

Aus dem Zentrum für Experimentelle Medizin, Institut für Medizinische Biochemie
und Molekularbiologie II des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Molekulare Zellbiologie

Direktorin: Frau Prof. Dr. U. Beisiegel

und aus dem Zentrum für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin des
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie

Direktor: Herr Prof. Dr. R. Schneppenheim

Nicht-Transferrin gebundenes Eisen in der Behandlung von Thalassämien mit Eisenchelatoren

(Non-Transferrin Bound Iron in the Treatment of
Thalassaemias with Iron Chelators)

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Ulrike Lund
aus Rostock

Hamburg 2005

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Thalassämie	1
1.1.1	Vorkommen	1
1.1.2	Genetik und Klinik.....	1
1.2	Eisenmetabolismus bei der Thalassämie.....	5
1.2.1	Eisenstoffwechsel.....	5
1.2.2	Eisenüberladung.....	6
1.3	NTBI, Freie Radikale, Antioxidantien	7
1.4	Therapie der Thalassämie.....	10
1.5	Problemstellung.....	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Patienten.....	14
2.1.1	Patienten zur Reproduzierbarkeit der standardisierten NTBI-Bestimmung und der Kobalt-Sättigungsmethode	14
2.1.2	Patientengruppe für die Messung der NTBI-Kinetik als Funktion der Erythropoese während eines Transfusionsintervalls	14
2.1.3	Patientengruppen für den Vergleich der alternierenden Chelatortherapie mit Desferrioxamine und Deferiprone zur Desferrioxamine-Monotherapie in der Behandlung der Eisenüberladung bei Thalassämien	16
2.2	Messmethoden und Laborparameter.....	17
2.2.1	Eisen- und Volumen-Bestimmung in den Organen Leber und Milz	17
2.2.2	Blutparameter	18
2.3	NTBI.....	20
2.3.1	Standardisierte NTBI-Bestimmung.....	20
2.3.2	Kobalt-Sättigungsmethode zur NTBI-Bestimmung.....	22
2.4	Statistische Methoden.....	23
3	Ergebnisse	24
3.1	Reproduzierbarkeit der standardisierten NTBI-Bestimmung	24
3.1.1	NTBI-Bestimmung in Serie	24
3.1.2	NTBI-Bestimmung über einen Zeitraum von 2 Jahren.....	25

3.1.3	<i>Kobalt-Sättigungsmethode</i>	25
3.1.4	<i>NTBI-Doppelbestimmung von Seren am gleichen Tag</i>	25
3.1.5	<i>NTBI-Reproduzierbarkeit in Seren nach 1 Jahr</i>	26
3.2	<i>Messung der NTBI-Kinetik als Funktion der Erythropoese während eines Transfusionsintervalls</i>	27
3.2.1	<i>NTBI-Kinetiken einzelner Patienten aus Catania (Gruppe 1) und Hamburg (Gruppe 2)</i>	28
3.2.2	<i>Parameter der erythropoetischen Aktivität</i>	32
3.2.3	<i>Darstellung der Entzündungsparameter in Abhängigkeit vom NTBI</i>	34
3.3	<i>NTBI unter der alternierenden Chelatortherapie mit Desferrioxamine und Deferiprone im Vergleich zur Desferrioxamine-Monotherapie in der Behandlung der Eisenüberladung bei Thalassämie-Patienten</i>	36
3.3.1	<i>Eisenparameter</i>	36
3.3.2	<i>Eisen- und Volumenbestimmung in Leber und Milz</i>	37
3.3.3	<i>Serumeisen und Transferrinsättigung</i>	39
3.3.4	<i>NTBI in Bezug zum Transfusionsintervall</i>	39
3.3.5	<i>NTBI in Abhängigkeit von der Eisenüberladung, dem Therapieregime und der Splenektomie</i>	43
3.3.6	<i>Chelatorwirksamkeit</i>	48
4	Diskussion	49
4.1	<i>Diskussion der angewandten Methoden</i>	49
4.1.1	<i>NTBI-Bestimmung</i>	49
4.1.2	<i>Lebereisenkonzentration</i>	50
4.2	<i>Diskussion der Ergebnisse</i>	51
4.2.1	<i>NTBI</i>	51
4.2.2	<i>NTBI und die Beziehung zu anderen Eisenparametern</i>	52
4.2.3	<i>NTBI und die Abhängigkeit von der Erythropoese</i>	53
4.3	<i>Effektivität der Chelatortherapie mit Desferrioxamine und Deferiprone</i>	55
5	Zusammenfassung	58
	Summary	60
6	Literaturverzeichnis	62

