

Einfluss definierter Genpolymorphismen des Vitamin K Stoffwechsels
auf die Inzidenz von intraventrikulären Hirnblutungen bei
Frühgeborenen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Séverine Fabienne Suter
aus Baden/Schweiz
2012

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Axel Heep
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Johannes Oldenburg

Tag der Mündlichen Prüfung: 13.6.2012

Aus der Abteilung Neonatologie, Zentrum für Kinderheilkunde
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. P. Bartmann

Diese Arbeit ist meinen Eltern und meinem Bruder gewidmet, die mir in meinem bisherigen Leben immer zur Seite standen und mich in jeder Situation liebevoll unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1.0 Einleitung	9
<i>1.1 Ziele dieser Arbeit</i>	<i>9</i>
<i>1.2 Plasmatische Gerinnung</i>	<i>10</i>
1.2.1 Faktor VII Promotor Polymorphismus	12
<i>1.3 Vitamin K</i>	<i>13</i>
<i>1.4 Vitamin K Stoffwechsel</i>	<i>15</i>
1.4.1 VKCDF	18
<i>1.5 Hirnblutungen bei Frühgeborenen</i>	<i>19</i>
2.0 Material und Methoden	22
<i>2.1 Patienten / Material</i>	<i>22</i>
2.1.1 Patienten und Probenherkunft	22
2.1.2 Referenzgruppe	23
2.1.3 Einschlusskriterien	23
2.1.4 Probenmaterial	23
2.1.5 Klinische Daten	24
2.1.6 Laborparameter	26
<i>2.2 Methoden</i>	<i>26</i>
2.2.1 Chemikalien	27
2.2.2 Geräte und Materialien	28
2.2.3 DNA-Isolierung	28
2.2.4 DNA Amplifizierung mittels PCR	29
2.2.5 Elektrophorese	32
2.2.6 Vorbereitung des Sequenzieransatz	33
2.2.7 Sequenzierreaktion	33
2.2.8 Ethanol – Acetat - Fällung	34
2.2.9 Sequenzierung	34

2.3 Statistik	35
2.3.1 Statistische Grundlagen	36
2.4 Ethik	37
3. Ergebnisse	37
3.1 Studienkollektiv	37
3.2 Studienkollektiv versus Referenzgruppe	39
3.2.1 Vergleich der Genotypenverteilung im Studienkollektiv und Referenzgruppe	39
3.2.2 Vergleich der Studienuntergruppe Nicht-IVH mit der Referenzgruppe	41
3.2.3 Allelverteilung Nicht-IVH Gruppe versus Referenzgruppe	43
3.2.4 Berechnung der erwarteten Genotypenverteilung aus Abschnitt 3.4 mittels Hardy-Weinberg Gesetz	45
3.3 IVH Gruppe versus Nicht-IVH Gruppe	48
3.3.1 Vergleich der Genotypenverteilung in der Nicht IVH-Gruppe und der IVH-Gruppe (I-IV°)	48
3.3.2 Vergleich der Allelverteilung im Studienkollektiv mit einer IVH (I-IV°) und der Referenzgruppe	50
3.3.3 Berechnung der erwarteten Genotypenverteilungen in der IVH Studiengruppe (I-IV°) und Vergleich dieser Erwartungswerte mit den ermittelten Werten	51
3.4.1 Gegenüberstellung der Genotypenverteilung in der Studienuntergruppe mit einer schweren IVH (III-IV°) und der Nicht-IVH Gruppe	53
3.4.2 Gegenüberstellung der Allelverteilung der Gruppe mit einer schweren IVH (III-IV°) und der Nicht IVH-Gruppe	56
3.4.3 Berechnung der erwarteten Genotypenverteilungen in der Gruppe mit einer schweren IVH (III-IV°) und Vergleich dieser Erwartungswerte mit den ermittelten Werten	59
3.5 Untersuchung der klinischen und laborchemischen Parameter	62
3.5.1 Klinische Daten	62
3.5.2 Laborchemische Parameter	65
3.5.3 Logistische Regressionsanalyse der mit der IVH assoziierten klinischen und laborchemischen Parameter	70

4. Diskussion	70
<i>4.1. Polymorphismen im GGCX, VKORC1, Faktor VII, CYP4F2 und ApoE Gen und Hirnblutungen bei Frühgeborenen</i>	<i>70</i>
4.1.1 Faktor VII Promotor	70
4.1.2 GGCX	71
4.1.3 VKORC1, CYP4F2 und ApoE	71
<i>4.2. Untersuchung der klinischen und laborchemischen Parameter</i>	<i>72</i>
4.2.1 Klinische Daten	72
<i>4.3 Laborchemische Parameter</i>	<i>75</i>
4.3.1 Konzentration der Vitamin K-abhängigen Faktoren in Bezug auf Genotypen	75
4.3.2 Konzentration der Gerinnungsfaktoren in Bezug auf das Gestationsalter	75
4.3.3. Laborchemische Parameter: IVH Gruppe versus Nicht-IVH Gruppe	75
<i>4.4 Logistische Regressionsanalyse der mit der IVH assoziierten klinischen und laborchemischen Parameter</i>	<i>78</i>
5. Zusammenfassung	79
Literaturverzeichnis	81
Danksagung	92

Abkürzungsverzeichnis

ApoE	Apolipoprotein E
CRP	C-reaktives Protein
ddNTP	Didesoxyribose Nucleotidphosphat
dNTP	Desoxyribose Nucleotidphosphat
FFP	Fresh Frozen Plasma
FVII	Faktor VII
GGCX	Gamma Carboxylase
Hb	Hämoglobin
IL-6	Interleukin-6
IVH	Intraventrikuläre Hirnblutung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDA	Persistierender Ductus Arteriosus Botalli
Rs Nummer	Reference SNP
SNP	Single nucleotide polymorphism (Einzelnukleotid Polymorphsimus)
SSW	Schwangerschaftswoche
TF	Tissue Factor
VKDB	Vitamin K deficiency bleeding
VKORC1	Vitamin K Epoxid Reduktase

1.0 Einleitung

Molekulargenetische Untersuchungen beschreiben einen Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus im Gerinnungsfaktor VII Promotor und dem Auftreten, respektive dem Ausmaß von zerebralen Blutungsereignissen (Corral et al., 2001). Des Weiteren ist bekannt, dass Compound heterozygote Träger der VKCDF Genmutation (vitamin k-dependent clotting factor deficiency) bereits im Neugeborenenalter zu Nabel- und mukokutanen Blutungen, sowie Hirnblutungen neigen (Weston und Monahan, 2008). Früh- und Neugeborene weisen im Vergleich zu Erwachsenen ein vom Gestationsalter abhängig erniedrigtes Gerinnungspotential auf (Monagle und Hagstrom, 2003). Ob eine genetische Prädisposition durch funktionell relevante Genpolymorphismen in Kandidatengen der Vitamin K abhängigen Hämostase in der Pathophysiologie der IVH bei extrem Frühgeborenen eine Bedeutung haben ist bisher nicht untersucht worden.

1.1 Ziele dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird geprüft, ob Polymorphismen in den Genen der *VKORC1*, der *GGCX*, des *Faktor VII Promotor*, des *CYP4F2* und/oder im *ApoE*-Gen eine funktionelle Relevanz auf die Inzidenz einer IVH haben. Hierbei soll untersucht werden, ob unabhängig von anderen untersuchten klinischen Parametern die Allel- / Genotypenverteilung der untersuchten Polymorphismen mit Inzidenz und/oder Ausmaß einer Hirnblutung bei Frühgeborenen <32 SSW assoziiert sind.

Gen	Rs-Nr.	
VKORC1	rs9923231	VKORC1: c.-1639 G>A
Gamma-Carboxylase	rs699664	GGCX: c.974 G>A
Faktor VII Promotor	rs36208070	F VII: c.-323_-322ins10
ApoE	rs7412 rs429358	
CYP4F2	rs2108622	

Tabelle 1: Übersicht über die untersuchten Polymorphismen mit Angabe der Referenz-Nr.

1.2 Plasmatische Gerinnung

Bereits ab der 5.-10. Gestationswoche kann in der fetalen Leber die RNA Expression zur Synthese verschiedener Gerinnungsproteine nachgewiesen werden, wobei die RNA Transkriptionsgröße identisch mit der Größe der mRNA Erwachsener ist (Hunault et al., 1997). Die Gerinnungsproteine werden dabei ausschließlich vom Fetus selber gebildet, da die Plazenta eine Barriere für die Gerinnungsproteine darstellt, sodass die Gerinnungsfaktoren nicht transplazentar von der Mutter auf das Kind übertragen werden können (Hassan et al., 1990; Manco-Johnson, 2004). Bei Neugeborenen und besonders bei Frühgeborenen ist der Vitamin K Gehalt des Blutes aufgrund des verminderten Transports des Vitamins über die Plazenta physiologisch vermindert. Dadurch ist das Gerinnungspotential allgemein vermindert, insbesondere jedoch die Konzentration der Vitamin K-abhängigen Faktoren. Die Konzentration der Gerinnungsfaktoren steigt mit zunehmendem Alter des Feten (Hassan et al., 1990; Manco-Johnson, 2004). Das Hämostasepotential eines Frühgeborenen beträgt ca. 20-30 % der adulten Werte (Wallin und Hutson, 2004). Das herabgesetzte Gerinnungspotential bei Frühgeborenen beruht auf einer variabel verminderten Expression der Gerinnungsfaktoren. Insbesondere die Vitamin K-abhängigen Faktoren unterliegen einer deutlich geringeren Expression verglichen mit Erwachsenen (Hunault et al., 1997). Der durchschnittliche Serumgehalt der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren in Abhängigkeit vom Alter kann aus folgender Tabelle entnommen werden (Monagle und Hagstrom, 2004):

Parameter	19-23 * (n = 20)	24-29* (n = 22)	30-38* (n = 22)	Neugeborene (n = 60)	Erwachsene (n = 40)
II	16.9 (10-24)	19.9 (11-30) ◆	27.9 (15-50) ▲	43.5 (27-64) ▲	98.7 (70-125)
VII	27.4 (17-37)	33.8 (18-48) ◆	45.9 (31-62)	52.5 (28-78) ▲	101.3 (68-130)
IX	10.1 (6-14)	9.9 (5-15)	12.3 (5-24) ▲	31.8 (15-50) ▲	104.8 (70-142)
X	20.5 (14-29)	24.9 (16-35)	28.0 (16-36)	39.6 (21-65) ▲	99.2 (75-125)
*Gestationswochen; n = Zahl der untersuchten Blutproben (Arithmetischer Mittelwert, 10.-95. Perzentile) ◆= p<0.05 ▲= p<0.01					

Tabelle 2: Durchschnittlicher Gehalt der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X in Abhängigkeit des Gestationsalters

Erst ab ungefähr dem 6. Lebensmonat erreicht der Serumgehalt aller Gerinnungsproteine Erwachsenenwerte (Andrew et al., 1990).

Die Gerinnungsfaktoren zirkulieren im Körper als inaktive Vorstufen. Sie sind Bestandteil einer Kaskade, die erst über die Aktivierung von mehreren Zwischenstufen zur Gerinnung des Blutes führt. Dabei kann das aktive Produkt des einen Gerinnungsfaktors, die inaktive Form eines bestimmten anderen Faktors, durch limitierte Proteolyse in die aktive Form überführen.

Die Gerinnungskaskade kann auf zwei Wegen aktiviert werden:

a) Endogener Weg: Kontaktaktivierung des Faktors XII durch Kontakt mit fremden Oberflächen und im Zusammenspiel mit hochmolekularem Kininogen, Präkallikrein und Kallikrein. Faktor XII aktiviert den Faktor XI und dieser den Faktor IX. Dieser bildet mit aktiviertem Faktor VIII, Phospholipiden aus der Membran aktivierter Thrombozyten und Ca^{2+} einen Komplex, der den Faktor X aktiviert. Dann ist der gemeinsame Weg der Blutgerinnung erreicht.

b) Exogener Weg: Faktor III, besser bekannt als Tissue factor (TF), aktiviert den Faktor VII. TF ist der einzige Gerinnungsfaktor, der ein integrales Membranprotein ist und nur in sehr niedrigen Konzentrationen im Blut zirkuliert. Der aktivierte Faktor VII bildet mit TF, Präkallikrein und Ca^{2+} einen Faktor-X-Aktivator-Komplex und aktiviert Faktor X. Somit ist der gemeinsame Endweg der Blutgerinnung erreicht (Colman et al., 2006; Greisen und Andreasen, 2003).

Gemeinsamer Endweg: Der aktivierte Faktor X bildet einen Komplex mit Ca^{2+} auf Phospholipidoberflächen. Die Aktivität des Komplexes wird durch die Anlagerung des aktivierten Faktors V stark erhöht. Dieser Komplex wird als Prothrombinaktivator bezeichnet. Dieser Komplex aktiviert Faktor II (Prothrombin) zu Thrombin. Thrombin aktiviert die Faktoren XI, VIII und V. Gleichzeitig fördert es seine eigene Bildung aus Prothrombin (Colman et al., 2006; Greisen und Andreasen, 2003).

Die Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X werden nur nach vorangehender Gewebeschädigung Vitamin K-abhängig aktiviert.

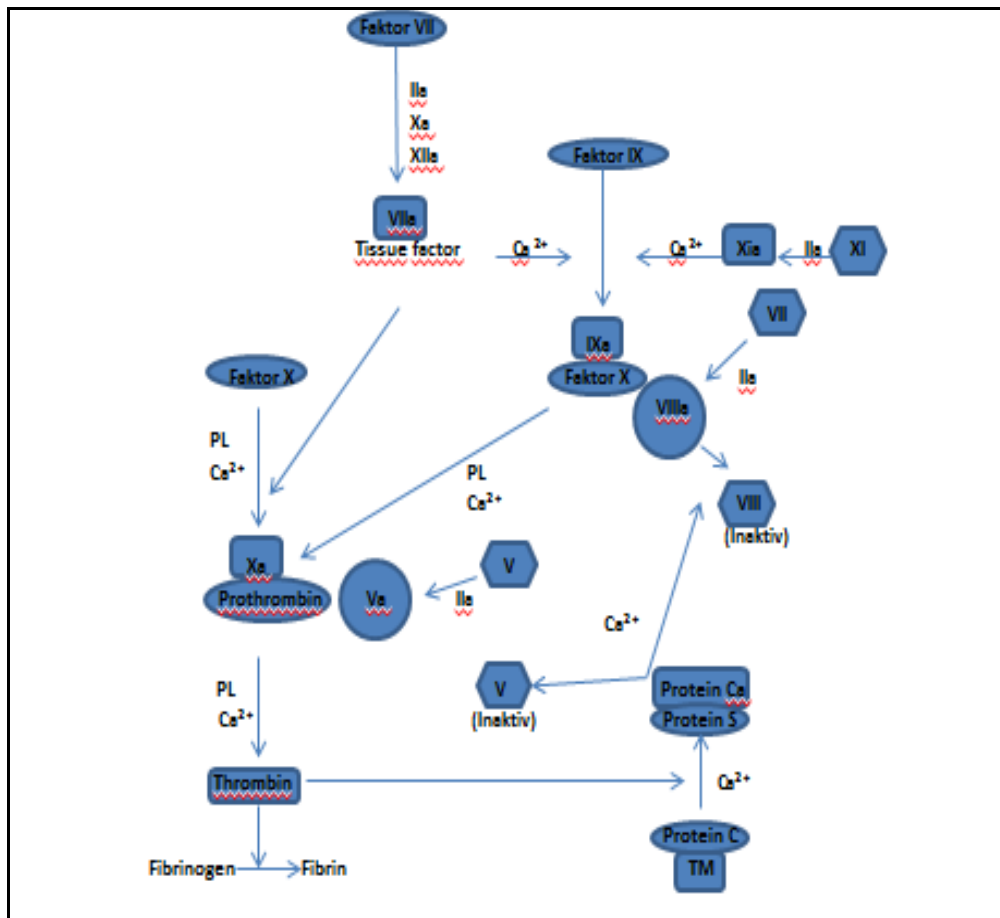


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Gerinnungskaskade

1.2.1 Faktor VII Promotor Polymorphismus

Das Gen des Faktor VII besteht aus näherungsweise 13 Kilobytes, bestehend aus 406 Aminosäureresten. Es enthält 8 Exone und ist auf dem Chromosom 13q34 lokalisiert. Die volle Länge der mRNA beträgt 2.5 kb, wobei die cDNA Sequenz nur 1,335 Nukleotide lang ist (Bergmann und Rastetter, 1993; Greisen und Andreasen 2003; Lichtmann et al., 2006).

Eine Dekanukleotid Insertion an der Position 323 der Promoter Region (5'-flanking Region) geht mit einer ca. 20 % geringeren Aktivität des Gerinnungsfaktors einher (Heep et al., 2007). Es handelt sich dabei um den SNP rs36208070 (F7: c.323_-322ins10) (Watzka et al., 2009).

Aktuelle Studien konnten zeigen, dass Säuglinge mit einem Lebensalter von einem Monat mit der Insertion in der Promotorregion, deutlich geringere Konzentrationen an Faktor VII aufweisen als Kinder gleichen Alters ohne die Insertion (Koichi et al., 2007). Bei Erwachsenen konnte nachgewiesen werden, dass Träger der Promotorinsertion signifikant niedrigere Faktor VII

Konzentrationen und ein 1.5fach erhöhtes Risiko für intraventrikuläre Blutungen haben (Corral et al., 2001).

Ob der Polymorphismus im Faktor VII Promotor einen Einfluss auf die Gerinnungsaktivität bei Frühgeborenen hat ist bisher noch nicht untersucht worden.

1.3 Vitamin K

Vitamin K und dessen Bedeutung für die Gerinnung wurde 1937 von dem Dänen Henrik Dam entdeckt (Dam, 1937).

Unter Vitamin K wird eine Reihe strukturell ähnlicher, fettlöslicher Verbindungen mit einer 2-methyl-1,4-naphtochinon Gruppe zusammengefasst. Zu diesen Substanzen zählen unter anderem Phyllochinon (Vitamin K1) und Menachinon (Vitamin K2). Menadion (Vitamin K3) ist im Gegensatz dazu wasserlöslich.

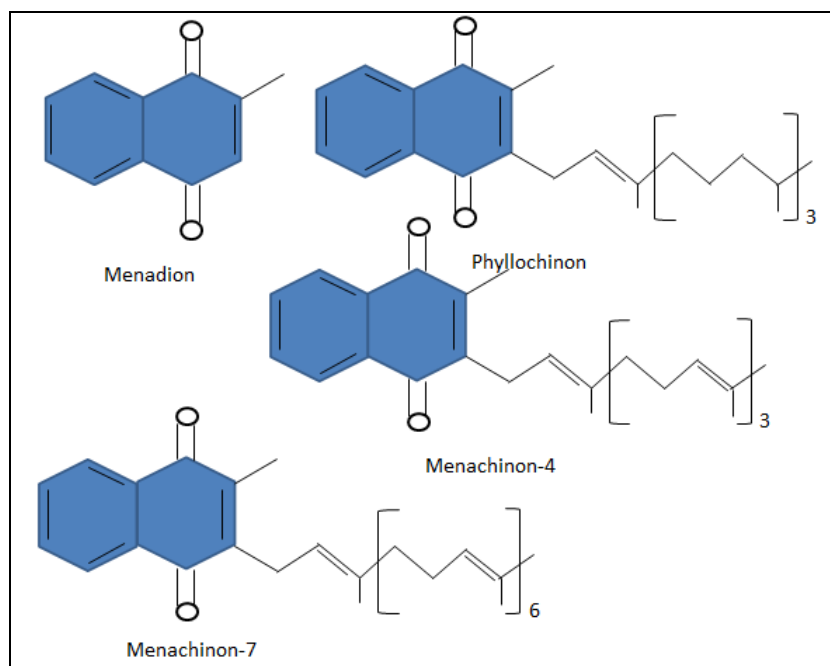


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Strukturen von Vitamin K

Diese Familie von Verbindungen wird durch ein Naphtochinonringsystem (=bicyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff) mit jeweils einem Carbonylrest an den Positionen 1 und 4 charakterisiert. Vitamin K enthält zusätzlich eine Methylgruppe und eine fettlösliche Seitenkette

an den Positionen 2 und 3 (Lamson und Plaza, 2003). Vitamin K₁ ist die bekannteste Verbindung der Vitamin K Familie und wird sowohl in den Chloroplasten von Algen als auch in höheren Pflanzen gebildet. Vitamin K₁ wird als Phyllochinon bezeichnet und besitzt an der Position 3 eine C-20 Phytol- Seitenkette (Lamson und Plaza, 2003; Oldenburg et al., 2008). Der Name Phyllochinon entstand durch die enge Beziehung zur Photosynthese der Pflanzen. Vitamin K₂, Menachinon, besitzt an Position 3 eine ungesättigte, C-40 lange Seitenkette und wird von zahlreichen Bakterien, unter anderem auch von menschlichen Darmbakterien, produziert (Lamson und Plaza, 2003). Menadion oder Vitamin K₃ ist eine synthetisch hergestellte, wasserlösliche Verbindung die aufgrund ihrer Kanzerogenität für den Gebrauch am Menschen verboten ist und nur noch für Tiere verwendet werden darf (Lamson und Plaza, 2003).

Von praktischer Bedeutung im menschlichen Stoffwechsel sind ausschliesslich Vitamin K₁ und K₂. Menachinon-4 ist die häufigste Form von Vitamin K in tierischen Organismen und wird durch intestinale Bakterien produziert. Menachinon-4 besitzt unter den Vitamin K Verbindungen die höchste Aktivität bei γ -Carboxylierungsreaktionen (Lamson und Plaza, 2003).

Das fettlösliche Vitamin K wird über die Nahrung aufgenommen und im Jejunum aktiv über die Mukosazellen absorbiert. Als Emulgatoren wirken die im Darm aktiven Gallensäuren und Pankreaslipasen. Vitamin K wird dabei an Chylomikronen und Lipoproteine gebunden und gelangt in dieser Form in die Lymphe und über den Ductus thoracicus ins Blut. Das Vitamin K wird dann durch das Blut zur Leber transportiert (Biesalsky, 1999; Biesalsky et al., 2002).

Bei der Aufnahme des Vitamin K in das Gewebe spielt das Apolipoprotein E eine wichtige Rolle. ApoE ist eine Hauptkomponente von Chylomikronen und ein wichtiger Ligand der Rezeptor assoziierten Aufnahme (Kohlmeier et al., 1996; Mahley, 1988; Newman et al., 2002; Stulc et al., 2000).

Das menschliche ApoE ist ein 299 Aminosäuren großes Protein mit einem molekularen Gewicht von 34 kDa. Die drei häufigsten Formen des ApoE, ApoE₂ – E₃ – E₄, sind das Ergebnis dreier Allele auf dem gleichen Genlocus des Chromosom 19q13.2 (Caldwell et al., 2007).

