Health* 30, 406–411.
- Song, T.-J., Choi, Y.-C., Lee, K.-Y., Kim, W.-J., **2012**. Serum and cerebrospinal fluid neuron-specific enolase for diagnosis of tuberculous meningitis. *Yonsei Med. J.* 53, 1068–1072.
- Stempniewicz, K., Walas, W., **2007**. Chylothorax--a rare complication of surgical ligation of patent ductus arteriosus in a premature infant-a case report. *Med. Wiek Rozwoj.* 11, 269–273.
- Sternberger, N.H., Itoyama, Y., Kies, M.W., Webster, H.D., **1978**. Myelin basic protein demonstrated immunocytochemically in oligodendroglia prior to myelin sheath formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 2521–2524.
- Tapia, F.J., Barbosa, A.J.A., Marangos, P.J., Polak, J.M., Bloom, S.R., Dermody, C., Pearse, A.G.E., **1981**. NEURON-SPECIFIC ENOLASE IS PRODUCED BY NEUROENDOCRINE TUMOURS. *The Lancet*, Originally published as Volume 1, Issue 8224 317, 808–811.
- Terry, R.D., Gonatas, N.K., Weiss, M., **1964**. Ultrastructural Studies in Alzheimer's Presenile Dementia. *Am. J. Pathol.* 44, 269–297.
- Tosse, V., Pillekamp, F., Verde, P., Hadzik, B., Sabir, H., Mayatepek, E., Hoehn, T., **2012**. Urinary NT-proBNP, NGAL, and H-FABP may predict hemodynamic relevance of patent ductus arteriosus in very low birth weight infants. *Neonatology* 101, 260–266.
- Van Engelen, B.G., Lamers, K.J., Gabreels, F.J., Wevers, R.A., van Geel, W.J., Borm, G.F., **1992**. Age-related changes of neuron-specific enolase, S-100 protein, and myelin basic protein concentrations in cerebrospinal fluid. *Clin. Chem.* 38, 813–816.
- Van Overmeire, B., Smets, K., Lecoutere, D., Van de Broek, H., Weyler, J., Degroote, K., Langhendries, J.P., **2000**. A comparison of ibuprofen and Indometacin for closure of patent ductus arteriosus. *N. Engl. J. Med.* 343, 674–681.
- Vida, V.L., Lago, P., Salvatori, S., Boccuzzo, G., Padalino, M.A., Milanesi, O., Speggiorin, S., Stellin, G., **2009**. Is there an optimal timing for surgical ligation of patent ductus arteriosus in preterm infants? *Ann. Thorac. Surg.* 87, 1509–1515; discussion 1515–1516.

- Wang, D.-S., Bennett, D.A., Mufson, E.J., Mattila, P., Cochran, E., Dickson, D.W., **2004**. Contribution of changes in ubiquitin and myelin basic protein to age-related cognitive decline. *Neurosci. Res.* 48, 93–100.
- Weiss, H., Cooper, B., Brook, M., Schlueter, M., Clyman, R., **1995**. Factors determining reopening of the ductus arteriosus after successful clinical closure with Indometacin. *J. Pediatr.* 127, 466–471.
- Wesley Vick III, G., Huhta, J.C., Gutgesell, H.P., **1985**. Assessment of the ductus arteriosus in preterm infants utilizing suprasternal two-dimensional/doppler echocardiography. *J. Am. Coll. Cardiol.* 5, 973–977.
- Whitaker, J.N., Kachelhofer, R.D., Bradley, E.L., Burgard, S., Layton, B.A., Reder, A.T., Morrison, W., Zhao, G.J., Paty, D.W., **1995**. Urinary myelin basic protein—like material as a correlate of the progression of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 38, 625–632.
- Whitelaw, A., Rosengren, L., Blennow, M., **2001**. Brain specific proteins in posthaemorrhagic ventricular dilatation. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 84, F90–F91.
- WHO, March of Dimes, PMNCH, Save the Children, WHO, Geneva, **2012**. *Born too Soon: The Global Action Report on Preterm Birth*. Eds CP Howson, MV Kinney, JE Lawn. World Health Organization
- Woertgen, C., Rothoerl, R.D., Holzschuh, M., Metz, C., Brawanski, A., **1997**. Comparison of serial S-100 and NSE serum measurements after severe head injury. *Acta Neurochir. (Wien)* 139, 1161–1164; discussion 1165.
- Zimmer, D.B., Cornwall, E.H., Landar, A., Song, W., **1995**. The S100 protein family: History, function, and expression. *Brain Res. Bull.* 37, 417–429.

## **Danksagung**

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Thomas Höhn für die gute Betreuung, Motivation und Hilfestellung bei Fragen während der Erstellung meiner Dissertation danken. Besonderer Dank geht an Frau Annette Seibt für die Unterstützung im Labor sowie an das Pflorgeteam der Stationen K6 und K5 der Kinderklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf für die Hilfe bei der Urinsammlung. Für die konstruktive Kritik meiner statistischen Auswertung möchte ich Herrn PD Dr. rer. nat. Pablo Verde danken. Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Frank Pillekamp für die Durchführung und Auswertung der Echokardiografien. Zudem bin ich den Eltern unserer Probanden für das Einverständnis in die Studienteilnahme zu großem Dank verpflichtet.

Abschließend gilt mein Dank meiner ehemaligen Mitbewohnerin Janina, die während des Studiums und der Dissertation stets ein offenes Ohr für mich hatte sowie meinen Eltern und meinem Freund Timo für ihre Unterstützung während der Erstellung meiner Dissertation.