7	Anhang	71
A I	<i>Patientendaten (Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht, Diagnose) der Patientengruppe für die Messung der NTBI-Kinetik als Funktion der Erythropoese während eines Transfusionsintervalls</i>	71
A II	<i>Patientendaten und Entzündungsparameter (DFO-/DFP-Dosis, HCV Status, ALT, BSG) der NTBI-Kinetik</i>	72
A III	<i>Blutwerte (Serumeisen, Transferrinsättigung) der Patienten der NTBI-Kinetik</i>	72
A IV	<i>Blutwerte (NTBI, Ferritin) der Patienten der NTBI-Kinetik</i>	73
A V	<i>Blutwerte (Hämoglobin, Serumtransferrinrezeptor, Retikulozyten) der Patienten der NTBI-Kinetik</i>	74
A VI	<i>Leber- und Milzwerte der Patienten der NTBI-Kinetik</i>	74
A 1	<i>Patientendaten (Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht, Diagnose) der Vergleichsstudie: DFO-Monotherapie und DFO / DFP-Kombinationstherapie</i>	75
A 2	<i>Patientendaten (DFO-/DFP-Dosis, HCV Status, ALT) der Vergleichsstudie: DFO-Monotherapie und DFO / DFP-Kombinationstherapie</i>	77
A 3	<i>Blutwerte (NTBI, Serumeisen, Transferrinsättigung, Ferritin) der Patienten der Vergleichsstudie der DFO-Monotherapie und DFO / DFP-Kombinationstherapie</i> ...	79
A 4	<i>Leber- und Milzwerte der Patienten der Vergleichsstudie der DFO-Monotherapie und DFO / DFP-Kombinationstherapie</i>	81
A 5	<i>Eisenbilanz (Gesamtkörper-Speichereisen, spezifisches Gesamtkörper-Speichereisen, transfundiertes Eisen, Gesamtkörper-Speichereisen-Eliminationsrate) der Patienten der Vergleichsstudie der DFO-Monotherapie und DFO / DFP-Kombinationstherapie</i>	83
8	Danksagung	86
9	Lebenslauf	87