Polymorphismen im ApoE beeinflussen den Plasmagehalt des Phyllochinon und die Affinität zum Rezeptor in abnehmender Reihenfolge: E₂>E₃>E₄ (Chou et al., 2005; Saupe et al., 1993; Wadelius et al., 2007; Weintraub et al., 1987). Die drei Allele des ApoE unterscheiden sich an der Aminosäureposition 112 (rs7412) und an der Stelle 158 (rs429358) (Caldwell et al., 2007). Das Allel von ApoE₃ (Cys¹¹², Arg¹⁵⁸) ist bei Kaukasiern zu ca. 74 % und somit am häufigsten vertreten. ApoE₂ (Cys¹¹², Cys¹⁵⁸) unterscheidet sich von ApoE₃ durch die Substitution des

Arginin an der Stelle 158 durch Cystein. Auch beim ApoE4 (Arg¹¹², Arg¹⁵⁸) ist gegenüber dem ApoE3 nur eine Aminosäure substituiert. Hierbei ist das Cystein an der Stelle 112 durch Arginin ersetzt (Caldwell et al., 2007; Kohlmeier et al., 1996). ApoE4 besitzt nicht nur die geringste Rezeptoraffinität, sondern wird ebenfalls positiv mit dem Auftreten von Atherosklerose und Morbus Alzheimer assoziiert (Caldwell et al., 2007).

Ob sich der Polymorphismus im ApoE auch auf die Gerinnungsaktivität bei Frühgeborenen auswirkt ist bisher noch nicht untersucht worden und Gegenstand dieser Arbeit.

1.4 Vitamin K Stoffwechsel

Vitamin K ist essentiell für die posttranslationale Modifikation von Vitamin K-abhängigen Proteinen. Das Enzym welches diese Proteinmodifikation durchführt ist die γ -Carboxylase, ein integrales mikrosomales Transmembranprotein des rauhen endoplasmatischen Retikulums (Brenner et al., 1998; Monagle und Hagstrom, 2004; Mutucuarana et al., 2003).

Die humane γ -Glutamylcarboxylase cDNA enthält ein offenes Leseraster, das sich über 2274 Nucleotide erspannt und für eine 758 Aminosäuren lange Polypeptidkette mit drei transmembranären Domänen nahe des Aminoterminus codiert. Das Gen für die Carboxylase befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosom 2p1.2. Es erstreckt sich über 13 Kilobasen und beinhaltet 15 Exone (Bolt et al., 2001). Verschiedene Polymorphismen des γ -Carboxylase Gens sind bekannt. Einer dieser single nucleotide polymorphisms (SNPs) (siehe oben) ist eine Substitution des Guanins zu Adenin an der Position 974 (GGCX: c.974 G>A). Dies hat zur Folge, dass die Aminosäure Arginin an der Position 323 zu einem Glutamin ausgetauscht wird (GGCX: p.Arg323Gln; rs699664) (D'Andrea et al., 2005; Watzka et al., 2009). Diese Aminosäuresubstitution führt in-vitro zu einer erhöhten Aktivität der γ -Carboxylase. In der Normalbevölkerung resultiert dies jedoch nicht in einer funktionellen Relevanz auf die Gerinnungsaktivität (Watzka et al., 2009). Ob sich der SNP auf die Gerinnungsaktivität bei Frühgeborenen auswirkt, soll in dieser Arbeit untersucht werden.

Die γ -Carboxylase carboxyliert die Glutaminreste der Vitamin K-abhängigen Proteine II, VII, IX und X, sowie Protein C, Protein S und weitere Strukturen zu γ -Carboxyglutaminresten, wodurch diese in ihre aktive Form überführt werden (Bergmann und Rastetter, 1993; Biesalsky, 1999; Colman et al., 2006; Lichtman et al., 2006; Metzler, 2003; Runge und Patterson, 2006). Der Reaktionsmechanismus läuft folgendermaßen ab: Eine ca. 18-amino lange, konservierte Peptid-

sequenz bindet an eine Propeptiderkennungsregion (495-513) der γ -Carboxylase. Diese Propeptidbindung löst einen Transfer der unmodifizierten Glutamindomäne zum aktiven Zentrum durch allosterische Aktivierung aus. Das aktive Zentrum befindet sich in einer hoch konservierten Region. Von besonderem Interesse sind dabei die Reste zwischen AA 393 und 404. In dieser konservierten Region finden sich identische Sequenzen bei Menschen, Rindern, Mäusen, Ratten und Beluga Walen. Auch im Vergleich mit *Drosophila melanogaster*, *Conus textile* und *Anopheles gambiae* lassen sich identische Stellen finden (Mutucuarana et al., 2003).

Gleichzeitig löst die Propeptidbindung eine zweite Konformationsänderung aus, welche in einer gesteigerten Affinität der γ -Carboxylase für Vitamin K Hydrochinon resultiert. Der letzte Schritt beginnt mit der Abstraktion eines Protons von einem Glutaminsäurerest. Das dadurch erzeugte Carbanion reagiert mit CO_2 zu einer γ -carboxylierten Glutaminsäure. Für diesen Reaktionsschritt ist Vitamin K Hydrochinon unentbehrlich. Es dient als Elektronendonator und wird dabei selber zu Vitamin K Epoxid oxidiert. Das Propeptid bleibt im aktiven Zentrum gebunden, während die Glutamin Domäne transloziert wird, um die nächste unmodifizierte Glutaminsäure zu modifizieren. Erst wenn fast alle oder alle möglichen Glutamin Domänen des Propeptids carboxyliert sind, verringert sich die Affinität des aktiven Zentrums der γ -Carboxylase so, dass der modifizierte Faktor entlassen wird (Oldenburg et al., 2008).

Vitamin K wird als Cofaktor bei der γ -Carboxylierung zu Vitamin K-Epoxid oxidiert. Dieses Epoxid ist jedoch kein Abfallprodukt sondern wird über die Vitamin K Epoxidreduktase (VKORC1) in 2 Schritten über Vitamin K-Chinon zu Vitamin K-Hydrochinon reduziert. Dieses Recycling des Vitamin K wird als Vitamin K-Zyklus bezeichnet (Oldenburg et al., 2006). Die VKORC1 ist wie die γ -Carboxylase im rauen endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Rost et al., 2004).

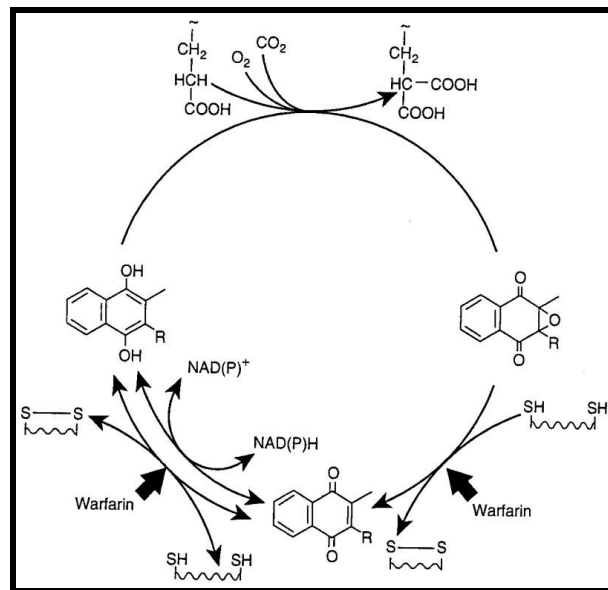


Abbildung 3: Veranschaulichung der chemischen Vorgänge im Vitamin K Zyklus.

(Oldenburg et al, 2006)

Bei der VKORC1 handelt es sich um ein Enzym mit einer 4-transmembranären Domäne, wobei sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus ins Cytoplasma gerichtet sind. Zwischen der 1. und 2. transmembranären Domäne befindet sich ein grosser zytoplasmatischer Loop. Zwischen der 2. und der 3. transmembranären Domäne eine kleine, ins Lumen des endoplasmatischen Retikulums gerichtete Schleife (Chu et al, 2006; Li et al., 2010). Das aktive Zentrum des Enzyms besteht aus einem CXXC Redox-Motiv (Rost et al., 2003).

Die Funktion der VKORC1 im Vitamin K- Zyklus besteht darin, Vitamin K-Epoxid in Vitamin K-Hydrochinon zurückzuführen, wodurch dieses erneut für den Zyklus zur Verfügung steht.

Die VKORC1 wird durch Coumarine in ihrer Funktion gehemmt. Dieser Effekt wird zur Therapie und Prophylaxe von venösen und arteriellen thrombembolischen Erkrankungen genutzt.

Ein relevanter Polymorphismus befindet sich in der Promotorregion des *VKORC1*. Es handelt sich um einen Austausch von Guanin zu Adenin (*VKORC1*: c.-1639 G>A; rs9923231). Der Austausch einer einzelnen Base gegen eine Andere wird als SNP (short nucleotide polymorphism) bezeichnet. Dieser SNP in der *VKORC1* führt zu einer 50 % erniedrigten Expression der mRNA, was sich in Form einer verringerten VKORC1 Aktivität auswirkt (Geisen et al., 2005; Rieder et al., 2005). Diese verringerte Expression, respektive Aktivität, hat bei gesunden Menschen keinen Einfluss auf die Gerinnungsaktivität (Watzka et al., 2009), geht jedoch mit einer Dosisreduktion um 50 % einer Coumarin Therapie einher (Caldwell et al., 2007; D'Andrea et al., 2005; DeFelice

et al., 2001; Geisen et al., 2005, Oldenburg et al., 2006, Rieder et al., 2005; Wadelius et al., 2007).

Ob der Polymorphismus Einfluss auf die Gerinnungsaktivität bei Frühgeborenen hat, soll in dieser Arbeit untersucht werden.

Nach jedem Zyklus wird jedoch eine geringe Menge des Vitamin K über das Enzym Cyp4F2 inaktiviert und dann zu ca. 50 % über den Stuhl und ca. 20 % über den Urin ausgeschieden (Biesalsky, 1999).

Cyp4F2 besteht aus 520 Aminosäuren und ist auf Chromosom 19 lokalisiert. Cyp4F2 ist ein Mitglied der Cytochrom P450 Familie. Die Cytochrom P450 Enzyme fungieren als Monooxygenasen und sind somit wichtiger Bestandteil der Biotransformation verschiedener Medikamente. Cyp4F2 ist an der Inaktivierung von Vitamin K beteiligt, wodurch ständig ein geringer Teil des Vitamin K irreversibel inaktiviert wird, sodass ein erneutes Durchlaufen des Vitamin K Zyklus für diese Vitamin K Moleküle nicht mehr möglich ist. Das inaktivierte Vitamin K wird dann über Stuhl und Urin ausgeschieden (Biesalsky et al., 2002).

Polymorphismen im Cyp4F2 Gen können dazu führen, dass Vitamin K in geringeren Mengen inaktiviert wird, wodurch mehr Vitamin K für den Zyklus bereitsteht. Ein solcher Polymorphismus ist der SNP rs 2108622 (McDonald et al., 2009) im Exonbereich 11 welcher mit einer höheren notwendigen Warfarin Dosierung bei antithrombotischer Therapie assoziiert ist (McDonald et al., 2009).

Die Frage ob sich der Polymorphismus im Cyp4F2 auf die Gerinnungsaktivität bei Frühgeborenen auswirkt ist noch nicht geklärt und soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

1.4.1 VKCDF

Bei der VKCFD (= vitamin k-dependent clotting factor deficiency) handelt es sich um eine seltene, autosomal rezessiv vererbte Blutgerinnungsstörung (bis 2008 wurden zirka 30 Fälle beschrieben (Weston und Monahan, 2008). Diese Krankheit beruht auf einer Punktmutationen entweder im *γ-Carboxylase* (VKCDF typ 1) oder im *VKORC1* (VKCDF typ2) Gen. Compound heterozygot vererbt, manifestiert sich diese Krankheit klinisch oft schon im Neugeborenenalter durch das Auftreten einer IVH, Nabelblutungen oder häufig auch nur durch harmlose mukokutane Blutungen (Rost et al., 2006; Weston und Monahan, 2008). Patienten mit einer heterozygoten Vererbung sind in der Regel symptomlos.

1.5 Hirnblutungen bei Frühgeborenen

Kinder, die vor der 32. Schwangerschaftswoche (SSW) geboren werden oder ein Geburtsgewicht von weniger als 1500g aufweisen, werden als extreme Frühgeborene bezeichnet. Hiervon sind ca. 1.5 % aller Neugeborenen eines Geburtenjahrgangs betroffen (Papile et al., 1978). Das Auftreten einer peri- oder intraventrikulären Hirnblutung (IVH) stellt eine der schwersten Komplikationen der extremen Frühgeburt dar und ist sowohl mit einer hohen Mortalität, als auch einer hohen Morbidität verbunden (Annibale et al., 2006; Blackburn, 2003; Paneth und Pinto-Martin, 1990; Tausch et al., 2005).

Die Häufigkeit einer IVH ist bei extrem Frühgeborenen mit bis zu 40 % signifikant höher als bei Neugeborenen > 32 SSW, deren Risiko für die Entwicklung einer IVH bei 3-4 % liegt (Annibale et al., 2006; Paneth und Pinto-Martin, 1990). Mit zunehmendem Gestationsalter reduziert sich das Risiko einer Hirnblutung und beträgt bei einem Gestationsalter von > 35 Wochen nahezu 0 (Annibale et al., 2006; Paneth und Pinto-Martin 1990). Als Risikofaktoren für eine IVH gelten: Inflammation, Asphyxie, Hypoxie, Azidose, traumatische Geburt, Reanimation, Transport nach der Geburt, Blutdruckschwankungen, Hypothermie, Hyperkapnie, Volumenexpansion, Pneumothorax, persistierender Ductus Arteriosus Botalli, Gerinnungsstörungen und Thrombozytopenie (Annibale et al., 2006; Corral et al., 2001; Hassan et al., 1990; Linder et al., 2003; McDonald et al., 2005).

Auch das Geschlecht scheint einen wesentlichen Einfluss auf Inzidenz und das Ausmaß einer Hirnblutung zu haben. Männliche Frühgeborene haben ein höheres Risiko für die Entwicklung einer intraventrikulären Blutung, verglichen mit weiblichen Frühgeborenen des gleichen Gestationsalters (12,2 % versus 7,2 %) (Tioseco et al., 2006). Männliches Geschlecht hat jedoch nicht nur Einfluss auf die Häufigkeit, sondern auch auf das Ausmaß der Blutung (Tioseco et al., 2006). So sind männliche Frühgeborene häufiger von schweren Hirnblutungen betroffen als weibliche Frühgeborene. Dadurch ist auch die Letalität männlicher Frühgeborener mit einer Hirnblutung höher als bei weiblichen Frühgeborenen (Tioseco et al., 2006).

In Folge von perinataler Hypoxämie, zerebralen Perfusionsstörungen, bzw. Hyperoxie-induzierter Schädigungen kommt es insbesondere bei extrem Frühgeborenen im Bereich des fragilen Kapillar- und Arteriolen-system der subependymalen Keimschicht (=germinale Matrix) zu peri- und intraventrikulären Blutungen (Paneth und Pinto-Martin, 1990; Paneth et al., 1994). 25 % der intra- oder periventrikulären Blutungen bei Frühgeborenen ereignen sich um die 6. Lebensstunde und 50 % während der ersten 24 Lebensstunden. Weniger als 5 % der Kinder entwickeln erst

nach dem 4. oder 5. Lebenstag eine Hirnblutung (Paneth und Pinto-Martin, 1990).

Zur Diagnostik einer IVH in den ersten Lebenstagen werden serielle transfontanelläre Ultraschalluntersuchung durchgeführt. Entsprechend der Ultraschallbefunde erfolgt eine Einteilung der Ausprägung einer Hirnblutung bei Frühgeborenen (Papile et al., 1978; Volpe, 2008).

*Papile ()	Grading System (nach CT-Befund)	Volpe ()	Grading System (nach Ultraschallbefund)
I	Supependymale Blutung mit minimaler o. keiner intraventrikulärer Einblutung	I	Blutung der germinalen Matrix < 10% IVH
II	Ventrikeleinbruch (intraventrikuläre Blutung = IVH) ohne Raumforderung	II	IVH 10%-50%
III	Dilatation der Ventrikel durch Blutfüllung	III	IVH >50%, oft mit Ausbreitung in laterale Ventrikel
IV	Einblutung in Ventrikel mit Dilatation, kombiniert mit Einblutungen ins Gehirnparenchym	Separate Unterscheidung *	Periventrikuläre Echoverdichtung, kennzeichnend für parenchymale Läsionen
* Nach Volpe werden parenchymale Läsionen und intrazerebrale Blutungen nicht als Grad 4 zusammengefasst, sondern getrennt betrachtet. *Papile: Einteilung nach CT Befund (Papile et al., 1978; Burststein et al. 1979)			

Tabelle 3: Einteilung der Hirnblutungen nach Volpe (Einteilung nach Ultraschallbefunde) und Papile (Einteilung nach CT-Befund)

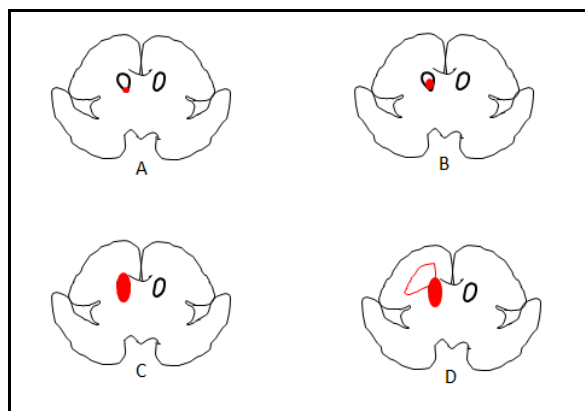


Abbildung 4: Bildliche Darstellung der verschiedenen Ausmaße einer Hirnblutung (Nach Volpe:

A = I°, B = II°, C = III°, D = Parenchymale Blutung)

Ausgehend von der noch unreifen und stark vaskularisierten germinalen Matrix kommt es zu Blutungen verschiedenen Ausmaßes (Annibale et al., 2006; Volpe, 2008), wobei in 30 % der Fälle eine asymmetrische bilaterale Blutung stattfindet. Die restlichen 70 % zeichnen sich durch einen unilateralen Prozess aus (Annibale et al., 2006; Paneth und Pinto-Martin, 1990).

Die Prognose für Überleben und / oder bleibende Schäden hängt stark von Ausmaß und Lokalisation der Blutung ab.

Bei Blutungen I. und II. Grades ist die neurologische Prognose in der Regel gut. Geringe motorische oder kognitive Defizite werden hier als Langzeitfolge beschrieben (Annibale et al., 2006; Burstein et al., 1979).

Blutung III. und IV. Grades führen zu schweren klinischen Verläufen und in zirka 10 % bei Blutungen des III. und bis zu 80 % bei Blutungen des IV. Grades zum Tod (Annibale et al., 2006). Die entwicklungsneurologische Prognose der überlebenden Kinder ist abhängig vom Ausmaß der Parenchymläsion und von der Entwicklung eines posthämorrhagischen Hydrozephalus bei ca. 5 % der betroffenen Kinder (Annibale et al., 2006; Burstein et al., 1979). Motorische oder kognitive Defizite entwickeln sich in dieser Hirnblutungsgruppe in mehr als 50 % der Fälle. Sie sind gekennzeichnet durch ein nicht altersentsprechendes Bewegungsverhalten sowie Störungen der Aufmerksamkeit (Internalisierungsstörungen) (Annibale et al., 2006; Burstein et al., 1979).

Therapeutische Ansätze zur Prävention einer IVH bestehen darin Risikofaktoren wie zum Beispiel Hypoxie, Hyperkapnie, Asphyxie, Azidose und Blutdruckschwankungen adäquat zu behandeln respektive primär zu vermeiden (Volpe, 2008). Mechanische Faktoren wie traumatische Geburt und Transport innerhalb der ersten Lebensstage sollten ebenfalls komplett vermieden werden.

Proinflammatorische Zytokine, Ischämie und Hypoxie induzieren die Synthese von Adhäsionsmolekülen in zerebralen Endothelzellen. Dieser Vorgang ermöglicht Entzündungszellen eine Migration in das Gewebe (Acarin et al., 2000; Sarkar et al., 2009; Stanimirovic und Satoh, 2000). Entzündliche Gewebsinfiltrationen und zerebrale Gefäßendothelläsionen führen bei Früh- und Neugeborenen zu den typischen Folgeläsionen IVH und periventrikulärer Leukomalazie (Yoon et al., 1997). Daher sollten Komplikationen wie Inflammation und Sepsis regelmäßig überwacht und bereits bei Verdacht auf ein entzündliches Geschehen adäquat behandelt werden (Volpe, 2008).

Trotz Vermeidung aller Risikofaktoren kann eine Hirnblutung nach wie vor nicht bei allen extrem frühgeborenen Kindern verhindert werden. Deshalb sollte versucht werden, eine aktive

Blutung früh zu erkennen beziehungsweise deren Progredienz zu verhindern. Zur Physiologie der Gerinnungsaktivität gibt es bisher nur wenige Untersuchungen. Insbesondere Frühgeborene mit Hirnblutungen wurden bisher nur in wenigen Pilotstudien systematisch untersucht.

Theoretisch kann eine Substitution mit aktiviertem Faktor VII oder Fresh frozen plasma (FFP) erwogen werden, um eine weitere Progredienz zu verhindern. Mit der Substitution von aktiviertem Faktor VII wird einerseits Tissue factor abhängig die Gerinnungskaskade aktiviert, aber auch Tissue factor unabhängig an Plättchen gebundener FX (siehe Abschnitt Gerinnung).

FFP enthält die flüssigen und gelösten Bestandteile des Blutes. Zellen wie Erythrozyten und Leukozyten werden durch Zentrifugieren entfernt. Somit werden mit der Gabe von FFP sämtliche Gerinnungsfaktoren transfundiert. Dies bewirkt einen erhöhten Blutplasmagehalt der Gerinnungsfaktoren was sich positiv auf die Beendigung einer Blutung auswirken kann (McCrea und Ment, 2008).

Bisher gibt es erst wenige Studien zur Wirkung von FFP und Faktor. Jedoch geben die bisher durchgeführten Pilotstudien, die die Wirkung von aktiviertem Faktor VII und FFP untersucht haben, Hinweise auf einen positiven Effekt auf die Limitierung der Blutung bei nur geringen Nebenwirkungen (Gomez et al., 1998; Steiner et al., 2006; Veldman et al., 2006).

Eine Pilotstudie zur Prävention einer IVH, in denen Frühgeborene zwischen der 23. und 28. Woche mit jeweils 100 µg/kg Körpergewicht rekombinant aktiviertem Faktor VII (rFVIIa) während der ersten 72 Lebensstunden substituiert wurden, konnte jedoch bisher keine Senkung der Auftretenshäufigkeit einer IVH nachweisen (Veldman et al., 2006).

2.0 Material und Methoden

2.1 Patienten / Material

2.1.1 Patienten und Probenherkunft

Im Zeitraum zwischen Mai 2008 und Februar 2010 wurden alle im Universitätsklinikum Bonn geborenen Frühgeborene, die mit einem Gestationsalter von weniger als vollendeten 32 Schwangerschaftswochen geborenen wurden, in eine prospektive Studie aufgenommen. Von den 124 in Frage kommenden Kindern, die in diesem Zeitraum geboren wurden, konnten 110 in die Studie eingeschlossen werden. 14 Kinder wurden aufgrund fehlender Blutproben oder anderer

Ausschlusskriterien nicht in die Studie aufgenommen. Von den 110 Studienteilnehmern entwickelten 24 im Studienverlauf eine Hirnblutung.

2.1.2 Referenzgruppe

Als Referenzgruppe für die Untersuchung der Genpolymorphismen dienten uns die Blutproben von bereits voruntersuchten, gesunden Blutspendern des Universitätsklinikum Bonn (GGCX und Faktor VII Promotor, n=250; VKORC1, n=200; CYP4F2, n=125; ApoE, n=252) (Watzka et al., 2009).

2.1.3 Einschlusskriterien

Um in die Studie aufgenommen werden zu können, mussten die Probanden folgende Kriterien erfüllen:

- 1.) In der Frühschwangerschaft sonographisch definiertes Gestationsalter, das bei Eintritt in die Studie weniger als vollendete 32 Schwangerschaftswochen betrug.
- 2.) Schriftliche Einwilligung der Erziehungsberechtigten nach erfolgtem Aufklärungsgespräch
- 3.) Die Kinder durften keine der unten genannten Fehlbildungen aufweisen:
 - Angeborene zerebrale Fehlbildungen
 - Pränatale Diagnose einer zerebralen Morbidität (fetale IVH, Periventrikuläre Leukomalazie (PVL))
 - Chromosomale Erkrankungen
 - Angeborene cholestatische Lebererkrankungen
 - Virale Hepatitis
 - Komplexe Herzfehler.

2.1.4 Probenmaterial

Im Perinatalzentrum des Universitätsklinikums Bonn ist eine gerinnungsphysiologische Basisuntersuchung Bestandteil der unmittelbar nach der Geburt durchgeführten Routine Laboruntersuchungen bei Frühgeborenen, die mit einem Gestationsalter von weniger als 32 vollendeten SSW geboren werden. Hierbei wird vor der Ersten Vitamin K Gabe 0,5 ml Citratblut venös oder

arteriell vom Neugeborenen entnommen. Aus diesem Citratblut wird der Gehalt folgender Gerinnungsfaktoren routinemässig bestimmt: Fibrinogen, Antithrombin III, sowie die Konzentrationen der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren: Faktor II, Faktor VII und Faktor X. Um diese Faktoren untersuchen zu können werden zunächst Citrat-Plasma und Sediment durch zentrifugieren getrennt. Zum Sediment zählen: Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten. Diese Blutbestandteile können nicht mehr weiter verwendet werden und werden im Normalfall verworfen. In unserer Studie verwendeten wir dieses Sediment, d.h. das zu verwerfende Restmaterial, für die DNA-Extraktion und die molekulargenetischen Untersuchungen.

2.1.5 Klinische Daten

Des Weiteren wurden von jeder Schwangerschaft und von jedem Kind klinische Daten aus der Perinatalzeit erhoben:

-Geschlecht

-Gestationsalter

-Geburtsgewicht

-APGAR Wert nach jeweils 1, 5 und 10 Minuten. Der klinische Zustand von Neugeborenen lässt sich mittels des APGAR Score standardisiert beurteilen. Der APGAR Score umfasst 5 Komponenten: Atemantrieb, Herzfrequenz (Puls), Muskeltonus (Grimassieren), Hautfarbe (Aussehen), Reflexauslösbarkeit. Die Bestimmung erfolgt jeweils nach 1, 5 und 10 Minuten. Die Punktevergabe sieht dabei folgendermaßen aus (Sitzmann et al., 2007):

Komponente	0 Punkte	1 Punkt	2 Punkte
Atemantrieb	Kein	Schnappatmung oder unregelmäßig, langsame Atmung	Regelmäßig, kräftig schreiend
Herzfrequenz (Puls)	Nicht messbar/vorhanden	<100	>100
Muskeltonus	Schlaff	Mittel, träge Flexionsbewegung	Gut, normale Spontanbewegung
Hautfarbe	Blau oder weiß	Stamm rosig, Extremitäten blau	Rosig
Reflexe	Keine	Verziehen des Gesichtes, Grimassieren	Husten bzw. Niesen, Würgen, Schreien

Tabelle 4: Erklärung des APGAR Scores mit Punktesystem

Kinder mit einem APGAR von 8-10 werden als lebensfrische Kinder eingestuft. Kinder mit einem APGAR von 4-7 leiden an einer mittelgradigen Depression und ein APGAR zwischen 0-3 steht für eine schwergradige Depression

-*Persistierender Ductus Arteriosus (PDA)*. Als PDA definiert wird ein echokardiographischer und Farbdoppler –sonographischer Nachweis eines persistierenden Ductus Arteriosus im Alter von 48 Lebensstunden.

-*Celestanprophylaxe*. Diese ist definiert als eine antenatale mütterliche Steroidprophylaxe, in Form einer zweimaligen Gabe von 12mg Betametason i.m. im Abstand von 24 Stunden.

Celestan ist ein Medikament welches das synthetische Glukokortikoid Betamethason enthält. Bei einer drohenden Frühgeburt wird der Mutter Celestan verabreicht, um die Lungenreife des ungeborenen Kindes zu beschleunigen. Glukokortikoide stimulieren die endogene Synthese von Surfactant-assoziierten Proteinen und erhöhen die Phospholipidsynthese durch eine gesteigerte Aktivität von Phosphatidylcholin in den Typ II Pneumozyten. Dadurch kann ein Surfactantmangel bei Frühgeborenen signifikant reduziert werden, wodurch die Notwendigkeit einer maschinellen Beatmung aufgrund eines Atemnotsyndroms reduziert wird (Bolt et al., 2001).

-*Klinischer Verdacht auf Chorioamnionitis*. Die Definition einer klinischen Chorioamnionitis beinhaltet eine Leukozytose $> 10.000/\mu\text{L}$, eine Erhöhung des C-reactiven Proteins (CRP) $> 5\text{mg/dL}$ oder eine Körpertemperatur $> 38^\circ\text{C}$

Alle Frühgeborenen wurden nach den etablierten Standardmethoden überwacht. Dazu gehören:

1.) Zerebrale Funktionsdiagnostik:

Während des klinischen Verlaufs innerhalb der ersten 72 Lebensstunden erfolgte in einem 12-stündlichen Intervall eine standardisierte zerebrale Funktionsdiagnostik, die eine Sonographie des Schädels und eine dopplersonographische Darstellung der zerebralen Blutverhältnisse über der Arteria cerebri anterior mit Bestimmung der Flussgeschwindigkeiten und des Resistance Index umfasste. Die Durchführung und Dokumentation der Sonographien und Dopplersonographien erfolgte gemäß der DEGUM Vorgaben (Deeg et al., 1999).

Die Untersuchungen wurden durch die jeweiligen Dienstärzte durchgeführt. Mit 7, 14, 28 Lebenstagen und vor der Entlassung des Patienten wurden weitere Schädelsonographien zur Erfassung von Spätblutungen und periventrikulärer Leukomalazie durchgeführt. Für die Ultraschalluntersuchungen wurden folgende Geräte verwendet: Vingmed Vivid Five, 8,5-10 MHz Schallkopf oder Philips HD7.

2.) Kreislaufüberwachung:

Zur Kreislaufüberwachung wurde bei allen Patienten eine arterielle oder nicht invasive Blutdruckmessung nach Riva-Rocci durchgeführt. Die gemessenen Daten wurden in Korrelation zu den erhobenen zerebralen Ultraschall- und Dopplerbefunden gesetzt. Bei allen Patienten wurde im Alter ≥ 48 -60 Lebensstunden eine Echokardiographie mit Doppleruntersuchung zum Ausschluss eines persistierenden Ductus Arteriosus, sowie zur Bestimmung eventuell vorhandener intrakardialer Shunt-Verhältnisse durchgeführt. Die Blutdrucküberwachung wurde in der Patientenkurve alle 30 Minuten dokumentiert.

2.1.6 Laborparameter

Des Weiteren wurden die folgenden Laborparameter erhoben:

-*Gehalt des Gerinnungsfaktors II* (mg/l) (AMAX CS 190 System; Trinity Biotec, Lemgo, Deutschland; Reagenzien Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Deutschland)

-*Gehalt des Gerinnungsfaktors VII* (mg/l) (AMAX CS 190 System; Trinity Biotec, Lemgo, Deutschland; Reagenzien Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Deutschland)

-*Gehalt des Gerinnungsfaktors X* (mg/l) (AMAX CS 190 System; Trinity Biotec, Lemgo, Deutschland; Reagenzien Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Deutschland)

-*Hämoglobingehalt direkt nach der Geburt* (g/dl)

-*Thrombozytenzahl direkt nach der Geburt* (G/l)

-*Leukozytenzahl direkt nach der Geburt* (G/l)

-*Interleukin 6 Wert direkt nach der Geburt* (pg/ml)

Die Bestimmung der Serumkonzentration von Interleukin 6 ist Bestandteil des nachgeburtlichen Routinelabors (Immulite; DPC-Biermann, Bad Nauheim, Deutschland)

-*Gehalt an C-reaktivem Protein nach 24 Lebensstunden, also am 2. Lebenstag* (mg/l)

-*CO₂ Partialdruck nach der Geburt*. Dieser Wert wurde aus der direkt nach Geburt erfolgten Blutgasanalyse ermittelt (mm Hg).

2.2 Methoden

In den folgenden Abschnitten erfolgt eine detaillierte Auflistung der Chemikalien, der Geräte und der Methoden mittels derer wir die Blutproben analysierten.

2.2.1 Chemikalien

Zur laborchemischen Auswertung der Blutproben wurden folgende Chemikalien verwendet:

<i>Produkt</i>	<i>Firma</i>
Agarose, small DNA Agarose	Biozym
AmpliTaq DNA Polymerase	Qiagen
Abgen Cybergren	Qiagen
Ethidium Bromid Pulver	Sigma
Exo	Fermentas
FastAP	Fermentas
Ladepuffer GeneRuler 100 bp DNA	Fermentas
VKORC-Primer rs9923231 for 5`GGTAGGTGCAACAGTAAGGGA3`; rev 5`AAATGCTAGGATTATAGGCGTGA3`	MWG/Eurofins
GGCX-Primer rs699664 for 5`ACCGCACCCGGCCAATG3`; rev 5`ACCGCACCTGGCCAATGG3`	MWG/Eurofins
FVII-Primer rs36208070 for 5`CCTGGTCTGGAGGCTCTC3`; rev 5`GCTGAGAGCTGCACCTGGCCGGC3`	MWG/Eurofins
ApoE-Primer rs 7412; rs429358 for 5`AGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGA3`; rev 5`CCCTCGCGGGCCCCGGCCTGGTACAC3`	MWG/Eurofins
Cyp4F2-Primer rs2108622 For 5`TGAGGGAGGTGATGTTGGAT3`; Rev 5`GTCTCCTGGGTAGGAAGAGG3`	MWG/Eurofins
PureLink Genomic DNA Kit	Invitrogen
Ready Mix	Fermentas
Sequenzierpuffer	Fermentas

Tabelle 5: Überblick über die laboranalytisch verwendeten Chemikalien mit Angabe der Produktionsfirma.

2.2.2 Geräte und Materialien

Folgende Geräte und Materialien wurden für die laborchemische Auswertung verwendet:

<i>Gerät /Material</i>	<i>Firma</i>
Eppendorf Reference Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Elektrophoresekammer Horizon 11-14	Life Technologies
Kühlzentrifuge Universal 32R	Hettich
Mikrowelle MW 1243	Bomann
PCR Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Sequenzier 3130xl (Genetic Analyzer)	Applied Biosystem
Spannungsquelle AP 2`000	Biometra
Thermocycler T3000	Biometra
<i>Gerät /Material</i>	<i>Firma</i>
UV Lichtquelle ChemiDoc	Biometra
Vortex Genie 2 Mischer	Scientific Industries
Waage DM 2000	Mettler
Wasserbad SW 21	Julabo
Zentrifuge 5415R	Eppendorf

Tabelle 6: Überblick über die verwendeten Geräte und Materialien mit Angabe der Herstellerfirma

2.2.3 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung erfolgte aus dem Restblut der Routineblutproben mittels PureLink Genomic DNA Kit.

Im ersten Schritt wurden 200µl des Sediments in ein steriles Gefäß, welches dem Kit beigelegt war, pipettiert. Zeitgleich wurde einen Wärmeblock auf 55°C vorgewärmt. Zum Sediment wurden dann nach Protokoll 20 µl Proteinase K und 20 µl RNase A hinzugefügt. Diese Mischung wurde über 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der 2 Minuten

wurden 200 µl PureLink™ Genomic Lysis/Binding Puffer hinzugefügt und die Proben gut durchgemischt. Nach dem Mischvorgang wurden die Blutproben für 10 Minuten bei 55°C im Wärmeblock inkubiert, um die Proteindenaturierung zu fördern. Anschließend wurde den Lysaten 200 µl 96-100 %-iger Ethanol hinzugefügt. Die Lysate mussten dann für mindestens 5 Sekunden wiederum vollständig durchgemischt werden. Als nächstes wurden ca. 640 µl des entstandenen Lysats in ein „PureLink™ Spin Column“ (spezielle, im Kit enthaltene Gefäße mit Membran und Auffanggefäß) überführt. Diese wurden nun bei 10`000 rpm und Raumtemperatur über eine Minute zentrifugiert. Durch das Zentrifugieren wurde die DNA vom übrig gebliebenen Lysat getrennt. Dabei wurde die DNA an die Membran gebunden und das Lysat in den Auffangbehälter gespült. Als nächster Schritt folgte dann das Waschen der DNA. Dazu wurde der Filter in ein steriles Auffanggefäß gestellt, 500 µl Waschpuffer 1 dazugegeben und das ganze wiederum eine Minute bei Raumtemperatur und 10`000rpm zentrifugiert. Erneut wurde der Filter in ein neues, steriles Auffanggefäß umgesetzt. Zu diesem wurden 500 µl Waschpuffer 2 hinzugefügt. Nach diesem Schritt wurden die Proben diesmal bei maximaler Umdrehungsgeschwindigkeit während 3 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dadurch wurde der übriggebliebene Waschpuffer abzentrifugiert. Der nächste Schritt implizierte die DNA-Elution. Dazu wurde der Filter wieder in einem neuen Auffanggefäß platziert, 100 µl PureLink™ Genomic Elution Buffer dazu pipettiert und die Proben während 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben wiederum zentrifugiert, diesmal für 1.5 Minuten bei maximaler Umdrehung und Raumtemperatur. Um mehr DNA von der Membran zu lösen wurde den Auffanggefäßen nochmals Lösung entnommen und erneut auf die Membran aufgebracht. Danach wurden die Proben nochmals für 1.5 Minuten bei Raumtemperatur und maximaler Umdrehung zentrifugiert. Im Auffanggefäß befand sich nun die gelöste DNA.

2.2.4 DNA Amplifizierung mittels PCR

Um mehrfache Kopien der DNA-Abschnitte zu erhalten, auf denen sich die Sequenzen befinden die wir untersuchen wollten, führten wir eine PCR durch. Bei der PCR laufen im Prinzip immer drei gleiche Schritte hinter einander ab:

Denaturierung der DNA-Doppelstränge (jeweils bei 95°C)

Bindung der Oligonucleotide (15-25 Bp lange Oligonukleotide. Diese Oligonukleotide sind jeweils komplementär zu den zu amplifizierenden DNA-Abschnitten) an die durch Schritt 1 ent-

standenen Einzelstränge. Dieser Prozess wird als Annealing bezeichnet. Das Annealing erfolgte bei verschiedenen, vom Produkt abhängigen spezifischen Temperaturen.

Durch die DNA-Polymerase, enthalten im hergestellten PCR-Ansatz, erfolgt bei jeweils 72°C die Extension zu neuen Doppelsträngen.

Durch mehrfaches Wiederholen dieser Schritte ergibt sich eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA-Abschnitte.

2.2.4.1 PCR

Die PCR von Genabschnitten, welche die einzelnen Polymorphismen enthalten unterscheiden sich lediglich in den Temperaturen und den Primern, jedoch nicht im Ablauf. Daher erfolgen zuerst eine allgemeine Erklärung des Ablaufes und anschließend die Tabelle mit den jeweiligen spezifischen Temperaturen respektive Primern.

In einem ersten Schritt wurden jeweils 100 ng DNA mit 12,5µl Abgen Cybergren, 12,5 µl Wasser und 0,5 µl des jeweils enzyspezifischen forward Primer sowie 0,5 µl des enzyspezifischen reverse Primer zusammengemischt. Um sicher zu gehen dass die PCR-Ansätze keine Kontaminationen enthalten, wurde jeweils zur Kontrolle zusätzlich eine Leerprobe durchgeführt. In diesen Leerproben befand sich ebenfalls 12,5µl Abgen Cybergren, 12,5 µl Wasser und 0,5 µl forward Primer sowie 0,5 µl reverse Primer, jedoch keine DNA. Dementsprechend durfte bei diesen Proben kein Ergebnis in der auf die PCR folgenden Gelelektrophorese entstehen, ansonsten hätte man von einer Kontamination der Proben ausgehen müssen.

Die Proben wurden dann mitsamt der Leerprobe in den Thermocycler gestellt, wo dann die für den Polymorphismus spezifischen Programme abliefen. Die Programme sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Schritt Nr.	Temperatur in °C	Dauer	Vorgang
1	95	15 Minuten	Vorprogramm, Optimierung der Proben
2	95	30 Sekunden	Denaturierung
	63 für VKORC1 60 für GGCX 67 für FVII / APOE 55 für CYP4F2	30 Sekunden	Annealing
	72	30 Sekunden	Extension
Schritt Nr. 2 wird 2 mal hintereinander durchlaufen			
3	95	30 Sekunden	Denaturierung
	60 für VKORC1 57 für GGCX 64 für FVII / APOE 52 für CYP4F2	30 Sekunden	Annealing
	72	30 Sekunden	Extension
Schritt 3 wurde insgesamt 5 mal wiederholt			
4	95	30 Sekunden	Denaturierung
	57 für VKORC1 54 für GGCX 61 für FVII / APOE 49 für CYP4F2	30 Sekunden	Annealing
	72	30 Sekunden	Extension
Schritt 4 wurde 29 mal wiederholt			
5	72	5 Minuten	Zusammenlagern von eventuell noch frei gebliebenen Einzelsträngen
6	10	-	Pausenmodus

Tabelle 7: Überblick über die verwendeten Temperaturen und Anzahl der Zyklen bei der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) mit Erklärung der Vorgänge bei den jeweiligen Schritten.

2.2.5 Elektrophorese

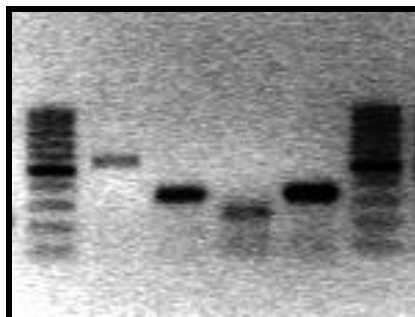
Mittels Gelelektrophorese erfolgte die Kontrolle der abgelaufenen PCR auf Reinheit der einzelnen Proben sowie die Überprüfung, ob genügend Produkt für eine Sequenzierung entstanden war.

Zur Herstellung des Gels wurde 1 %-ige Agarose TAE-Lösung aufgekocht und nach Erkalten auf 80 °C wurden 25 µl Ethidiumbromid (10mg/ml) zu 500 ml Agarose zugefügt. Von dieser Lösung wurden ca. 100 ml in eine Gießkammer gegossen, die notwendigen Kämme eingesetzt und so belassen, bis die Masse erstarrt war. Während die Masse abkühlte wurden jeweils 2 µl Ladepuffer zu 5 µl PCR-Produkt gegeben. Diese 7 µl wurden dann in die erstarrten Geltaschen eingebracht. Der Ladepuffer bewirkt, dass das Produkt in die Taschen absinkt. Nach Befüllen der Taschen wurde für 25 Minuten eine Spannung von 150V angelegt. Dies bewirkt, dass die negativ geladenen DNA-Moleküle zur Anode wandern. Je nach Größe der Moleküle wandern diese verschieden schnell im Gel.

Ethidiumbromid, ein Fluoreszenzfarbstoff, interkaliert zwischen den Basenpaaren so, dass die DNA im Gel durch Bestrahlung mit UV-Licht im UV-Transilluminator sichtbar gemacht werden kann.

Überall wo die PCR erfolgreich verlaufen war, konnte man die entsprechenden Banden im Gel sehen. Wichtig war ebenfalls der Leerwert. Hier durften keine Banden vorhanden sein, da dieser Ansatz keine DNA enthielt. Banden im Leerwert würden auf eine Kontamination der PCR-Ansätze hinweisen.

Zusätzlich wird als Kontrolle für das richtige PCR-Produkt ein Längenstandard in eine Tasche pipettiert.



Längenstandard Promotor

Längenstandard

Abbildung 5: Bildliche Veranschaulichung der Ergebnisse der Gelelektrophorese mit Längenstandard und Promotor

2.2.6 Vorbereitung des Sequenzieransatz

Nach erfolgreicher Gelelektrophorese wurde eine Reaktion zur Vorbereitung der Sequenzierung durchgeführt. Diese bewirkt, dass überschüssige Primer und dNTPs abgebaut werden, welche die nachfolgende Sequenzierreaktion stören würden.

Für eine Reaktion verwendeten wir pro Probe 0,25 µl Exonuklease, 1 µl FastAP, 0,4 µl Puffer und 2,35 µl Wasser. Dieser Ansatz wurde wiederum in den Thermocycler gegeben. Dieser wurde zuerst für 15 Minuten auf 37°C aufgewärmt und dann für weitere 15 Minuten auf 85°C aufgeheizt. Nach 30 Minuten sinkt die Temperatur auf 4°C.

2.2.7 Sequenzierreaktion

Die Sequenzierung erfolgt nach der Methode von Sanger. Die Sequenzierung verläuft ähnlich einer PCR. Sie enthält ebenfalls die Schritte Denaturierung, Primer-Anlagerung und Primer-Verlängerung. Anders als bei der PCR wird bei der Sequenzierung jedoch nur ein Primer und ein Mix aus dNTPs und fluoreszenzmarkierten ddNTPs verwendet. Die ddNTPs enthalten am C3 des Desoxyribose Kohlenstoffgerüsts ein Wasserstoffatom anstelle einer Hydroxy-Gruppe. Durch diese Wasserstoffatome kann keine Phosphatbrückenbindung entstehen, wodurch es zur Beendigung der Strangbildung an dieser Stelle kommt. Da die ddNTPs an verschiedenen Stellen eingebaut werden, entstehen verschieden große DNA-Produkte. Diese DNA-Fragmente können mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und die endständigen ddNTPs über einen daran gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff detektiert werden. Als Ergebnis entsteht ein Chromatogramm, welches die Basenabfolge des sequenzierten Stranges als Abfolge von Fluoreszenzmaxima wiedergibt.

Für die Sequenzierreaktion wurden zu 2,5 µl aufgereinigtem PCR-Produkt noch 6,5 µl Wasser, 1,5 µl 5mal Sequenzierpuffer, 0,5 µl Ready Mix und 0,6 µl forward Primer gegeben. Dieser Mix wurde bei folgenden Temperaturen in den Thermocycler gegeben: 96°C während 1 Minute, danach 96°C während 10 Sekunden, anschließend 50°C während 5 Sekunden, darauf folgten 60°C während 4 Minuten. Dieser Vorgang wird ab Schritt 2 45mal wiederholt, danach kühlt der Sequenzer auf 4°C ab.

2.2.8 Ethanol – Acetat - Fällung

Um überschüssige ddNTPs und Primer zu entfernen wurde das Produkt der Sequenzierungsreaktion mit EtOH-Acetat-Lösung gefällt. Dazu wird zu jedem Sequenzierungsprodukt 62 μ l EtOH-Acetat-Lösung, bestehend aus 10 μ l Wasser, 50 μ l 100 % Ethanol und 2 μ l 3 molarer Na-Acetat Lösung, hinzugefügt und dieser Mix für 45 Minuten bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Nach erfolgter Zentrifugation wurden die Reaktionsansätze auf Zellstoff ausgeklopft und dann mit dem Boden nach oben bei 1000 rpm zentrifugiert. Die entstandenen Pellets wurden mit 200 μ l 70 %-igem EtOH gewaschen und für 10 Minuten bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Danach wurden die Überstände erneut ausgeklopft und das Produkt zum Trocknen 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Pellet in 15 μ l HiDi Formamid resuspendiert.

2.2.9 Sequenzierung

Der Sequenzier-Automat analysierte die Sequenzierungsprodukte nun nach der unter 2.2.5 aufgeführten Methode. Dabei werden die entstandenen Kettenabbruchprodukte ihrer Größe nach jeweils eine Base aufsteigend mittels Kapillarelektrophorese getrennt. Die ddNTPs am Ende der DNA-Fragmente werden mittels Fluoreszenzdedektor analysiert. Die damit detektierte Fluoreszenzabfolge ergibt ein Chromatogramm der Basensequenz des DNA-Stranges. Für die Genotypenermittlung konnte dann an der jeweils spezifischen Stelle die Basenkombination anhand der Kurvenhöhe und Kurvenfarbe abgelesen und somit ermittelt werden, ob die Probe eine Basensubstitution aufweist oder nicht.

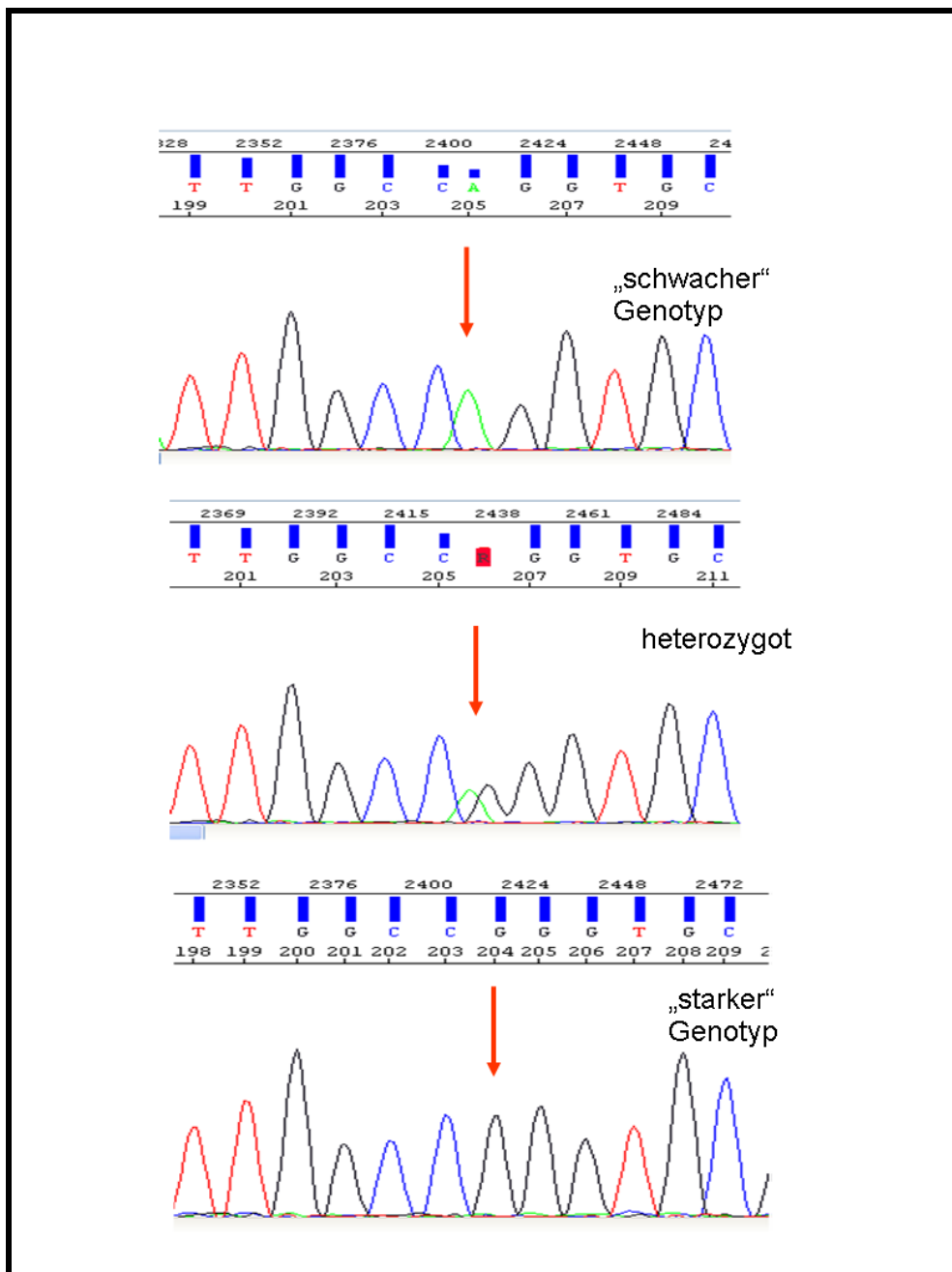


Abbildung 6: Beispielhafte Veranschaulichung der erhaltenen Sequenzen anhand der VKORC1.

2.3 Statistik

Das Studiendesign sowie der statistische Teil der Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Rolf Fimmers, Leiter der Abteilung Biometrie des Institut für Medizinische Biometrie und Informatik des Universitätsklinikum Bonn ausgearbeitet.

Die Studie wurde in Form einer prospektiven, monozentrischen Pilotstudie mit statistischer

Zwischenauswertung konzipiert. Auf eine multizentrische Studie wurde bewusst verzichtet um ein unterschiedliches perinatales Management und postnatale Versorgung (Beatmungsmuster, Infektionsmanagement) als mögliche sekundäre Einflussfaktoren auf die Entwicklung einer IVH auszuschließen.

Nach 53 analysierten Proben erfolgte die geplante Zwischenauswertung der Studie um die Ergebnisse auf Tendenz hin zu untersuchen. Bei dieser Auswertung wurden statistisch signifikante Unterschiede bezüglich dem Auftreten und dem Ausmass einer Hirnblutung, sowie dem Polymorphismus der γ -Carboxylase festgestellt (Suter et al., 2009). Um die Stabilität dieser Ergebnisse zu prüfen und insbesondere die Bedeutung der Fallzahl zu prüfen (53 Proben, davon 12 von Kindern mit einer Hirnblutung) wurde im 2. Teil der Studie die Reproduktion der Ergebnisse angestrebt. Dies erfolgt in Form einer zweiten Gruppe, die unter identischen Bedingungen erarbeitet wurde. In der zweiten Gruppe wurden insgesamt 57 Proben analysiert.

2.3.1 Statistische Grundlagen

Die von uns ermittelten Daten bezüglich der Polymorphismen wurden in Form von Kontingenz- und Vierfeldertafeln dargestellt. Mittels dieser Tabellen konnte das jeweilige χ^2 ermittelt und über dieses der entsprechende p-Wert berechnet werden. Als statistisch signifikanter Unterschied zwischen den jeweils verglichenen Gruppen wurde ein Signifikanzniveau mit einem p-Wert < 0,05 definiert.

Bei bekannter Allelverteilung kann mit Hilfe des Hardy-Weinberg Gesetzes die erwartete Genotypenverteilung berechnet werden. Dabei werden den beiden Allelen die Buchstaben p (Allel 1) und q (Allel 2) zugeordnet. Der Formel zufolge gilt folgendes Gesetz: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. Da p dem Allel 1 zugeordnet ist, steht p^2 für den Wildtyp mit der Allelverteilung 1/1. $2pq$ entspricht dem heterozygoten Genotypen mit den Allelen 1/2 und q^2 für die homozygote Mutation mit dem Genotyp 2/2.

Des Weiteren führten wir einen Gruppenvergleich zwischen Patienten mit einer IVH und Patienten ohne IVH bezüglich der erhobenen klinischen und laborchemischen Parameter wie zum Beispiel initiale Hb Konzentration, APGAR Werte nach 1,5 und 10 Minuten mittels Mann-Whitney U-Test und Vierfeldertafel durch. Im Rahmen einer binär logistischen Regressionsanalyse wurden signifikant assoziierte Variablen auf ihre Unabhängigkeit hin geprüft. Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Statistiksoftware Programms SPSS 11.5 durchgeführt

(SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

2.4 Ethik

Das Studienprotokoll wurde am 14.4.2008 von der Ethikkommission der Universität Bonn genehmigt (Nr. 084/08).

Alle Erziehungsberechtigten wurden mündlich und schriftlich über die Untersuchung aufgeklärt und bei Teilnahme an der Studie gebeten, ihre Einwilligung schriftlich auf dem Einwilligungsbogen zu dokumentieren. Da es sich um eine rein wissenschaftliche Untersuchung handelte, wurde mit den Eltern keine Rücksprache bezüglich den Genotypen gehalten. Somit wurde gewährleistet dass das Selbstbestimmungsrecht des Kindes zu keiner Zeit verletzt oder gefährdet war. Auch dieser Punkt wurde schriftlich in der Einwilligungserklärung festgehalten.

Sämtliche Daten wurden vertraulich behandelt. Die Untersuchung der Proben im Labor erfolgte pseudonymisiert. Zu jedem Zeitpunkt der Studie wurde gewährleistet, dass die im Rahmen der wissenschaftlichen Arbeit erhobenen personenbezogenen Daten nicht an Dritte weitergegeben wurden. Bei einer Veröffentlichung der Ergebnisse sollte aus den Daten nicht hervorgehen, wer an dieser Untersuchung teilgenommen hat. Auch eine Zuordnung der Daten zu den einzelnen Patienten sollte nicht aus der Arbeit hervorgehen. Alle im Rahmen der Studie erhobenen Daten unterliegen dem Datenschutzgesetz.

3. Ergebnisse

3.1 Studienkollektiv

Insgesamt bestand unser Patientenkollektiv aus 110 Frühgeborenen < 32 SSW. Für die Gene der GGCX, FVII, CYP4F2 und ApoE konnten wir jeweils alle 110 Proben auswerten. Bei der VKORC1 konnten 4 Proben auch nach mehrmaligem Versuch nicht ausgewertet werden, sodass 106 Proben analysiert wurden.

Da kein signifikanter Unterschied in der Genotypenverteilung der beiden Studienphasen bestand werden die Ergebnisse in einer Gesamtgruppe zusammengefasst dargestellt. Zusätzlich analysierten wir einen möglichen Einfluss des Geschlechtes, indem wir die Proben nach dem Geschlecht in zwei Gruppen trennten.

	Genotyp	Mädchen	Jungen	Mädchen und Jungen
GGCX	1/1	15 (42,9 %)	35 (46,7 %)	50 (45,5 %)
	1/2	17 (48,5 %)	30 (40 %)	47 (42,7 %)
	2/2	3 (8,6 %)	10 (13,3 %)	13 (11,8 %)
Insgesamt		35 (100 %)	75 (100 %)	110 (100 %)

Tabelle 8: Absolute und relative Genotypenverteilung in der Studiengruppe bezogen auf Gammacarboxylase

	Genotyp	Mädchen	Jungen	Mädchen und Jungen
VKORC1	1/1	10 (29,4 %)	29 (40,3 %)	39 (36,8 %)
	1/2	17 (50 %)	35 (48,6 %)	52 (49,1 %)
	2/2	7 (20,6 %)	8 (11,1 %)	15 (14,1 %)
Insgesamt		34 (100 %)	72 (100 %)	106 (100 %)

Tabelle 9: Absolute und relative Genotypenverteilung in der Studiengruppe bezogen auf VKORC1

	Genotyp	Mädchen	Jungen	Mädchen und Jungen
Faktor VII Promotor	1/1	27 (77,1 %)	56 (74,7 %)	83 (75,5 %)
	1/2	8 (22,9 %)	18 (24 %)	26 (23,6 %)
	2/2	0	1 (1,3 %)	1 (0,9 %)
Insgesamt		35 (100 %)	75 (100 %)	110 (100 %)

Tabelle 10: Absolute und relative Genotypenverteilung in der Studiengruppe bezogen auf Faktor VII

	Genotyp	Mädchen	Jungen	Mädchen und Jungen
CYP4F2	1/1	28 (80 %)	42 (56 %)	66 (60 %)
	1/2	12 (20 %)	28 (37,3 %)	40 (36,4 %)
	2/2	0	5 (6,7 %)	4 (3,6 %)
Insgesamt		35 (100 %)	75 (100 %)	110 (100 %)

Tabelle 11: Absolute und relative Genotypenverteilung in der Studiengruppe bezogen auf CYP4F2

	Genotyp	Mädchen	Jungen	Mädchen und Jungen
ApoE Gruppe 1 (n=41)	E2/E2	0	0	0
	E2/E3	4 (11,4 %)	9 (12 %)	13 (11,8 %)
	E3/E3	25 (71,5 %)	49 (65,3 %)	75 (68,2 %)
	E3/E4	6 (17,1 %)	14 (18,7 %)	19 (17,3 %)
	E4/E4	0	3 (4 %)	3 (2,7 %)
	E4/E2	0	0	0
Insgesamt		35 (100 %)	75 (100 %)	110 (100 %)

Tabelle 12: Absolute und relative Genotypenverteilung in der Studiengruppe bezogen auf ApoE

3.2 Studienkollektiv versus Referenzgruppe

3.2.1 Vergleich der Genotypenverteilung im Studienkollektiv und Referenzgruppe

Im folgenden Abschnitt vergleichen wir unser Studienkollektiv mit der Referenzgruppe. Dabei konnten wir keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Genotypenverteilung der untersuchten Genpolymorphismen nachweisen.

	Genotyp	Studienkollektiv	Referenzgruppe
GGCX	1/1	50 (45,5 %)	112 (45 %)
	1/2	47 (42,7 %)	110 (44 %)
	2/2	13 (11,8 %)	28 (11 %)
Insgesamt		110 (100 %)	250 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,97	

Tabelle 13: Vergleich der Genotypenverteilung im Studienkollektiv und der Referenzgruppe in absoluten und relativen Anteilen bezogen auf Gammacarboxylase

	Genotyp	Studienkollektiv	Referenzgruppe
VKORC1	1/1	39 (36,8 %)	69 (34,5 %)
	1/2	52 (49,1 %)	96 (45 %)
	2/2	15 (14,1 %)	35 (17,5 %)
Insgesamt		106 (100 %)	200 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,74	

Tabelle 14: Vergleich der Genotypenverteilung im Studienkollektiv und der Referenzgruppe in absoluten und relativen Anteilen bezogen auf VKORC1

	Genotyp	Studienkollektiv	Referenzgruppe
Faktor VII Promotor	1/1	83 (75,5 %)	185 (74 %)
	1/2	26 (23,6 %)	57 (22,8 %)
	2/2	1 (0,9 %)	8 (3,2 %)
Insgesamt		110 (100 %)	250 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,44	

Tabelle 15: Vergleich der Genotypenverteilung im Studienkollektiv und der Referenzgruppe in absoluten und relativen Anteilen bezogen auf Faktor VII

	Genotyp	Studienkollektiv	Referenzgruppe
CYP4F2	1/1	66 (60 %)	67 (53,6 %)
	1/2	40 (36,4 %)	51 (40,8 %)
	2/2	4 (3,6 %)	7 (5,6 %)
Insgesamt		110 (100 %)	125 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,55	

Tabelle 16: Vergleich der Genotypenverteilung im Studienkollektiv und der Referenzgruppe in absoluten und relativen Anteilen bezogen auf CYP4F2

	Genotyp	Studienkollektiv	Referenzgruppe
ApoE	E2/E2	0	3 (1 %)
	E2/E3	13 (11,8 %)	28 (11 %)
	E3/E3	75 (68,2 %)	158 (63 %)
	E3/E4	19 (17,3 %)	50 (20 %)
	E4/E4	3 (2,7 %)	5 (2 %)
	E2/E4	0	8 (3 %)
Insgesamt		110 (100 %)	252 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,16	

Tabelle 17: Vergleich der Genotypenverteilung im Studienkollektiv und der Referenzgruppe in absoluten und relativen Anteilen bezogen auf ApoE

3.2.2 Vergleich der Studienuntergruppe Nicht-IVH mit der Referenzgruppe

In diesem Abschnitt stellen wir die Nicht-IVH Gruppe der Referenzgruppe (=gesunde Blutspender) gegenüber. Sollte die Genotypenverteilung der Nicht-IVH Gruppe dem der Referenzgruppe entsprechen, so kann die Nicht-IVH Gruppe im Weiteren als Vergleich zu der IVH Gruppe dienen.

	Genotyp	Nicht-IVH Gruppe	Referenzgruppe
GGCX	1/1	37 (43 %)	112 (45 %)
	1/2	40 (46,5 %)	110 (44 %)
	2/2	9 (10,5 %)	28 (11 %)
Insgesamt		86 (100 %)	250 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,92	

Tabelle 18: Darstellung der absoluten und relativen Genotypenverteilung in der Nicht-IVH Gruppe und der Referenzgruppe bezogen auf Gammacarboxylase

	Genotyp	Nicht-IVH Gruppe	Referenzgruppe
VKORC1	1/1	29 (35,4 %)	69 (34,5 %)
	1/2	45 (54,9 %)	96 (45 %)
	2/2	8 (9,7 %)	35 (17,5 %)
Insgesamt		82 (100 %)	200 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,241	

Tabelle 19: Darstellung der absoluten und relativen Genotypenverteilung in der Nicht-IVH Gruppe und der Referenzgruppe bezogen auf VKORC1

	Genotyp	Nicht-IVH Gruppe	Referenzgruppe
Faktor VII Promotor	1/1	66 (76,7 %)	185 (74 %)
	1/2	19 (22,1 %)	57 (22,8 %)
	2/2	1 (1,2 %)	8 (3,2 %)
Insgesamt		86 (100 %)	250 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,586	

Tabelle 20: Darstellung der absoluten und relativen Genotypenverteilung in der Nicht-IVH Gruppe und der Referenzgruppe bezogen auf Faktor VII

	Genotyp	Nicht-IVH Gruppe	Referenzgruppe
CYP4F2	1/1	52 (60,5 %)	67 (53,6 %)
	1/2	32 (37,2 %)	51 (40,8 %)
	2/2	2 (2,3 %)	7 (5,6 %)
Insgesamt		86 (100 %)	125 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,392	

Tabelle 21: Darstellung der absoluten und relativen Genotypenverteilung in der Nicht-IVH Gruppe und der Referenzgruppe bezogen auf CYP4F2

	Genotyp	Nicht-IVH Gruppe	Referenzgruppe
ApoE	E2/E2	0	3 (1 %)
	E2/E3	8 (9,3 %)	28 (11 %)
	E3/E3	61 (70,9 %)	158 (63 %)
	E3/E4	15 (17,5 %)	50 (20 %)
	E4/E4	2 (2,3 %)	5 (2 %)
	E2/E4	0	8 (3 %)
Insgesamt		86 (100 %)	252 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,435	

Tabelle 22: Darstellung der absoluten und relativen Genotypenverteilung in der Nicht-IVH Gruppe und der Referenzgruppe bezogen auf ApoE

3.2.3 Allelverteilung Nicht-IVH Gruppe versus Referenzgruppe

Im folgenden Abschnitt werden die Allelverteilungen der Nicht-IVH Gruppe mit den Allelverteilungen der Referenzgruppe verglichen. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden.

	Allel	Nicht-IVH Gruppe	Referenzgruppe
GGCX	1	114 (66,3 %)	334 (66,8 %)
	2	58 (33,7 %)	166 (33,2 %)
Insgesamt		172 (100 %)	500 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,975	

Tabelle 23: Allelverteilungen in der Nicht-IVH Gruppe verglichen mit der Referenzgruppe bezogen auf Gammacarboxylase

	Allel	Nicht-IVH Gruppe	Referenzgruppe
VKORC1	1	103 (62,8 %)	234 (58,5 %)
	2	61 (37,2 %)	166 (41,5 %)
Insgesamt		164 (100 %)	400 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,394	

Tabelle 24: Allelverteilungen in der Nicht-IVH Gruppe verglichen mit der Referenzgruppe bezogen auf VKORC1

	Allel	Nicht-IVH Gruppe	Referenzgruppe
Faktor VII Promotor	1	151 (87,8 %)	427 (85,4 %)
	2	21 (12,2 %)	73 (14,6 %)
Insgesamt		172 (100 %)	500 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,514	

Tabelle 25: Allelverteilungen in der Nicht-IVH Gruppe verglichen mit der Referenzgruppe bezogen auf Faktor VII

	Allel	Nicht-IVH Gruppe	Referenzgruppe
CYP4F2	1	136 (79,1 %)	185 (74 %)
	2	36 (20,9 %)	65 (26 %)
Insgesamt		172 (100 %)	250 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,279	

Tabelle 26: Allelverteilungen in der Nicht-IVH Gruppe verglichen mit der Referenzgruppe bezogen auf CYP4F2

	Allel	Nicht-IVH Gruppe	Referenzgruppe
APOE	E2	8 (4,7 %)	42 (8,3 %)
	E3	145 (84,3 %)	394 (78,2 %)
	E4	19 (11 %)	68 (13,5 %)
Insgesamt		172 (100 %)	504 (100 %)
Über χ^2 -Test errechnetes p		0,169	

Tabelle 27: Allelverteilungen in der Nicht-IVH Gruppe verglichen mit der Referenzgruppe bezogen auf ApoE

3.2.4 Berechnung der erwarteten Genotypenverteilung aus Abschnitt 3.4 mittels Hardy-Weinberg Gesetz

Mittels Anwendung des Hardy-Weinberg Gesetzes lässt sich über die im Abschnitt 3.4 aufgeführten Allelverteilungen die erwarteten Genotypenverteilungen in der Kontrollgruppe berechnen. Diese errechneten Erwartungswerte werden dann den tatsächlich ermittelten Werten der Kontrollgruppe gegenüber gestellt.

Ob zwischen Erwartungswert und tatsächlichem Wert ein statistisch signifikanter Unterschied besteht wird mittels χ^2 -Test und dem daraus ermittelten p überprüft. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Hardy-Weinberg Gesetz

Erwartete Genotypenverteilung

in der Kontrollgruppe

$p^2=(0,663)^2$	GGCX 1/1	43,9 %	<i>dies entspräche 38 von 86 Patienten</i>
$2pq=2 \times 0,663 \times 0,337$	GGCX 1/2	44,7 %	<i>dies entspräche 38 von 86 Patienten</i>
$q^2=(0,337)^2$	GGCX 2/2	11,4 %	<i>dies entspräche 10 von 86 Patienten</i>

Genotyp		Ermittelte Genotypenverteilung	Erwartete Genotypenverteilung
GGCX	1/1	37	38
	1/2	40	38
	2/2	9	10
Insgesamt		86	86
Über χ^2 -Test errechnetes p		0,943	

Tabelle 28: Ermittelte Genotypenverteilung in der Kontrollgruppe gegenüber der erwarteten Genotypenverteilung des CGCX Genpolymorphismus

Hardy-Weinberg Gesetz

$$p^2=(0,628)^2$$

VKORC1 1/1 39,5 %

$$2pq=2 \times 0,628 \times 0,372$$

VKORC1 1/2 46,7 %

$$q^2=(0,372)^2$$

VKORC1 2/2 13,8 %

Erwartete Genotypenverteilung

in der Kontrollgruppe

dies entspräche 33 von 82 Patienten

dies entspräche 38 von 82 Patienten

dies entspräche 11 von 82 Patienten

Genotyp		Ermittelte Genotypenverteilung	Erwartete Genotypenverteilung
VKORC1	1/1	29	33
	1/2	45	38
	2/2	8	11
Insgesamt		82	82
Über χ^2 -Test errechnetes p		0,516	

Tabelle 29: Ermittelte Genotypenverteilung in der Kontrollgruppe gegenüber der erwarteten Genotypenverteilung des VKORC1 Genpolymorphismus

Hardy-Weinberg Gesetz

$$p^2=(0,878)^2$$

Faktor VII 1/1 77,1 %

$$2pq=2 \times 0,878 \times 0,122$$

Faktor VII 1/2 21,4 %

$$q^2=(0,122)^2$$

Faktor VII 2/2 1,5 %

Erwartete Genotypenverteilung

in der Kontrollgruppe

dies entspräche 66 von 86 Patienten

dies entspräche 19 von 86 Patienten

dies entspräche 1 von 86 Patienten

	Genotyp	Ermittelte Genotypenverteilung	Erwartete Genotypenverteilung
Faktor VII Promotor	1/1	66	66
	1/2	19	19
	2/2	1	1
Insgesamt		86	86
Über χ^2-Test errechnetes p		1	

Tabelle 30: Ermittelte Genotypenverteilung in der Kontrollgruppe gegenüber der erwarteten Genotypenverteilung des Faktor VII Promotor Genpolymorphismus

Hardy-Weinberg Gesetz

$$p^2 = (0,791)^2 \quad \text{CYP4F2 1/1} \quad 62,6 \%$$

$$2pq = 2 \times 0,791 \times 0,209 \quad \text{CYP4F2 1/2} \quad 33 \%$$

$$q^2 = (0,209)^2 \quad \text{CYP4F2 2/2} \quad 4,4 \%$$

Erwartete Genotypenverteilung

in der Kontrollgruppe

dies entspräche 54 von 86 Patienten

dies entspräche 28 von 86 Patienten

dies entspräche 4 von 86 Patienten

	Genotyp	Ermittelte Genotypenverteilung	Erwartete Genotypenverteilung
CYP4F2	1/1	52	54
	1/2	32	28
	2/2	2	4
Insgesamt		86	86
Über χ^2-Test errechnetes p		0,615	

Tabelle 31: Ermittelte Genotypenverteilung in der Kontrollgruppe gegenüber der erwarteten Genotypenverteilung des CYP4F2 Genpolymorphismus

3.3 IVH Gruppe versus Nicht-IVH Gruppe

3.3.1 Vergleich der Genotypenverteilung in der Nicht IVH-Gruppe und der IVH-Gruppe (I-IV°)

Von den 110 untersuchten Proben des Studienkollektives waren 24 von Patienten die eine IVH I-IV° entwickelten. Die Genotypenhäufigkeiten werden entsprechend der Gruppeneinteilung Nicht-IVH-Gruppe und IVH-Gruppe (I-IV°) der Referenzgruppe gegenübergestellt. Zwischen der Referenzgruppe und dem Studienkollektiv getrennt nach Nicht-IVH und IVH I-IV° konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

	Genotyp	Nicht IVH-Gruppe	IVH-Gruppe
GGCX	1/1	37 (43 %)	12 (50 %)
	1/2	40 (46,5 %)	8 (33,3 %)
	2/2	9 (10,5 %)	4 (16,7 %)
Insgesamt		86 (100 %)	24 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,458	

Tabelle 32: Vergleich der absoluten und relativen Genotypenverteilung in der Nicht IVH- und der IVH-Gruppe bezogen auf Gammacarboxylase

	Genotyp	Nicht IVH-Gruppe	IVH-Gruppe
VKORC1	1/1	29 (35,4 %)	6 (25 %)
	1/2	45 (54,9 %)	15 (62,5 %)
	2/2	8 (9,7 %)	3 (12,5 %)
Insgesamt		82 (100 %)	24 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,628	

Tabelle 33: Vergleich der absoluten und relativen Genotypenverteilung in der Nicht IVH- und der IVH-Gruppe bezogen auf VKORC1

	Genotyp	Nicht IVH-Gruppe	IVH-Gruppe
Faktor VII Promotor	1/1	66 (76,7 %)	17 (70,8 %)
	1/2	19 (22,1 %)	7 (29,2 %)
	2/2	1 (1,2 %)	0
Insgesamt		86 (100 %)	24 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,683	

Tabelle 34: Vergleich der absoluten und relativen Genotypenverteilung in der Nicht IVH- und der IVH-Gruppe bezogen auf Faktor VII

	Genotyp	Nicht IVH-Gruppe	IVH-Gruppe
CYP4F2	1/1	52 (60,5 %)	14 (58,3 %)
	1/2	32 (37,2 %)	8 (33,3 %)
	2/2	2 (2,3 %)	2 (8,3 %)
Insgesamt		86 (100 %)	24 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,376	

Tabelle 35: Vergleich der absoluten und relativen Genotypenverteilung in der Nicht IVH- und der IVH-Gruppe bezogen auf CYP4F2

	Genotyp	Nicht IVH-Gruppe	IVH-Gruppe
ApoE	E2/E2	0	0
	E2/E3	8 (9,3 %)	5 (20,8 %)
	E3/E3	61 (70,9 %)	14 (58,3 %)
	E3/E4	15 (17,5 %)	4 (16,7 %)
	E4/E4	2 (2,3 %)	1 (4,2 %)
	E2/E4	0	0
Insgesamt		86 (100 %)	24 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		1	

Tabelle 36: Vergleich der absoluten und relativen Genotypenverteilung in der Nicht IVH- und der IVH-Gruppe bezogen auf Gammacarboxylase

3.3.2 Vergleich der Allelverteilung im Studienkollektiv mit einer IVH (I-IV°) und der Referenzgruppe

Die Allelverteilungen in der Studienkollektiv Untergruppe mit IVH werden mit der Allelverteilung der Referenzgruppe verglichen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Allelverteilung ermittelt werden.

	Allel	Nicht IVH-Gruppe	IVH-Gruppe
GGCX	1	114 (66,3 %)	32 (66,7 %)
	2	58 (33,7 %)	16 (33,3 %)
Insgesamt		172 (100 %)	48 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,903	

Tabelle 37: Gegenüberstellung der Allelverteilungen in den beiden Gruppen Nicht IVH und IVH in absoluten und relativen Häufigkeiten bezogen auf Gammacarboxylase

	Allel	Nicht IVH-Gruppe	IVH-Gruppe
VKORC1	1	103 (62,8 %)	27 (56,3 %)
	2	61 (37,2 %)	21 (43,7 %)
Insgesamt		164 (100 %)	48 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,515	

Tabelle 38: Gegenüberstellung der Allelverteilungen in den beiden Gruppen Nicht IVH und IVH in absoluten und relativen Häufigkeiten bezogen auf VKOR1

	Allel	Nicht IVH-Gruppe	IVH-Gruppe
Faktor VII Promotor	1	151 (87,8 %)	41 (85,1 %)
	2	21 (12,2 %)	7 (14,6 %)
Insgesamt		172 (100 %)	48 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,848	

Tabelle 39: Gegenüberstellung der Allelverteilungen in den beiden Gruppen Nicht IVH und IVH in absoluten und relativen Häufigkeiten bezogen auf Faktor VII

	Allel	Nicht IVH-Gruppe	IVH-Gruppe
CYP4F2	1	136 (79,1 %)	36 (75 %)
	2	36 (20,9 %)	12 (25 %)
Insgesamt		172 (100 %)	48 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,685	

Tabelle 40: Gegenüberstellung der Allelverteilungen in den beiden Gruppen Nicht IVH und IVH in absoluten und relativen Häufigkeiten bezogen auf CYP4F2

	Allel	Nicht IVH-Gruppe	IVH-Gruppe
ApoE	E2	8 (4,7 %)	5 (10,4 %)
	E3	145 (84,3 %)	37 (77,1 %)
	E4	19 (11 %)	6 (12,5 %)
Insgesamt		172 (100 %)	48 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,299	

Tabelle 41: Gegenüberstellung der Allelverteilungen in den beiden Gruppen Nicht IVH und IVH in absoluten und relativen Häufigkeiten bezogen auf ApoE

3.3.3 Berechnung der erwarteten Genotypenverteilungen in der IVH Studiengruppe (I-IV°) und Vergleich dieser Erwartungswerte mit den ermittelten Werten

Die erwarteten Werte werden mittels Hardy-Weinberg Gesetz berechnet. Dazu dienen die in Abschnitt 3.7 errechneten Allelverteilungen.

Die erwarteten Genotypenverteilungen werden dann mit den tatsächlich ermittelten Werten verglichen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede berechnet werden.

Hardy-Weinberg Gesetz

$p^2=(0,667)^2$ GGCX 1/1 44,5 %

$2pq=2 \times 0,667 \times 0,333$ GGCX 1/2 44,4 %

$q^2=(0,333)^2$ GGCX 2/2 11,1 %

Erwartete Genotypenverteilung

in der Kontrollgruppe

dies entspräche 11 von 24 Patienten

dies entspräche 11 von 24 Patienten

dies entspräche 2 von 24 Patienten

Genotyp		Ermittelte Genotypenverteilung	Erwartete Genotypenverteilung
GGCX	1/1	12	11
	1/2	8	11
	2/2	4	2
Insgesamt		24	24
Über χ^2 -Test errechnetes p		0,533	

Tabelle 42: Ermittelte Genotypenverteilung in der Kontrollgruppe gegenüber der erwarteten Genotypenverteilung des GGCX Genpolymorphismus

Hardy-Weinberg Gesetz

$$p^2=(0,563)^2$$

$$2pq=2 \times 0,563 \times 0,437$$

$$q^2=(0,437)^2$$

VKORC1 1/1 31,7 %

VKORC1 1/2 49 %

VKORC1 2/2 19,1 %

Erwartete Genotypenverteilung

in der Kontrollgruppe

dies entspräche 8 von 24 Patienten

dies entspräche 12 von 24 Patienten

dies entspräche 4 von 24 Patienten

Genotyp		Ermittelte Genotypenverteilung	Erwartete Genotypenverteilung
VKORC1	1/1	6	8
	1/2	15	12
	2/2	3	4
Insgesamt		24	24
Über χ^2 -Test errechnetes p		0,643	

Tabelle 43: Ermittelte Genotypenverteilung in der Kontrollgruppe gegenüber der erwarteten Genotypenverteilung des VKORC1 Genpolymorphismus

Hardy-Weinberg Gesetz

$$p^2=(0,851)^2$$

$$2pq=2 \times 0,851 \times 0,146$$

$$q^2=(0,146)^2$$

Faktor VII 1/1 72,4 %

Faktor VII 1/2 24,8 %

Faktor VII 2/2 2,1 %

Erwartete Genotypenverteilung

in der Kontrollgruppe

dies entspräche 17 von 24 Patienten

dies entspräche 6 von 24 Patienten

dies entspräche 1 von 24 Patienten

	Genotyp	Ermittelte Genotypenverteilung	Erwartete Genotypenverteilung
Faktor VII Promotor	1/1	17	17
	1/2	7	6
	2/2	0	1
Insgesamt		24	24
Über χ^2-Test errechnetes p		0,58	

Tabelle 44: Ermittelte Genotypenverteilung in der Kontrollgruppe gegenüber der erwarteten Genotypenverteilung des Faktor VII Promotor Genpolymorphismus

Hardy-Weinberg Gesetz

*Erwartete Genotypenverteilung
in der Kontrollgruppe*

$p^2=(0,75)^2$	CYP4F2 1/1	56,25 %	<i>dies entspräche 13 von 24 Patienten</i>
$2pq=2 \times 0,75 \times 0,25$	CYP4F2 1/2	37,5 %	<i>dies entspräche 9 von 24 Patienten</i>
$q^2=(0,25)^2$	CYP4F2 2/2	6,25 %	<i>dies entspräche 2 von 24 Patienten</i>

	Genotyp	Ermittelte Genotypenverteilung	Erwartete Genotypenverteilung
CYP4F2	1/1	14	13
	1/2	8	9
	2/2	2	2
Insgesamt		24	24
Über χ^2-Test errechnetes p		0,95	

Tabelle 45: Ermittelte Genotypenverteilung in der Kontrollgruppe gegenüber der erwarteten Genotypenverteilung des VKORC1 Genpolymorphismus CYP4F23.4 IVH Gruppe schwere Blutung versus Nicht-IVH Gruppe

3.4.1 Gegenüberstellung der Genotypenverteilung in der Studienuntergruppe mit einer schweren IVH (III-IV°) und der Nicht-IVH Gruppe

12 Studienteilnehmer erlitten eine schwere Hirnblutung (III-IV°). Die Genotypen dieser 12

Patienten werden ebenfalls mit der Genotypenverteilung in der Nicht-IVH Gruppe verglichen. Bei der Analyse des γ -Carboxylase Genpolymorphismus war in der Zwischenauswertung (n=53) ein signifikanter Unterschied in der Genotypenverteilung im Vergleich von Nicht-IVH Gruppe und Schwere IVH Gruppe aufgetreten. Dieser Unterschied ließ sich weder im zweiten Teil der Untersuchung noch in der Darstellung des Gesamtstudienkollektivs reproduzieren. Bei allen anderen untersuchten Polymorphismen konnte in der Zwischenauswertung kein signifikanter Unterschied in der Genotypenverteilung beschrieben werden, weshalb hier im Folgenden die Gesamtgruppen dargestellt werden.

	Genotyp	Nicht IVH-Gruppe	IVH schwer („Zwischenauswertung“)
GGCX	1/1	37 (43 %)	1 (20 %)
	1/2	40 (46,5 %)	1 (20 %)
	2/2	9 (10,5 %)	3 (60 %)
Insgesamt		86 (100 %)	5 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,006	

Tabelle 46: Darstellung der Genotypenverteilung in der Nicht IVH-Gruppe und der Gruppe mit einer schweren IVH (III-IV°) bezogen auf Gammacarboxylase in der Zwischenauswertung

	Genotyp	Nicht-IVH Gruppe	IVH schwer („Endauswertung“)
GGCX	1/1	37 (43 %)	5 (71,4 %)
	1/2	40 (46,5 %)	2 (28,6 %)
	2/2	9 (10,5 %)	0
Insgesamt		86 (100 %)	7 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,309	

Tabelle 47: Darstellung der Genotypenverteilung in der Nicht IVH-Gruppe und der Gruppe mit einer schweren IVH (III-IV°) bezogen auf Cammacarboxylase in der Endauswertung

	Genotyp	Nicht-IVH Gruppe	IVH schwer (Gesamtgruppe)
GGCX	1/1	37 (43 %)	6 (50 %)
	1/2	40 (46,5 %)	3 (25 %)
	2/2	9 (10,5 %)	3 (25 %)
Insgesamt		86 (100 %)	12 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,218	

Tabelle 48: Darstellung der Genotypenverteilung in der Nicht IVH-Gruppe und der Gruppe mit einer schweren IVH (III-IV°) bezogen auf Cammacarboxylase in der Gesamtgruppe

	Genotyp	Nicht-IVH Gruppe	IVH schwer
VKORC1	1/1	29 (35,4 %)	7 (58,3 %)
	1/2	45 (54,9 %)	5 (41,7 %)
	2/2	8 (9,7 %)	0
Insgesamt		82 (100 %)	12 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,228	

Tabelle 49: Darstellung der Genotypenverteilung in der Nicht IVH-Gruppe und der Gruppe mit einer schweren IVH (III-IV°) bezogen auf VKORC1

	Genotyp	Nicht-IVH Gruppe	IVH schwer
Faktor VII Promotor	1/1	66 (76,7 %)	8 (66,7 %)
	1/2	19 (22,1 %)	4 (33,3 %)
	2/2	1 (1,2 %)	0
Insgesamt		86 (100 %)	12 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,654	

Tabelle 50: Darstellung der Genotypenverteilung in der Nicht IVH-Gruppe und der Gruppe mit einer schweren IVH (III-IV°) bezogen auf Faktor VII

	Genotyp	Nicht-IVH Gruppe	IVH schwer
CYP4F2	1/1	52 (60,5 %)	8 (66,7 %)
	1/2	32 (37,2 %)	3 (25 %)
	2/2	2 (2,3 %)	1 (8,3 %)
Insgesamt		86 (100 %)	12 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,417	

Tabelle 51: Darstellung der Genotypenverteilung in der Nicht IVH-Gruppe und der Gruppe mit einer schweren IVH (III-IV°) bezogen auf CYP4F2

	Genotyp	Nicht-IVH Gruppe	IVH schwer
ApoE	E2/E2	0	0
	E2/E3	8 (9,3 %)	2 (16,7 %)
	E3/E3	61 (70,9 %)	7 (58,3 %)
	E3/E4	15 (17,5 %)	2 (16,7 %)
	E4/E4	2 (2,3 %)	1 (8,3 %)
	E2/E4	0	0
Insgesamt		86 (100 %)	12 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,563	

Tabelle 52: Darstellung der Genotypenverteilung in der Nicht IVH-Gruppe und der Gruppe mit einer schweren IVH (III-IV°) bezogen auf ApoE

3.4.2 Gegenüberstellung der Allelverteilung der Gruppe mit einer schweren IVH (III-IV°) und der Nicht IVH-Gruppe

Die Allelverteilung des Patientenkollektivs mit einer schweren IVH werden den Allelverteilung der Nicht IVH-Gruppe gegenübergestellt. Wiederum wird bei der γ -Carboxylase aufgrund der statistisch signifikanten Abweichung in der ersten Gruppe die gleiche Unterteilung wie bei der Genotypenhäufigkeit dargestellt.

Allel		Nicht-IVH Gruppe	IVH schwer („Zwischenauswertung“)
GGCX	1	114 (66,3 %)	3 (30 %)
	2	58 (33,7 %)	7 (70 %)
Insgesamt		172 (100 %)	10 (100 %)
Über χ^2 -Test errechnetes p			0,047

Tabelle 53: Aufstellung der Allelverteilung in der Gruppe mit einer schweren IVH (III-IV°) gegenüber der Gruppe ohne IVH bezogen auf Cammacarboxylase in der Zwischenauswertung

Allel		Nicht-IVH Gruppe	IVH schwer („Endauswertung“)
GGCX	1	114 (66,3 %)	12 (85,7 %)
	2	58 (33,7 %)	2 (14,3 %)
Insgesamt		172 (100 %)	14 (100 %)
Über χ^2 -Test errechnetes p			0,231

Tabelle 54: Aufstellung der Allelverteilung in der Gruppe mit einer schweren IVH (III-IV°) gegenüber der Gruppe ohne IVH bezogen auf Cammacarboxylase in der Endauswertung

Allel		Nicht-IVH Gruppe	IVH schwer (Gesamtgruppe)
GGCX	1	114 (66,3 %)	15 (62,5 %)
	2	58 (33,7 %)	9 (37,5 %)
Insgesamt		172 (100 %)	24 (100 %)
Über χ^2 -Test errechnetes p			0,892

Tabelle 55: Aufstellung der Allelverteilung in der Gruppe mit einer schweren IVH (III-IV°) gegenüber der Gruppe ohne IVH bezogen auf Cammacarboxylase in der Gesamtgruppe

	Allel	Nicht-IVH Gruppe	IVH schwer
VKORC1	1	103 (62,8 %)	19 (79,2 %)
	2	61 (37,2 %)	5 (20,8 %)
Insgesamt		164 (100 %)	24 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,232	

Tabelle 56: Aufstellung der Allelverteilung in der Gruppe mit einer schweren IVH (III-IV°) gegenüber der Gruppe ohne IVH bezogen auf VKORC1

Tabelle 19c	Allel	Nicht-IVH Gruppe	IVH schwer
Faktor VII Promotor	1	151 (87,8 %)	20 (83,3 %)
	2	21 (12,2 %)	4 (16,7 %)
Insgesamt		172 (100 %)	24 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,774	

Tabelle 57: Aufstellung der Allelverteilung in der Gruppe mit einer schweren IVH (III-IV°) gegenüber der Gruppe ohne IVH bezogen auf Faktor VII

Tabelle 19d	Allel	Nicht-IVH Gruppe	IVH schwer
CYP4F2	1	136 (79,1 %)	19 (79,2 %)
	2	36 (20,9 %)	5 (20,8 %)
Insgesamt		172 (100 %)	24 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,797	

Tabelle 58: Aufstellung der Allelverteilung in der Gruppe mit einer schweren IVH (III-IV°) gegenüber der Gruppe ohne IVH bezogen auf CYP4F2

Tabelle 19e	Allel	Nicht-IVH Gruppe	IVH schwer
ApoE	E2	8 (4,7 %)	2 (8,3 %)
	E3	145 (84,3 %)	18 (75 %)
	E4	19 (11 %)	4 (16,7 %)
Insgesamt		172 (100 %)	24 (100 %)
Über χ^2-Test errechnetes p		0,51	

Tabelle 59: Aufstellung der Allelverteilung in der Gruppe mit einer schweren IVH (III-IV°) gegenüber der Gruppe ohne IVH bezogen auf ApoE

3.4.3 Berechnung der erwarteten Genotypenverteilungen in der Gruppe mit einer schweren IVH (III-IV°) und Vergleich dieser Erwartungswerte mit den ermittelten Werten

Die erwarteten Werte werden mittels Hardy-Weinberg Gesetz berechnet. Dazu dienen die in Abschnitt 3.6.2 errechneten Allelverteilungen.

Die erwarteten Genotypenverteilungen werden dann mit den tatsächlich ermittelten Werten verglichen.

Gruppe „Zwischenauswertung“

Hardy-Weinberg Gesetz

Erwartete Genotypenverteilung
in der Kontrollgruppe

$p^2=(0,3)^2$	GGCX 1/1	9 %	dies entspräche 1 von 5 Patienten
$2pq=2 \times 0,3 \times 0,7$	GGCX 1/2	42 %	dies entspräche 2 von 5 Patienten
$q^2=(0,7)^2$	GGCX 2/2	49 %	dies entspräche 2 von 5 Patienten

Genotyp		Ermittelte Genotypenverteilung	Erwartete Genotypenverteilung
GGCX	1/1	1	1
	1/2	1	2
	2/2	3	2
Insgesamt		5	5
Über χ^2 -Test errechnetes p		0,766	

Tabelle 60: Ermittelte Genotypenverteilung in der Kontrollgruppe gegenüber der erwarteten Genotypenverteilung des GGCX Genpolymorphismus in der Zwischenauswertung

Gruppe „Endauswertung“

Hardy-Weinberg Gesetz

Erwartete Genotypenverteilung
in der Kontrollgruppe

$p^2=(0,857)^2$	GGCX 1/1	73,5 %	dies entspräche 5 von 7 Patienten
$2pq=2 \times 0,857 \times 0,143$	GGCX 1/2	24,5 %	dies entspräche 2 von 7 Patienten
$q^2=(0,143)^2$	GGCX 2/2	2 %	dies entspräche 0 von 7 Patienten

Genotyp		Ermittelte Genotypenverteilung	Erwartete Genotypenverteilung
GGCX	1/1	5	5
	1/2	2	2
	2/2	0	0
Insgesamt		7	7
Über χ^2 -Test errechnetes p		1	

Tabelle 61: Ermittelte Genotypenverteilung in der Kontrollgruppe gegenüber der erwarteten Genotypenverteilung des GGCX Genpolymorphismus in der Endauswertung

Gruppe „Gesamtgruppe“

Hardy-Weinberg Gesetz

Erwartete Genotypenverteilung
in der Kontrollgruppe

$p^2=(0,625)^2$	GGCX 1/1	39 %	dies entspräche 5 von 12 Patienten
$2pq=2 \times 0,625 \times 0,375$	GGCX 1/2	46,9 %	dies entspräche 5 von 12 Patienten
$q^2=(0,375)^2$	GGCX 2/2	14,1 %	dies entspräche 2 von 12 Patienten

Genotyp		Ermittelte Genotypenverteilung	Erwartete Genotypenverteilung
GGCX	1/1	6	4
	1/2	3	5
	2/2	3	2
Insgesamt		12	12
Über χ^2 -Test errechnetes p		0,673	

Tabelle 62: Ermittelte Genotypenverteilung in der Kontrollgruppe gegenüber der erwarteten Genotypenverteilung des GGCX Genpolymorphismus in der

Hardy-Weinberg Gesetz

$$p^2 = (0,792)^2 \quad \text{VKORC1 1/1 } 62,7 \%$$

$$2pq = 2 \times 0,792 \times 0,208 \quad \text{VKORC1 1/2 } 33 \%$$

$$q^2 = (0,208)^2 \quad \text{VKORC1 2/2 } 4,3 \%$$

Erwartete Genotypenverteilung

in der Kontrollgruppe

dies entspräche 7 von 12 Patienten

dies entspräche 4 von 12 Patienten

dies entspräche 1 von 12 Patienten

	Genotyp	Ermittelte Genotypenverteilung	Erwartete Genotypenverteilung
VKORC1	1/1	7	7
	1/2	5	4
	2/2	0	1
Insgesamt		12	12
Über χ^2 -Test errechnetes p		0,574	

Tabelle 63: Ermittelte Genotypenverteilung in der Kontrollgruppe gegenüber der erwarteten Genotypenverteilung des VKORC1 Genpolymorphismus

Hardy-Weinberg Gesetz

$$p^2 = (0,875)^2 \quad \text{Faktor VII 1/1 } 76,6 \%$$

$$2pq = 2 \times 0,875 \times 0,125 \quad \text{Faktor VII 1/2 } 21,9 \%$$

$$q^2 = (0,125)^2 \quad \text{Faktor VII 2/2 } 1,5 \%$$

Erwartete Genotypenverteilung

in der Kontrollgruppe

dies entspräche 9 von 12 Patienten

dies entspräche 3 von 12 Patienten

dies entspräche 0 von 12 Patienten

	Genotyp	Ermittelte Genotypenverteilung	Erwartete Genotypenverteilung
Faktor VII Promotor	1/1	8	9
	1/2	4	3
	2/2	0	0
Insgesamt		12	12
Über χ^2 -Test errechnetes p		1	

Tabelle 64: Ermittelte Genotypenverteilung in der Kontrollgruppe gegenüber der erwarteten Genotypenverteilung des Faktor VII Promotor Genpolymorphismus

Hardy-Weinberg Gesetz

$p^2=(0,792)^2$ CYP4F2 1/1 62,7 %

$2pq=2 \times 0,792 \times 0,208$ CYP4F2 1/2 33 %

$q^2=(0,208)^2$ CYP4F2 2/2 4,3 %

Erwartete Genotypenverteilung

dies entspräche 7 von 12 Patienten

dies entspräche 4 von 12 Patienten

dies entspräche 1 von 12 Patienten

	Genotyp	Ermittelte Genotypenverteilung	Erwartete Genotypenverteilung
CYP4F2	1/1	8	7
	1/2	3	4
	2/2	1	1
Insgesamt		12	12
Über χ^2 -Test errechnetes p		0,901	

Tabelle 65: Ermittelte Genotypenverteilung in der Kontrollgruppe gegenüber der erwarteten Genotypenverteilung des CYP4F2 Genpolymorphismus

3.5 Untersuchung der klinischen und laborchemischen Parameter

3.5.1 Klinische Daten

Bei jedem Studienpatienten wurden im Rahmen der Untersuchung die folgenden klinischen Variablen (Maßeinheit) erfasst:

- Gestationsalter (Tage)
- Geschlecht (männlich / weiblich)
- Geburtsgewicht (in Gramm)
- Celestangabe vor Geburt (ja/nein)
- Klinische Verdachtsdiagnose Chorioamnionitis (ja/nein)
- APGAR Wert nach 1, 5 und 10 Minuten (0-10 Punkte)
- Persistierender Ductus Arteriosus (ja/nein)

Die erhobenen Parameter wurden im als Vergleich unabhängiger Stichproben (IVH Gruppe versus nicht-IVH Gruppe) mittels Mann-Whitney U-Test und Vierfeldertafel auf eine signifikante Assoziation mit dem Auftretenshäufigkeit der IVH im Studienkollektiv geprüft.

Die angegebenen Werte beschreiben, soweit nicht anders gekennzeichnet, Median und die Spannweite.

3.5.1.1 Darstellung der Gesamtgruppe

Von den 110 Studienpatienten waren 75 (68,2 %) männlichen Geschlechts. Das Gestationsalter der Gesamtgruppe betrug im Median 199 Tage (28 3/7 Wochen), Spannweite 164 -233 Tage (23 3/7-33 2/7 Wochen). 24 der 110 Studienpatienten (22 %) entwickelten im weiteren Verlauf eine IVH. Das Auftreten einer IVH in der Studienpopulation zeigte eine signifikante Abhängigkeit vom Gestationsalter bei Geburt (IVH Gruppe 192 Tage im Median, Spannweite 164-220; Nicht-IVH Gruppe 204 Tage im Median, Spannweite 168-233; $p=0.007$; Tabelle 21).

Das Geburtsgewicht, Geschlecht, APGAR nach 1, 5 und 10 Minuten sowie das Auftreten einer BPD konnte für alle 110 Studienteilnehmer ermittelt werden. Bei zwei Studienteilnehmern waren keine Angaben bezüglich der vorgeburtlichen Celestangabe oder eines persistierenden Ductus Arteriosus dokumentiert.

3.5.1.2 Klinische Parameter: IVH Gruppe versus Nicht-IVH Gruppe

In der Gruppe der IVH Patienten war im Vergleich zu den Patienten ohne IVH die Häufigkeit eines persistierenden Ductus Arteriosus mit 51,8 % zu 14,3 % signifikant erhöht ($p= 0,004$). Die 1 und 5 Minuten APGAR Werte unterschieden sich nicht im Gruppenvergleich, jedoch war der 10 Minuten APGAR Wert in der IVH Gruppe signifikant niedriger als in der nicht -IVH Gruppe (8,13 versus 8,62; $p= 0,026$). Die weiteren untersuchten Parameter (Geburtsgewicht, Geschlecht, Celestangabe und V. a. Chorioamnionitis; Tabelle 21) zeigten keinen Unterschied im Gruppenvergleich.

	IVH (n=24)	Nicht IVH (n=86)	p-Wert
Gestationsalter (Tage)	192 (164-220)	204 (168-233)	0,007
Geburtsgewicht (g) (n=110)	937,5 [▲] (320-1820)	1109,49 [▲] (400-2270)	0,168[♦]
APGAR Wert nach 1 Minute (n=110)	5,92 [▲] (2-8)	6,26 [▲] (1-9)	0,221[♦]
APGAR Wert nach 5 Minuten (n=110)	7,5 [▲] (4-9)	7,92 [▲] (2-10)	0,102[♦]
APGAR Wert nach 10 Minuten (n=110)	8,13 [▲] (6-9)	8,62 [▲] (1-10)	0,026[♦]
Geschlecht Männlich/Weiblich (n=110)	18/6	57/29	0,468[°]
Celestangabe Ja/Nein (n=109)	8/16	57/28	0,864[°]
V. a. Chorioamnionitis Ja/Nein (n=108)	3/21	8/76	0,886[°]
PDA Ja/Nein (n=109)	3/21	29/56	0,004[°]
[▲] Wertebereich in Median und Spannweite [♦] Berechnung mit MWU-Test [°] Berechnung über Vierfeldertafel PDA=Persistierender Ductus Arteriosus Botalli			

Tabelle 66: Darstellung der klinischen Parameter (Gestationsalter, Geburtsgewicht, APGAR nach einer, fünf und zehn Minuten, Geschlecht, Celestangabe, Verdacht auf Chorioamnionitis und Persistierender Ductus Arteriosus) der Studiengruppe unterteilt nach dem Vorhandensein einer IVH.

3.5.2 Laborchemische Parameter

Bei jedem Studienpatienten wurden im Rahmen der Untersuchung laborchemische Routinedaten erhoben. Die folgenden klinischen Parameter (Maßeinheit) wurden dabei erfasst:

- Gehalt des Gerinnungsfaktors II (mg/l)
- Gehalt des Gerinnungsfaktors VII (mg/l)
- Gehalt des Gerinnungsfaktors X (mg/l)
- Hämoglobingehalt direkt nach der Geburt (g/dl)
- Thrombozytenzahl direkt nach der Geburt (G/l)
- Leukozytenzahl direkt nach der Geburt (G/l)
- Interleukin 6 Konzentration im Serum direkt nach der Geburt (pg/ml)
- C-reaktives Protein Konzentration im Serum Wert nach 24 Lebensstunden (mg/l)
- pCO₂ in der arteriellen Blutgasanalyse nach der Geburt (mm Hg).

Bei allen Studienpatienten wurde unmittelbar nach der Geburt und vor der ersten Vitamin K Substitution eine erste laborchemische Blutuntersuchung durchgeführt. Diese enthielt gerinnungsphysiologische Parameter wie den Gehalt der Gerinnungsfaktoren II, VII und X, sowie die Blutparameter Hämoglobin, Thrombozyten, Leukozyten und Interleukin 6 im Serum. Nach 24 Lebensstunden wurde eine erneute Blutuntersuchung durchgeführt. Hier wurde ein weiterer Entzündungsmarker, das CRP im Serum bestimmt. Ebenfalls direkt nach der Geburt wurde eine Blutgasanalyse durchgeführt. Aus dieser wurde unter anderem der aktuelle pCO₂ Wert ermittelt.

Der Gehalt an den Gerinnungsfaktoren II, VII und X konnte jeweils für 85 Studienteilnehmer aus den Proben ermittelt werden, wobei alle 24 Studienteilnehmer mit einer Hirnblutung erfasst wurden. Aus der ersten Blutentnahme konnten Werte für Hämoglobin, Thrombozyten, Leukozyten und aus der Blutgasanalyse der pCO₂ Wert für alle 110 Studienteilnehmer ermittelt werden. Der initiale Interleukin-6 Wert wurde bei 88 Studienteilnehmern erhoben, der Wert für das CRP nach 24 Stunden bei 92 Probanden.

3.5.2.1 Konzentration der Vitamin K-abhängigen Faktoren bezogen auf die Genotypenverteilung

Entsprechend der ermittelten Genotypenverteilung für die in der Studie untersuchten Genpolymorphismen wurden in einer Gruppenanalyse die Konzentration Vitamin K-abhängiger Gerinnungsfaktoren (Faktor II, Faktor VII und Faktor X) verglichen. Hierbei ergab sich für keinen der untersuchten Genpolymorphismen ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression der Gerinnungsfaktoren und dem vorliegenden Genotyp. Abbildung 8 beschreibt exemplarisch für Faktor VII die Faktorenkonzentration im Studienkollektiv bezogen auf den zugrunde liegenden Faktor VII Promotor Genpolymorphismus.

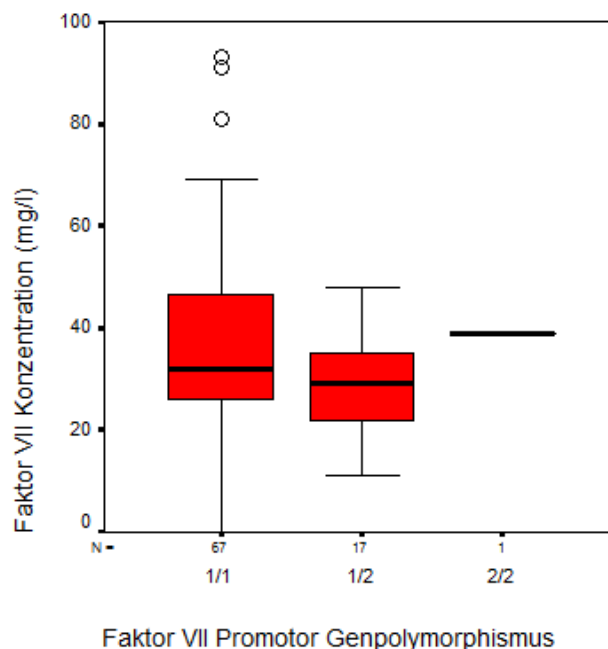


Abbildung 7: Vergleich der Faktor VII Konzentration und der Genotypenverteilung bezüglich des Faktor VII Promotor Polymorphismus (Wildtyp =1/1; Heterozygot =1/2; Homozygot Insertion =2/2; Kruskal-Wallis-Test, $p=0,17$)

3.5.2.2 Konzentration der Gerinnungsfaktoren bezogen auf das Gestationsalter

Für die Gesamtgruppe der Patienten konnte mittels einer Korrelationsanalyse nach Spearman ein Gestationsalters- abhängiger Konzentrationsanstieg der Gerinnungsfaktoren FII ($p=0,013$;

Korrelationskoeffizient=0,27) und FVII ($p=0,002$; Korrelationskoeffizient=0,34) beschrieben werden. Die F X Konzentrationen korrelierte nicht mit dem Gestationsalter ($p=0,19$).

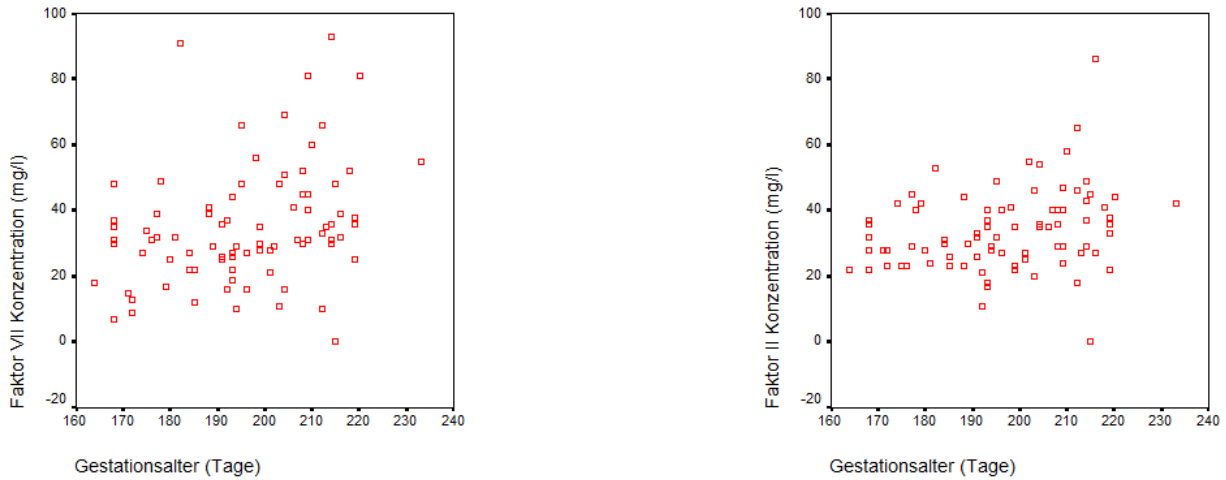


Abbildung8: Korrelationsanalyse der Gerinnungsfaktoren II und VII in Abhängigkeit des Gestationsalters (nach Spearman)

3.5.2.3 Laborchemische Parameter: IVH Gruppe versus Nicht-IVH Gruppe

Abbildung 8 beschreibt dass der Faktor II Gehalt in der Gruppe mit einer IVH im Vergleich zu der Gruppe ohne IVH signifikant niedriger ist ($p=0,008$).

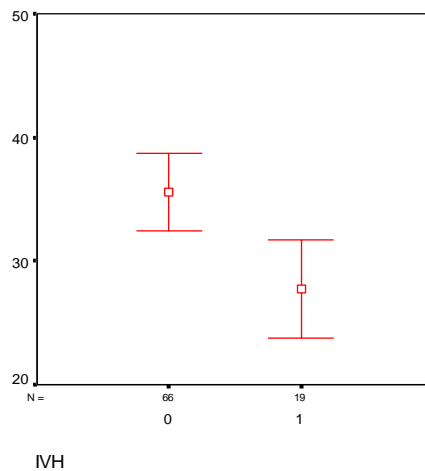


Abbildung 9: Verteilung der Faktors II Konzentrationen in der Nicht-IVH (0) und der IVH (1) Gruppe

Auch der nach der Geburt gemessene Hämoglobinwert war im Median in der IVH Gruppe niedriger als in der Nicht-IVH Gruppe ($p= 0,017$). Die Interleukin 6 Konzentrationen im Serum waren in der IVH Gruppe im Vergleich zu der Nicht-IVH Gruppe signifikant erhöht ($p= 0,002$). Für die übrigen Variablen: Faktor VII, Faktor X, Thrombozyten, Leukozyten, CRP und $p\text{CO}_2$ konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ermittelt werden (Abbildung 9; Tabelle 22).

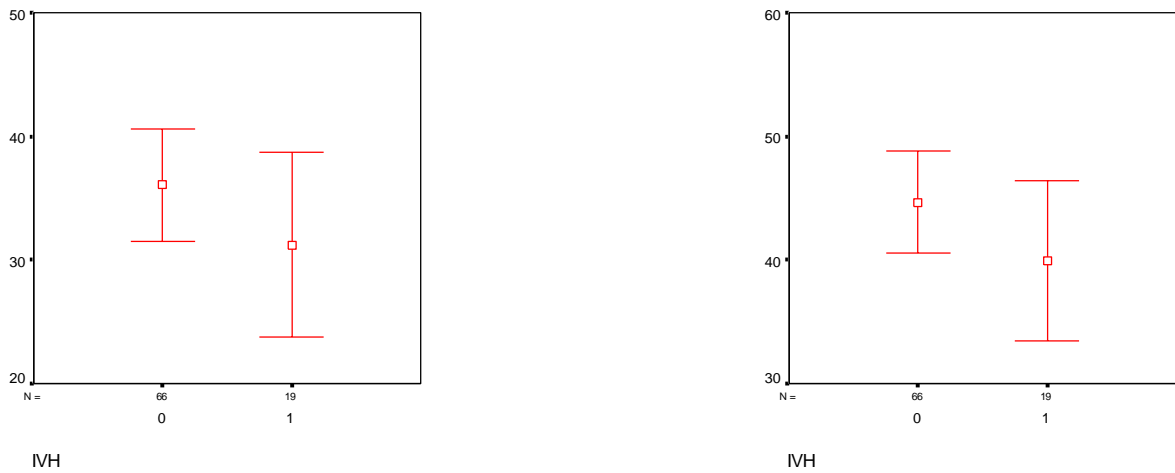


Abbildung 10: Verteilung der Faktoren VII und X in der IVH (1) und der Nicht-IVH (0) Gruppe

	IVH* (n=24)	Nicht IVH* (n=86)	p-Wert "
Faktor II (n=85)	27,74 [•] (11-44)	35,61 [°] (17-86)	0,008
Faktor VII (n=85)	31,21 [•] (10-81)	36,05 [°] (7-93)	0,222
Faktor X (n=85)	39,95 [•] (24-65)	44,65 [°] (4-89)	0,174
Hämoglobin (n=110)	14,25 [▲] (3-23)	15,86 [♦] (4-22)	0,017
Thrombozyten (n=110)	146295,29 [▲] (71000- 291000)	162487,50 [♦] (12000- 272000)	0,336
Leukozyten (n=110)	7383,6 [▲] (1080-34000)	6950,4 [♦] (1160-32000)	0,642
Interleukin 6 (n=88)	1262,87 [▲] (5-25448)	796,12 [↓] (0-21626)	0,002
CRP (n=92)	11,1 [↑] (0-82)	7,77 [↑] (0-78)	0,248
pCO₂ (n=110)	57,5 [▲] (22-95)	58,04 [♦] (21-122)	0,949
Vorliegende Meßwerte: [•] n=19 [°] n=66 [▲] n=24 [♦] n=86 [↓] n=21 [↓] n=64 [↑] n=71 "p-Wert Berechnung mittels MWU-Test *Angabe der Werte in Median und Spannweite			

Tabelle 67: Darstellung der laborchemischen Variablen (Faktor II-Gehalt, Faktor VII-Gehalt, Faktor X-Gehalt, Hämoglobin initial, Thrombozyten initial, Leukozyten initial, Interleukin initial, C-reaktives Protein nach 24h und pCO₂ in der initialen Blutgasanalyse) in Abhängigkeit einer von IVH.

3.5.3 Logistische Regressionsanalyse der mit der IVH assoziierten klinischen und laborchemischen Parameter

Um die Abhängigkeit der in den Einzelanalysen signifikant mit dem Merkmal IVH assoziierten Variablen zu prüfen, wurde eine binäre logistische Regressionsanalyse unter Einbeziehung der Parameter Hb initial, FVII Konz. APGAR 10 Minuten, Gestationsalter durchgeführt. Hierbei zeigte es sich, dass die erniedrigte Faktor II Konzentration statistisch die einzige unabhängig von allen anderen Parametern mit dem Ereignis IVH verbundene Variable war (Chi Quadrat Test: $p=0.013$, Exp (B) 0,92; 95 % KI 0.87-0.98).

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von Frühgeborenen bezüglich dem Vorliegen von definierten Genpolymorphismen im Vitamin K-Zyklus, beziehungsweise klinisch und laborchemisch erhobener Parameter in Hinblick auf Inzidenz und Ausmaß einer IVH.

4.1. Polymorphismen im GGCX, VKORC1, Faktor VII, CYP4F2 und ApoE Gen und Hirnblutungen bei Frühgeborenen

4.1.1 Faktor VII Promotor

Wie in der Einleitung beschrieben, konnte in der aktuellen Literatur für den Genpolymorphismus im Promotor Bereich des Faktors VII ein signifikanter Zusammenhang zwischen Faktor VII Gehalt und dem Risiko für intraventrikuläre Hirnblutungen bei 1 Monate alten Säuglingen und Erwachsenen nachgewiesen werden (Corral et al., 2001; Koichi et al., 2007). Vergleichbare molekulargenetische Untersuchungen bei Frühgeborenen sind aktuell nicht verfügbar. Erste Untersuchungen zum Hämostasepotential bei extrem Frühgeborenen beschreiben bei Patienten mit Hirnblutungen signifikant erniedrigte Konzentrationen von Faktor II und Faktor X sowie, dass 70 % der dort untersuchten extrem frühgeborenen Kinder mit einem Faktor VII Gehalt unter der 10. Perzentile, eine IVH entwickelten, wohingegen dies nur für 20 % der Kinder mit einem Faktor VII Gehalt über der 75. Perzentile zutraf. Dies lässt vermuten, dass eine niedrigere Faktor VII Aktivität ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer IVH darstellt (Heep et al.,

2007). In unserer Studie konnten wir keinen Zusammenhang zwischen dem Genotyp des Faktor VII Promotor Genpolymorphismus und der Hirnblutungshäufigkeit darstellen. Ebenso ergab sich kein Hinweis auf eine funktionelle Relevanz, das heißt ein Unterschied der Faktor VII Konzentration entsprechend des vorliegenden Genotyps. Unsere Ergebnisse beschreiben einen Anstieg der Faktor VII Konzentration in Abhängigkeit vom Gestationsalter (funktionelle Reife).

4.1.2 GGCX

In der aktuellen Literatur gibt es bisher keine Studien die sich mit der Bedeutung des Polymorphismus im *GGCX Gen* für die Überführung der Gerinnungsfaktoren in ihre aktive Form bei Frühgeborenen beschäftigt. Bei gesunden Erwachsenen wurde bisher kein Einfluss auf das Gerinnungspotential nachgewiesen. In der vorliegenden Studie zeigte sich in der Zwischenauswertung (n=53) ein statistisch signifikanter Unterschied in der Genotypenverteilung des GGCX Polymorphismus zwischen der Gruppe mit einer schweren IVH (III-IV°) und der Nicht-IVH Gruppe. Dieses Ergebnis war jedoch nicht repräsentativ für das Gesamtkollektiv. Das vorliegende Ergebnis kann als Grundlage für die statistische Planung einer weiteren Studie dienen

4.1.3 VKORC1, CYP4F2 und ApoE

Mit der Fragestellung, ob funktionelle Polymorphismen im *VKORC1, CYP4F2 und ApoE Gen* einen Einfluss auf die Inzidenz und das Ausmaß einer Hirnblutung bei Frühgeborenen haben, hat sich bisher noch keine Studie befasst. Die unserer Untersuchung zugrunde liegende Annahme, dass der Transport von Vitamin K (ApoE Polymorphismus), die Inaktivierung von Vitamin K (CYP4F2 Polymorphismus) und die Regeneration von Vitamin K im Vitamin K Zyklus (VKORC1 Polymorphismus) eine funktionelle Bedeutung für die Inzidenz und das Ausmaß einer IVH bei Frühgeborenen haben, beruht auf Beobachtungen, dass bei Vorliegen entsprechender Genpolymorphismen bei Erwachsenen eine individualisierte Cumarintherapie zur Gerinnungssteuerung folgen muss (Geisen et al., 2005; Oldenburg et al., 2008; Oldenburg et al., 2006). In unserer Untersuchung konnten wir unter standardisierter Vitamin K Substitution, keinen Zusammenhang zwischen den untersuchten Polymorphismen mit der Inzidenz der IVH oder der Konzentration der untersuchten Gerinnungsparameter zeigen.

4.2. Untersuchung der klinischen und laborchemischen Parameter

4.2.1 Klinische Daten

4.2.1.1 Darstellung der Gesamtgruppe

Das von uns untersuchte Studienkollektiv entspricht einem streng nach Gestationsalter stratifiziertem Risikokollektiv von Frühgeborenen. Die IVH Inzidenz in der Studiengruppe betrug 22 % und ist somit vergleichbar mit bekannten Daten. In der Literatur wird ein direkter Zusammenhang zwischen Frühgeburtlichkeit und IVH Inzidenz beschrieben (Obladen et al., 2008). Wie erwartet war das Gestationsalter bei Patienten, die eine IVH entwickelten, im Vergleich zu den Patienten, die keine IVH entwickelten, niedriger. Unter der Annahme der multifaktoriellen Genese der IVH wurden im Rahmen der Studie perinatale Risikofaktoren erfasst und auf den Zusammenhang mit der Hirnblutungshäufigkeit im Untersuchungskollektiv hin untersucht.

4.2.1.2 Klinische Parameter: IVH versus Nicht-IVH

Der APGAR Score erfasst standardisiert den klinischen Zustand des Neugeborenen in den ersten 10 Lebensminuten zu jeweils definierten Zeitpunkten. Er wird als prognostischer Parameter bezüglich der Anpassung des Kindes an das extrauterine Leben verwendet. Eine gestörte Anpassung an das extrauterine Leben wird in direktem Zusammenhang mit der Entwicklung der IVH bei Frühgeborenen beschrieben (Sitzmann, 2007).

In unserer Studie zeigte sich beim APGAR Wert nach 1 und 5 Minuten kein Unterschied zwischen der IVH und Nicht-IVH Gruppe. Im Gegensatz dazu zeigte sich jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied in der IVH und der Nicht-IVH Gruppe bezüglich des APGAR Wertes nach 10 Minuten. Kinder die im Folgenden eine IVH entwickelten wiesen nach 10 Minuten einen niedrigeren APGAR Wert (Median 8,13 versus 8,62; $p=0,02$) auf.

Lee (Lee et al., 2010) und Sarkar (Sarkar et al., 2009) versuchten ebenfalls zu klären ob ein Zusammenhang zwischen dem APGAR Wert und der IVH Inzidenz bei Frühgeborenen besteht. In beiden Studien wurden die APGAR Werte nach jeweils einer und fünf Minuten berücksichtigt. Für diese beiden Werte konnten Lee und Sarkar keinen Zusammenhang mit der Inzidenz einer IVH nachweisen. Der 10 Minuten APGAR Wert beschreibt den Erfolg der postnatalen Stabilisierung und ist beeinflusst durch die Intensität und Qualität der medizinischen Maß-

nahmen. Der 10 Minuten APGAR korreliert mit dem neurologischen Outcome nach schwerer peripartaler Asphyxie (Lee et al., 2010; Linder et al., 2003).

Physiologischerweise verschließt sich der Ductus Arteriosus Botalli aufgrund der Umstellung vom fetalen zum neonatalen Kreislauf innerhalb der ersten Lebenstage nach der Geburt. Bei Frühgeborenen persistiert der Ductus Arteriosus jedoch häufiger, als bei Reifgeborenen. Die Ursache dafür, wird in erniedrigten O₂-Partialdrücken und erhöhten Prostaglandinspiegeln gesehen. Da ein unverschlossener PDA nachgeburtlich zu einem Links-Rechts-Shunt führt und mit veränderten zerebralen Blutdruckverhältnissen einhergeht, besteht ein direkter Zusammenhang mit der IVH Inzidenz. Eine prophylaktische medikamentöse Behandlung des PDA mittels Cyclooxygenaseinhibitoren (Indometacin) führt in ca. 80 % der behandelten Patienten zu einem dauerhaften Verschluss des PDA und steht in Zusammenhang mit der Reduktion der IVH Inzidenz bei extrem frühgeborenen Kindern (Fowle et al., 2010).

Bei allen in die Studie aufgenommenen Patienten wurde ein Echokardiographie zur Diagnostik des PDA innerhalb der ersten 48 Lebensstunden durchgeführt und bei Nachweis der hämodynamischen Relevanz wurde eine Indometacintherapie nach Standard durchgeführt. In unserer Studie konnten wir beschreiben, dass Frühgeborene, die im Verlauf eine IVH entwickelten, signifikant häufiger einen PDA aufwiesen als Frühgeborene die keine IVH entwickelten (p=0,004).

Die Studie von Lee (Lee et al., 2010) zeigte ebenfalls, dass Kinder mit einer IVH IV° signifikant häufiger an einem PDA litten als solche mit einer IVH III°, welche wiederum häufiger einen PDA aufwiesen als Kinder mit einer IVH II° Grades. Auch weitere Studien von Hemrick und Alexander (Alexander et al., 2009; Hamrick, 2010) unterstützen die Aussage, dass ein PDA aufgrund des nach der Geburt unphysiologischen links-rechts Shunts zur Entstehung einer IVH erheblich beitragen kann.

Von den in unserer Studie eingeschlossenen Kindern erlitten 24 eine IVH, davon waren 6 Kinder weiblichen und 18 Kinder männlichen Geschlechts. Bei einem Verhältnis Männlich/Weiblich von 2:1 in unserem Studienkollektiv war dieser Unterschied nicht signifikant (p=0,468).

In einer groß angelegten Studie mit 104 847 Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht <1500g konnte nachgewiesen werden, dass das Geschlecht mit der Inzidenz und dem Ausmaß einer IVH in Zusammenhang steht (Mohamed und Aly, 2010). Das männliche Geschlecht war dabei

signifikant häufiger von einer IVH betroffen. Ebenso litten männliche Frühgeborene häufiger an schweren Hirnblutungen. Auch Tioseco (Tioseco et al., 2006) konnte in seiner Studie diesen Einfluss nachweisen.

Da das Geburtsgewicht in direktem Zusammenhang mit dem Gestationsalter des Kindes steht und das Gestationsalter wiederum in direktem Zusammenhang mit der IVH Inzidenz (Obladen et al., 2008), wäre zu erwarten, dass ein niedriges Geburtsgewicht ebenfalls mit einer erhöhten Inzidenz einer IVH einhergeht.

In unserer Studie war das Geburtsgewicht in der IVH Gruppe nicht signifikant geringer als in der Nicht-IVH Gruppe ($p=0,17$).

Celestan ist ein synthetisch hergestelltes Glukokortikoid. Pränatal an die Mutter verabreichte Kortikoide bewirken eine beschleunigte Lungenreifung sowie Surfactantproduktion beim Ungeborenen (Bolt et al., 2001). Dadurch nehmen nach derzeitigem Kenntnisstand sowohl Mortalität, pulmonale Morbidität und IVH Inzidenz bei Frühgeborenen ab (Bolt et al., 2001).

In unserer Studie konnten wir jedoch keinen statistischen Zusammenhang zwischen der IVH Inzidenz und einer vorangegangenen Celestangabe nachweisen ($p=0,864$). Die Häufigkeit der pränatalen Steroidprophylaxe im untersuchten Studienkollektiv betrug entsprechend der Dokumentation 60 % (Erwartungswert >90 %). Dieses Ergebnis sollte daher aufgrund der bisher nachgewiesenen positiven Effekte des Celestans auf die fetale Reifung kritisch betrachtet werden. Proinflammatorische Zytokine induzieren neben anderen pathologischen Prozessen die Synthese von Adhensionsmolekülen in zerebralen Endothelzellen. Durch diesen Vorgang wird Entzündungszellen eine Migration in das Gewebe ermöglicht (Acarin et al., 2000; Stanimirovic et al., 2000). Dieser Prozess führt bei Früh- und Neugeborenen zu den typischen Folgeläsionen einer periventrikulären Leukomalazie (Yoon et al., 1997).

Aufgrund der Fallzahl unserer Untersuchung konnte bei zu erwartend niedriger Inzidenz der PVL (1-2 %) dies nicht untersucht werden. In unserer Untersuchung ergab sich kein Zusammenhang zwischen der klinischen Diagnose einer Chorioamnionitis und der Entwicklung einer IVH ($p=0,886$) im Studienkollektiv.

Sarkar (Sarkar et al., 2009) untersuchte 2005 den Zusammenhang zwischen einer Chorioamnionitis und der Entwicklung einer IVH bei Frühgeborenen. Auch er konnte in seiner Untersuchung

keinen Zusammenhang nachweisen.

4.3 Laborchemische Parameter

4.3.1 Konzentration der Vitamin K-abhängigen Faktoren in Bezug auf Genotypen

Einen statistischen Zusammenhang zwischen dem Gehalt der Vitamin K-abhängigen Faktoren in Bezug auf den Genotypen konnten wir nicht nachweisen. Bei einzelnen Studienteilnehmern konnte aufgrund fehlender oder erst nach Vitamin K Substitution erfolgter Blutabnahme keine Bestimmung des Gehalts der Vitamin K-abhängigen Faktoren erfolgen. Aufgrund des seltenen Vorkommens einer homozygoten Insertion führt dies zusammen mit vorherig aufgeführtem Aspekt dazu, dass ein Zusammenhang zwischen Vitamin K-abhängigen Faktoren und Genotypen in dieser Arbeit zurückhaltend gewertet werden sollte.

4.3.2 Konzentration der Gerinnungsfaktoren in Bezug auf das Gestationsalter

In unserem Studienkollektiv zeigte sich ein physiologischer Anstieg der Gerinnungsfaktoren II und VII mit zunehmendem Gestationsalter. Dieses Ergebnis unterstreicht die bisherigen, retrospektiv erhobenen Daten zur Gerinnungsfaktorenexpression bei FG < 28 SSW (Heep et al., 2007; McIntosh, 2003). Für Faktor X konnten wir keinen signifikanten Anstieg des Serumgehalts mit zunehmendem Gestationsalter nachweisen.

4.3.3. Laborchemische Parameter: IVH Gruppe versus Nicht-IVH Gruppe

Aufgrund der durch proinflammatorisch Zytokinen begünstigten Synthese von Adhäsionsmolekülen in zerebralen Endothelzellen und der dadurch begünstigten Migration von Entzündungszellen ins Gewebe sind somit die Voraussetzungen für Folgeläsionen wie IVH und periventriculäre Leukomalazie gegeben (Acarin et al., 2000; Stanimirovic und Satoh, 2000; Yoon et al., 1997).

In unsere Studie zeigte sich ein deutlich positiver Zusammenhang zwischen einem erhöhten Interleukin 6 Spiegel am ersten Lebenstag und dem Auftreten einer Hirnblutung ($p=0,002$). Wider

Erwartens zeigte sich dieser Zusammenhang jedoch nicht für den CRP Wert nach 24 Lebensstunden ($p=0,248$).

Zahlreiche vorangegangene Studien geben bereits Hinweise auf ein erhöhtes Risiko für das Auftreten einer IVH bei Frühgeborenen mit einer konnatalen Infektion (DeFelice et al., 2001; Greer et al., 2004; Hagstrom, 2004; Heep et al., 2001; Weeks et al., 1997).

In einer Studie von Heep et al (Heep et al., 2007) konnte nachgewiesen werden, dass ein erhöhter IL-6 Gehalt im Serum am ersten Lebenstag mit dem Ausmaß einer IVH positiv korrelieren. In der Studie wurde gezeigt, dass bei Patienten mit einem Interleukin 6 Spiegel > 100 pg/ml signifikant häufiger schwere Hirnblutungen auftraten (Heep et al., 2007).

Der Leukozytengehalt variiert im Rahmen von entzündlichen Prozessen. Insbesondere bakterielle Infektionen können aufgrund eines erhöhten Leukozytengehalts früh erkannt und entsprechend therapiert werden.

In unserer Studie untersuchten wir den Zusammenhang zwischen dem Leukozytengehalt direkt nach der Geburt und der IVH Inzidenz. Dabei konnten wir jedoch keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen den Parametern Leukozytengehalt und IVH feststellen ($p=0,642$).

Paul et al (Paul et al., 2000) untersuchte 2000 den Gehalt an Leukozyten im Zusammenhang mit dem Auftreten einer IVH. Dabei konnte nicht nur ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Leukozytengehalt des Blutes in den ersten 24 Lebensstunden und der Inzidenz einer IVH nachgewiesen werden, vielmehr konnten Paul et al sogar aufzeigen, dass ein Leukozytengehalt über $25000/\text{mm}^3$ signifikant mit der IVH Inzidenz korreliert.

Aufgrund der unterschiedlichen Zeitpunkte der Messung (direkt nachgeburtlich in unserer Studie, nach 24 Stunden bei Paul et al., 2000) schließen sich die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Studien nicht aus.

Neugeborene und insbesondere Frühgeborene weisen durch den fehlenden Transport von Gerinnungsfaktoren der Mutter über die Plazenta und die eigene Leberenzymunreife ein physiologisch vermindertes Gerinnungspotential auf, dabei sind insbesondere die Vitamin K-abhängigen Faktoren vermindert (Pichler und Pichler, 2008).

In unserer Studie zeigte die IVH Gruppe statistisch signifikant erniedrigte Faktor II Konzentrationen ($p=0,008$) im Vergleich zur Nicht-IVH Gruppe. Einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Faktor VII Gehalt und der IVH-Inzidenz konnten wir in unserer Studie nicht nachweisen ($p=0,222$). Jedoch zeigte sich eine deutliche Tendenz dahingehend, dass

Kinder mit einer IVH niedrigere Faktor VII Gehalte aufweisen als Nicht-IVH Kinder. Auch für den Faktor X-Gehalt konnten wir keinen statistisch signifikanten Zusammenhang feststellen ($p=0,174$). Jedoch war auch hier deutlich, dass Kinder mit einer IVH tendenziell niedrigere Gehalte an Vitamin K-abhängigen Faktoren und somit auch an Faktor X aufweisen, als Kinder ohne IVH.

Erste Arbeiten über das plasmatische Hämostasepotential bei extrem Frühgeborenen < 27. SSW deuten ebenfalls darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen niedrigem Gehalt an Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren und dem Auftreten einer IVH bei Frühgeborenen besteht (Heep et al., 2007).

Das Ergebnis unserer Studie steht bezüglich des Faktor II folglich in Einklang mit der aktuellen Studienlage. Die abweichenden Ergebnisse bezüglich der Faktoren VII und X aus unserer Arbeit und der Studie von Heep aus dem Jahr 2007 sind wahrscheinlich durch die unterschiedlichen Studienkollektive zu erklären. So wurden in der Studie von Heep et al nur Kinder mit einem Gestationsalter <27 SSW untersucht, in unserer Studie jedoch Kinder mit einer Gestationsalter <32 SSW. Die abweichenden Ergebnisse sind daher am wahrscheinlichsten auf die unterschiedliche Reife der Kinder zurückzuführen.

Thrombozyten sind ein wichtiger Bestandteil der Blutgerinnung. Sie vermitteln einen ersten Wundverschluss.

Ein Zusammenhang zwischen der Inzidenz einer IVH und dem Thrombozytengehalt direkt nach der Geburt ($p=0,336$) konnten wir in unserer Studie nicht nachweisen

Studien von Piotrowski (Piotrowski et al., 2009) und Setzer (Setzer et al., 1982) konnten jedoch eine Beziehung zwischen einem erniedrigten Thrombozytengehalt und der Inzidenz einer IVH aufzeigen.

Jedoch unterscheiden sich die Studienkollektive von Piotrowski und Setzer grundlegend von unserem. So schlossen Piotrowski et al nur „extremely low birth weight infants“ (Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht < 1000 g) ein, während sich das Studienkollektiv bei Setzer aus „very low birth weight infants“ (Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht < 1500 g) zusammensetzt. Die Begrenzung des Geburtsgewichtes beinhaltet indirekt auch eine niedrigere Grenze des Gestationsalters, verglichen mit unserem Studienkollektiv. Somit können die unterschiedlichen Ergebnisse der Studien durch die unterschiedlichen Gestationsalter und der damit einhergehenden unterschiedlichen Reifegrade der untersuchten Patienten bedingt sein.

Hämoglobin fungiert als Transportmolekül für Sauerstoff und Kohlendioxid. Innerhalb der ersten drei Lebensmonate nimmt der Hb-Gehalt aufgrund der sistierenden Erythropoese und der Umstellung von fetalem auf das adulte Hämoglobin physiologischerweise ab.

In unserer Studie ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem direkt nach Geburt gemessenen Hämoglobin Gehalt und der Inzidenz einer IVH ($p=0,02$).

Auch Volpe (Volpe, 2008) beschreibt einen Zusammenhang zwischen einem erniedrigten Hb-Gehalt und der IVH-Inzidenz. Ursächlich für die Entwicklung einer IVH bei einer akuten perinatalen Anämie soll dabei die mit der Anämie einhergehende Abnahme des intravasalen Volumens, Erniedrigung der Sauerstoffträger, sowie der damit verbundene verminderte zerebrale Blutfluss sein (Volpe, 2008).

Der $p\text{CO}_2$ Wert ist ein Maß für den Anteil des gelösten Kohlenstoffdioxids im Blut. Die Normwerte liegen bei 35-45mmHg. Der $p\text{CO}_2$ beeinflusst über Vasokonstriktion (bei einem tiefen $p\text{CO}_2$) und Vasodilatation (bei einem hohen $p\text{CO}_2$) direkt die Durchblutungsmenge des Gehirns.

In unserer Studie konnten wir keinen Zusammenhang zwischen den PCO_2 und der Inzidenz einer IVH nachweisen ($p=0,949$).

In der Literatur werden im Gegensatz zu unseren Ergebnissen deutliche Zusammenhänge zwischen Hypoxie, Hyperkapnie sowie dem zerebralen Blutfluss und der Inzidenz einer IVH beschrieben (Obladen et al., 2008). Bei den Ergebnissen zu berücksichtigen bleibt dass in unserer Studie der CO_2 der ersten Blutgasanalyse direkt nach der Geburt verwendet wurde, während in der Literatur Verlaufswerte untersucht wurden.

4.4 Logistische Regressionsanalyse der mit der IVH assoziierten klinischen und laborchemischen Parameter

In dieser Studie war der Faktor II die einzige statistisch unabhängige Variable die mit dem Auftreten der IVH im untersuchten Patientenkollektiv verbunden war. Das heißt dass der Faktor II Gehalt nicht lediglich altersbedingt mit einer IVH korreliert, sondern auch unabhängig vom Gestationsalter ein tiefer Faktor II Gehalt für eine erhöhte IVH Inzidenz spricht. Für die Faktoren VII und X konnten wir diese Unabhängigkeit vom Gestationsalter nicht nachweisen.

5. Zusammenfassung

Der Einfluss von Genpolymorphismen im Vitamin K Stoffwechsel auf ein erhöhtes zerebrales Blutungsrisiko wurde bei Erwachsenen in Studien nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass der Faktor VII Genpolymorphismus, sowie die VKCDF Genmutation (Vitamin K-dependent clotting factor deficiency) zu einem erhöhten Blutungsrisiko führen. Polymorphismen in der GGCX, der VKORC1, dem ApoE und CYP4F2 haben keinen direkten Einfluss auf das Gerinnungspotential, jedoch auf die Individualisierung der Cumarintherapie bei thrombembolischen Erkrankungen.

Die vorliegende Arbeit soll untersuchen, ob die beschriebenen genetischen Polymorphismen einen Einfluss auf die Inzidenz oder das Ausmaß einer intraventrikulären Hirnblutung (IVH) bei Frühgeborenen haben. Im Rahmen dieser prospektiven monozentrischen Pilotstudie wurden alle in der Universitätsklinik Bonn zwischen Mai 2008 und Februar 2010 geborenen Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von <32 SSW untersucht. In der unmittelbar nach der Geburt durchgeführten Routine-Laboruntersuchung wurden vor der prophylaktischen Vitamin K Gabe die arteriellen Blutgaswerte, die Gerinnungsfaktoren II, VII und X, die Blutbildparameter und das Serum IL-6, sowie nach 24 Lebensstunden die CRP Serumkonzentration untersucht. Aus den zellulären Bestandteilen wurde DNA extrahiert, mittels PCR vervielfältigt und durch Sequenzierung genotypisiert. Die Genotypenverteilung und die Allelverteilung der untersuchten Population wurde mit der eines Referenzkollektives verglichen. 24 der untersuchten Probanden entwickelten eine Hirnblutung. Weiterhin wurden klinische Variablen des untersuchten Studienkollektivs im Hinblick auf die Entwicklung einer IVH untersucht.

Unsere Studie konnte keinen Zusammenhang zwischen den untersuchten Genpolymorphismen, und der Inzidenz, respektive dem Ausmaß einer IVH beschreiben. Die Untersuchung der klinischen und laborchemischen Variablen zeigte einen Zusammenhang zwischen perinataler Adaptation (10 Minuten APGAR), PDA, systemischer Inflammation (IL-6 Serumkonzentration), erniedrigten Konzentrationen von Faktor II sowie erniedrigter Hämoglobinkonzentration und der Häufigkeit einer IVH in der untersuchten Patientengruppe.

Bedeutung / Schlussfolgerung: Die Ergebnisse dieser Arbeit, lassen auf ein multifaktorielles Geschehen bei der Entstehung einer IVH bei Frühgeborenen schließen. Die vorgelegte Untersuchung kann keine funktionelle Bedeutung der untersuchten genetischen Einflüsse auf die Entwicklung einer IVH beschreiben. Die Ergebnisse dieser Pilotstudie dienen als Grundlage für

die statistische Konzeption einer darauf aufbauenden multizentrischen Untersuchung.

Literaturverzeichnis

Acarin L, Gonzales B, Castellano B. Neuronal astroglial and microglial cytokine expression after an excitotoxic lesion in the immature rat brain. *Eur J Neurosci* 2000; 12: 3505-3520

Alexander F, Chiu L, Kroh M, Hammel J, Moore J. Analysis of outcome in 298 extremely low-birth-weight infants with patent ductus arteriosus. *J Pediatr Surg* 2009; 441: 112-117

Andrew M, Paes B, Johnston M. Development of the hemostatic system in the neonate and young infant. *J Pediatr Hematol Oncol* 1990; 12: 95-104

Annibale DJ, Hill J, Mac Gilvray S, Windle ML, Carter BS, Wagner CL, Finer NN. Periventricular Hemorrhage – Intraventricular Hemorrhage. 2006; www.emedecine.com/PED/topic2595.htm

Avery ME, Tooley WH, Keller JB, Hurd SS, Bryan MH, Cotton RB, Epstein MF, Fitzhardinge PM, Hansen CB, Hansen TN. Is chronic lung disease in low birth weight infants preventable? A survey of eight centers. *Pediatrics* 1987 ; 79: 26-30

Bancalari E, Abdenour GE, Feller R, Gannon J. Bronchopulmonary dysplasia: clinical presentation. *J Pediatr* 1979 ; 95: 819-823

Bergmann H, Rastetter J. *Klinische Hämatologie*. Stuttgart: George Thieme Verlag, 1993

Biesalsky HK. *Ernährungsmedizin*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1999

Biesalsky HK, Köhrle J, Schümann K. *Vitamine, Spurenelemente + Mineralstoffe - Prävention + Therapie mit Mikronährstoffen*. Stuttgart: Thieme 2002

Blackburn ST. *Maternal, Fetal and Neonatal Physiology – A clinical perspective*. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2003

Bolt RJ, van Weissenbruch MM, Lafeber HN, Delemarre-van de Waal HA. Glucocorticoids and lung development in the fetus and preterm infant. *Pediatr Pulmonol* 2001; 32: 76-91

Brenner B, Sanchez-Vega B, Wu SM, Lanir N, Stafford DW, Solera J. A missense mutation in γ -Glutamyl carboxylase gene causes combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors. *Blood* 1998, 92: 4554-4559

Burstein J, Papile L, Burstein R. Intraventricular hemorrhage and hydrocephalus in premature newborns: A prospective study with CT. *AJR* 1979; 132: 631-635

Caldwell MD, Berg RL, Zhang KQ, Glurich I, Schmelzer JR, Yale SH, Vidaillet HJ, Burmester JK. Evaluation of Genetic Factors for Warfarin Dose Prediction. *Clin.Med. Res* 2007; 5: 8-16

Chou CY, Lin YL, Huang YC, Sheu SY, Lin TH, Tsay HJ, Chang GG, Shiao MS. Structural variation in human Apolipoprotein E3 and E4: secondary structure, tertiary structure, and size distribution. *Biophys J* 2005; 88: 455-466

Chu PH, Huang TY, Williams J, Stafford DW. Purified vitamin K epoxide reductase alone is sufficient for conversion of vitamin K epoxide to vitamin K and vitamin K to vitamin KH_2 . *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 19308-19313

Colman RW, Marder VJ, Clowes AW, George JN, Goldhaber SZ. Hemostasis and Thrombosis – Basic Principles and clinical practice. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins 2006

Corral J, Iniesta J.A., Gonzalez-Conejero R, Villalón M, Vicente V. Polymorphisms of clotting factors modify the risk for primary intracranial hemorrhage. *Blood* 2001; 97: 2979-2982

Cooke RW. Factors associated with periventricular haemorrhage in very low birthweight infants. *Arch Dis Child* 1982; 56: 425-431

Dam Henrik. Vitamin K, das fettlösliche antihämorrhagische Vitamin. In: Walter J, HERSG. *Angewandte Chemie*; Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 1937; 42: 807-811

D`Andrea G, D`Ambrosio RL, Di Perna P, Chetta M, Santacroce, Brancaccio V, Grandone E, Margaglione M. *Blood* 2005, 105: 645-649

Darghouth D, Hallgren KW, Shtofman RL, Mrad A, Gharbi Y, Maherzi A, Kastally R, LeRicousse S, Berkner KL, Rosa JP. Compound heterozygosity of novel missens mutations in the gamma-glutamyl-carboxylase gene causes hereditary combined vitamin K dependent coagulation factor deficiency. *Blood* 2006; 108: 1925-1931

Deeg KH, Staud F, Rhoden LV. Klassifikation der intrakraniellen Blutungen des Frühgeborenen. *Ultraschall Med* 1999; 20: 165-170

DeFelice C, Toti P, Laurini RN, Stumpo M, Picciolini E, Todros T, Tanganelli P, Buenocore G, Bracci R. Early neonatal brain injury in histologic chorioamnionitis. *J Pediatr* 2001; 138: 101-103

Fanaroff AA, Stoll BJ, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Stark AR, Bauer CR, Donovan EF, Korones SB, Laptook AR, Lemons JA, Oh W, Papile LA, Shankaran S, Stevenson DK, Tyson JE, Poole WK. Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 196: 147-148

Fowlie PW, Davis PG, McGuire W. Prophylactic intravenous indomethacin for preventing mortality and morbidity in preterm infants. *Database Syst Rev* 2010; 174

Geisen C, Watzka W, Sittinger K, Steffens M, Daugela L, Seifried E, Müller CR, WienkeTF, Oldenburg J. VKORC1 haplotypes and their impact on the inter-individual and inter-ethnic variability of oral anticoagulation. Stuttgart: Schattauer GmbH, 2005

Greer JP, Frester J, Lenkens JN, Rodgars GM, Paraskevas F, Glader B. *Wintrobe`s Clinical Hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams + Wilkins, 2004

Greisen G, Andreasen RB. Recombinant factor VIIa in preterm neonates with prolonged prothrombin time. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2003; 14: 117-120

Gomez R, Romero R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Berry SM. The fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 194-202

Hamrick SE, Hansmann G. Patent ductus arteriosus of the preterm infant. *Pediatrics* 2010; 125: 1020-1030

Hassan HJ, Leonardi A, Chelucci C, Mattia G, Macioce G, Guerriero R, Russo G, Mannucci PM, Peschle C. Blood Coagulation factors in human embryonic-fetal development: preferential expression of the FVII/Tissue factor pathway. *Blood* 1990; 76: 1158-1164

Hunault M, Arbini AA, Lopaciuk S, Carew JA, Bauer KA. The Arg³⁹⁵Gln Polymorphism reduces level of coagulation factor VII. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1997; 2825-2829

Hagstrom JN, Pathophysiology of Bleeding Disorders in the Newborn. In: Polin RA, Fox WW, Abman SH, HRSG. *Fetal and Neonatal Physiology*. Philadelphia: Saunders 2004; 1447-1459

Heep A, Dembinski J, Kau N, Stiller S, Bartmann P. Neonatal inflammatory response: early serum interleukin-6 (IL-6) predicts cerebral morbidity in premature infants < 28 weeks of gestational age. *Biol Neonate* 2001; 80: 321

Heep A, Knöpfle G, Wisskirchen M, Franz AR, Kutz P, Müller A, Bartmann P, Groneck P, Roll C. Bedeutung der systemischen Inflammation und postnatalen hämodynamischen Adaptation für die Entwicklung der intraventrikulären Hirnblutungen bei extrem Frühgeborenen <27 SSW. *Z Geburtshilfe Neonatol* 2007; 211

Heep A, Müller A, Traut C, Stoffel-Wagner B, Franz AR, Oldenburg J, Bartmann P, Hertfelder HJ. Einfluss perinataler Faktoren auf das plasmatische Hämostasepotential von extrem Frühgeborenen. *Z Geburtshilfe Neonatol* 2007; 211: 28

Heep A, Beherendt D, Bartmann P, Fimmers R, Dembinski J, Nitsch P. Increased serum levels of interleukin 6 are associated with severe intraventricular haemorrhage in extremely premature infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003; 88: 501-504

Kohlmeier M, Salomon A, Saupe J, Shearer MJ. Transport of Vitamin K to Bone in Human. *Journal of Nutrition* 1996; 126: 1192-1196

Koichi I, Kenji G, Tokio S, Kanji M, Toshihiro A, Hiroko M, Takao Y, Kohachiro S, Jajime T. Polymorphisms of the Factor VII Gene associated with the low activities of vitamin K-dependent coagulation factors in one-month-old infants. *Exp Med* 2007; 211: 1-8

Lamson DW, Plaza SM. The anticancer effects of vitamin k. *Alternative Medicine Review*, 2003; 8: 303-318

Lee JY, Kim HS, Jung E, Kim ES, Shim GH, Lee HJ, Lee JA, Choi ChW, Kim E-K, Kim BI, Choi J-H. Risk Factors for Periventricular-Intraventricular Hemorrhage in Premature Infants. *J Korean Med Sci* 2010; 25: 418-424

Li W, Schulman S, Dutton RJ, Boyd D, Beckwith J, Rapoport TA. Structure of a bacterial homologue of vitamin K epoxide reductase. *Nature* 2010; 463: 507-512

Lichtman MA, Kipps TJ, Kaushansky K, Beutler E, Seligsohn U, Prchal JT. *Williams Hematology*. New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division, 2006

Linder N, Haskin O, Levit O, Klinger G, Prince T, Naor N, Turner P, Karmazyn B, Sirota L. Risk factors for intraventricular hemorrhage in very low birth weight premature infants; a retrospective case control study. *Pediatrics* 2003; 111: 590-595

Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988; 240: 622-630

Manco-Johnson MJ. Pathophysiology of Neonatal Disseminated Intravascular Coagulation and Thrombosis. In: Polin RA, Fox WW, Abman SH, HRSG. Fetal and Neonatal Physiology. Philadelphia: Saunders 2004: 1460-1473

Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh MC. Fanaroff and Martins – Neonatal – Perinatal – Medicine- Diseases of the fetus and infant. Philadelphia: Mosby Elsevier Inc, 2006

McCrea HJ, Ment LR. The Diagnosis, Management and Postnatal Prevention of Intraventricular Hemorrhage in the Preterm Neonate. Clin Perinatol. 2008; 35: 777

McDonald MG, Mullett MD, M.K. Seshia. Avery's Neonatology – Pathophysiology + Management of the Newborn. Philadelphia: Lippincott Williams + Wilkins, 2005

McDonald MG, Rieder MJ, Nakano M, Hsia CK, Rettie AE. CYP4F2 is a vitamin K1 oxidase: An explanation for altered warfarin dose in carriers of the V433M variant. Mol Pharmacol 2009; 1337-1346

McIntosh N, Herms P, Smyten R. Forfar und Arneil's Textbook of Pediatrics. London: Elsevier, 2003

Metzler DE. Biochemistry; The chemical reactions of living cells (Volume 1 / Volume 2). Philadelphia: Elsevier, 2003

Mohamed MA, Aly H. Male gender is associated with intraventricular hemorrhage. Pediatrics 2010; 125: 333-339

Monagle P, Hagstrom JN. Developmental Hemostasis. In: Polin RA, Fox WW, Abman SH, HRSG. Fetal and Neonatal Physiology. Philadelphia: Saunders 2004; 1435-1447

Mutucuarana VP, Acher F, Straight DL, Jin DY, Stafford DW. A Conserved Region of Human Vitamin K-dependent Carboxylase between Residues 393 and 404 is Important for Its Interaction with the Glutamate Substrate. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 46488-46493

Newman P, Bonello F, Wierzbicki AS, Lumb P, Savidge GF, Shearer MJ. The uptake of lipoproteine borne phylloquinon (vitamin k1) by osteoblasts and osteblast-like cells: a role of heparan-sulfate proteoglycans and apolipoprotein e. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 426-433

Obladen M, Metze B, Henrich W, Aktas A, Czernik C, Schulz-Baldes A. Interdisciplinary surveillance of intraventricular haemorrhage associated conditions in infants <1000 g. *Acta Paediatr.* 2008; 97: 731-737

Oldenburg J, Marinova M, Müller-Reible C, Watzka M. The vitamin k cycle. *Vitamins and Hormons* 2008; 78: 23-33

Oldenburg J, Bevans C.G, Müller C.R., Watzka M. Vitamin K Epoxide Reductase Complex Subunit 1 (VKORC1): The Key Protein of the Vitamin K Cycle, *Antioxidants&Redox signaling* 2006; 8: 343-357

Paneth N, Pinto-Martin J. The epidemiology of germinal matrix/intraventricular hemorrhage. In Kiely M, HRSG. *Reproduction and Perinatal Epidemiology*. Boston: CRC Press 1990; 371-400

Paneth N, Rudelli R, Kazam E, Monte W. *Brain Damage in the preterm infant*. London: MacKeith Press, 1994; 171-185

Papile L, Burstein J, Burstein R, Koffer H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage. A study of infants with birth weight less than 1500 grams. *J Pediatr* 1978; 92: 529-534

Paul DA, Leef KH, Stefano JL. Increased leukocytes in infants with intraventricular hemorrhage. *Pediatr Neurol* 2000; 22: 194-199

Pichler E, Pichler L. The neonatal coagulation system and the vitamin K deficiency bleeding – a review. *Wien Med Wochenschr* 2008; 15: 385-395

Piotrowski A, Dabrowska-Wojciak I, Mikinka M, Fendler W, Walas W, Sobala W, Kuczkowski KM. Coagulation abnormalities and severe intraventricular hemorrhage in extremely low birth weight infants. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2009; 15: 1-6

Rieder MJ, Reiner AP, BF Gage, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL, Blough DK, Thummel KE, Veenstra DL, Rettie AE. Effect of *VKORC1* Haplotypes on Transcriptional Regulation and Warfarin Dose. *N Engl J Med* 2005; 352: 2285-2293

Rost S, Fregin A, Koch D, Compes M, Müller CM, Oldenburg J. Compound heterozygous mutations in the *c*-glutamyl carboxylase gene cause combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors. Blackwell Publishing Ltd, *British Journal of Haematology* 2004; 126: 546–549

Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hörtnage C, Pelz H-J, Lappégard K, Seifried E, Scharrer I, Tuddenham EGD, Müller C.R, Strom T.M., Oldenburg J. Mutations in *VKORC1* cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 2004; 427: 537-541

Rost S, Geisen C, Fregin A, Seifried E, Müller CR, Oldenburg J. Founder mutation Arg485Pro led to recurrent compound heterozygous *GGCX* genotypes in two German patients with VKCFD type 1. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2006; 17: 503-507

Runge MS, Patterson C. *Principels of Molecular Medicine*. New Jersey: Humana Press Inc, 2006

Sarkar S, Bhagat I, Dechert R, Schumacher RE, Donn SM. Severe intraventricular hemorrhage in preterm infants: comparison of risk factors and short-term neonatal morbidities between grade 3 and grade 4 intraventricular hemorrhage. *Am J Perinatol*. 2009; 26: 419-424

Sarkar S, Kaplan C, Wiswell TE, Spitzer AL. Histological Chorioamnionitis and the Risk of Early Intraventricular Hemorrhage in Infants Born ≤ 28 Weeks Gestation. *Journal of Perinatology* 2005; 25: 749–752

Saupe J, Shearer MJ, Kohlmeier M. Phylloquinon transport and its influence on gamma-carboxyglutamate residues of osteocalcin in patients on maintenance hemodialysis. *Am J Clin Nutr* 1993; 58: 204-209

Setzer ES, Webb IB, Wassenaar JW, Reeder JD, Mehta PS, Eitzman DV. Platelet dysfunction and coagulopathy in intraventricular hemorrhage in the premature infant. *J Pediatr.* 1982; 100: 599-605

Sitzmann FC. Pädiatrie Duale Reihe. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2007

Stanimirovic D, Satoh K. Inflammatory Mediators of Cerebral Endothelium. *Brain Pathology* 2000; 10: 113-126

Steiner T, Diringer MN, Schneider D, Mayer SA, Begtrup K, Broderick J, Skolnick BE, Davis SM. Dynamics of intraventricular hemorrhage in patients with spontaneous intracerebral hemorrhage: risk factors, clinical impact, and effect of hemostatic therapy with recombinant activated factor VII. *Neurosurgery* 2006; 59: 767-773

Stulc T, Ceska R, Horinek A, Stepan J. Bone mineral density in patients with apolipoprotein typ 2/2 an 4/4 genotype. *Physiol. Research* 2000; 49: 435-439

Suter S, Westhofen P, Poralla C, Müller A, Bartmann P, Watzka M, Hertfelder HJ, Oldenburg J, Heep A . A functional single nucleotide polymorphism in the Vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase gene (exon 8 ARG325GLN) is associated with intraventricular hemorrhage in preterm infants. *Acta Paediatrica* 2009; 460: 153

Taeusch HW, Ballart RA, Gleason CA. *Avery's Diseases of the Newborn*. Philadelphia: Saunders, 2005

Tioseco J. A., Aly H, Essers J, Patel K, El-Mohandes A. Male sex and intraventricular hemorrhage; *Pediatric Critical Care Medicine* 2006; 7: 40-44

Veldman A, Josef J, Fischer D, Volk W. A prospective pilot study of prophylactic treatment of preterm neonates with recombinant activated factor VII during the first 72 hours of life. *Pediatric Critical Care Medicine* 2006; 7: 34-39

Volpe J. *Neurology of the Newborn*; Philadelphia: Saunders Elsevier, 2008

Wadelius M, Chen LY, Eriksson N, Bumpstead S, Ghori J, Wadelius C, Bentley D, Mc.Ginnis R, Deloukas P. Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism. *Hum Genet* 2007; 121: 23-34

Wallin R, Hutson SM. Vitamin K Metabolism in the Fetus and Neonate. In: Polin RA, Fox WW, Abman SH, HRSG. *Fetal and Neonatal Physiology*. Philadelphia: Saunders 2004; 369-379

Watzka M, Westhofen P, Hass M, Marinova M, Pötzsch B, Oldenburg J. Polymorphisms in VKORC1 and GGCX are no major genetic regulators of vitamin K dependent coagulation factor activity in Western Germans. *Thromb Haemost* 2009; 102: 418-420

Weeks JW, Reynolds L, Taylor D, Lewis J, Wan T, Gall SA. Umbilical cord blood interleukin-6 levels and neonatal morbidity. *Obstet Gynecol* 1997; 90: 815-818

Weintraub MS, Eisenberg S, Breslow JL. Dietary fat clearance in normal subjects is regulated by genetic variation of apolipoprotein e. *J Clin Invest* 1987; 80: 1571-1577

Weston BW, Monahan PE. Familial deficiency of vitamin K-dependent clotting factors. *Haemophilia* 2008; 14: 1209-1213

Yan L, Zhou B, Nigdikar S, Wang X, Benett J, Prentice A. Effect of apolipoprotein E genotype on vitamin k status in healthy older from China and the UK. *British journal of nutrition* 2005; 94: 956-964

Yoon BH, Jun JK, Romero R, Park KH, Gomez R, Choi JH, Kim IO. Amniotic fluid inflammatory cytokines (interleukin-6, interleukin-1 β , and tumor necrosis factor-a), neonatal brain white matter lesions, and cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 19-26

Danksagung

.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, PD. Dr. med. Axel Heep, der mir während meiner Arbeit mit viel Geduld und wertvollen Ratschlägen entgegenkam und somit maßgebend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ebenfalls besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. med. Christine Poralla und Dr. rer. nat. Philipp Westhofen, die mich sowohl fachlich jederzeit hilfsbereit unterstützt, als auch stetig motiviert haben.

Auch meiner Familie, die mich während des Studiums und der Doktorarbeit in jeglicher Hinsicht unterstützt und motiviert hat, gilt besonderer Dank.

Desweiteren möchte ich mich für die Unterstützung bei meiner Arbeit bei Prof. Dr. med. Johannes Oldenburg, Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. P. Bartmann und Dr. rer. nat. Matthias Watzka bedanken.

Auch sämtlichen Mitarbeitern der Abteilung Neonatologie sowie des Instituts für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, gilt besonderer Dank.