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Lipidperoxidation	8
Abb. 2: Zeit zwischen Chelatortherapie-Ende und Blutentnahme (a) und Zeit zwischen letzter Transfusion und Blutabnahme (b) für die Patientengruppen aus Cagliari und Turin	16/17
Abb. 3: Variation des NTBIs in Doppelbestimmungen von Seren am gleichen Tag bei Thalassämie-Patienten, Beobachtungszeitraum = 2 Jahre	26
Abb. 4: Variation des NTBIs in Doppelbestimmungen zum Zeitpunkt 0 y und 1 y in Seren von Thalassämie-Patienten	26
Abb. 5: NTBI- und Serumeisen (SI)-Kinetik in den Gruppen 1 (Hamburg) und 2 (Catania) der Patienten mit β -Thalassämie major unter Chelatortherapie (Blutentnahme nach einem mindestens 12-stündigen chelatorfreiem Intervall) in einem Transfusionsintervall (Median \pm 0,25 Perzentile).....	27
Abb. 6: NTBI-Kinetiken der Gruppe 1 (Catania) während eines Transfusionsintervalls unter Chelatortherapie	28
Abb. 7: NTBI-Kinetiken der Gruppe 2 (Hamburg) während eines Transfusionsintervalls unter Chelatortherapie	29
Abb. 8: NTBI-Kinetik während zweier Transfusionsintervalle eines β -Thalassämiepatienten, 1. Intervall unter Chelatortherapie, nach 14 Wochen 2. Intervall ohne Chelatortherapie, 22 y, weiblich, LIC = 980 μ g /g Leber	30
Abb. 9: NTBI-Kinetik während zweier Transfusionsintervalle, 1. und 2. Intervall unter Chelatortherapie im Abstand von 13 Wochen, eines β -Thalassämiepatienten, 10 y, weiblich, LIC = 1100 μ g/g Leber	31
Abb.10: Erythropoetische Aktivität (sTfR) und NTBI, t = 0, (3), 4 entsprechen den Zeitpunkten vor der Transfusion, t = 1, 2, (3) sind Messpunkte zwischen den Transfusionen. (t= 0 - vor der Transfusion, t= 1 – 7 \pm 2 Tage, t= 2 – 14 \pm 2 Tage, t= 3 – 21 \pm 2 Tage, t= 4 28 \pm 2 Tage nach der Transfusion).....	32
Abb.11: Darstellung der Beziehung des Serumtransferrinrezeptors (sTfR) zum Hämoglobin (Hb), t=0, (3), 4 entsprechen dem Prä-Transfusions-Hb, t=1, 2, (3) sind Messpunkte zwischen den Transfusionen	33
Abb.12: Korrelation zwischen Serumtransferrinrezeptor (sTfR) und Retikulozytenzahl	33
Abb.13: Der Vergleich zwischen NTBI und Hämoglobin (Hb) zeigte keine signifikante Korrelation innerhalb eines Transfusionsintervalls	34
Abb.14: NTBI in Abhängigkeit von der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit.....	35
Abb.15: Ferritin in Abhängigkeit von der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (ESR).....	35
Abb.16: Korrelation der Lebereisenkonzentration nach logarithmischer Transformation bei Beginn mit der nach einem Jahr: DFO-Monotherapie und DFO / DFP-Kombinationstherapie	37

Abb.17: Lebervolumen-Vergrößerung bei 59 Patienten mit β -Thalassämie major als Funktion der Lebereisenkonzentration unter DFO-Monotherapie und DFO / DFP-Kombinationstherapie	38
Abb.18: NTBI unter DFO-Monotherapie und kombinierter DFO / DFP-Therapie bei Beginn der Studie (1) und nach einem Jahr (2) in der Athener-Patientengruppe	40
Abb.19: NTBI unter DFO-Monotherapie und DFO / DFP-Kombinationstherapie bei Beginn der Studie und nach einem Jahr bezüglich des Blutentnahmezeitpunktes zur letzten Transfusion in der Turin- und Cagliari-Patientengruppe. (a) höhere NTBI-Werte am Ende des Transfusionsintervalls, (b): gleich bleibende NTBI-Konzentrationen im Transfusionsintervall, (c): niedrigere NTBI-Werte am Ende des Transfusionsintervalls, (d): verschiedene NTBI-Werte zum gleichen Zeitpunkt \pm 2 Tage im Transfusionsintervall	41/42
Abb.20: Korrelation zwischen NTBI und Serumeisen (SI) in den Patientengruppen aus Turin und Cagliari	43
Abb.21: Korrelation zwischen NTBI und Serumeisen in der Patientengruppe aus Athen	44
Abb.22: Vergleich zwischen NTBI und Transferrinsättigung in der Patientengruppe aus Turin und Cagliari	45
Abb.23: Vergleich zwischen NTBI und Transferrinsättigung in der Patientengruppe aus Athen	45
Abb.24: Lebereisenkonzentration (LIC) und NTBI bei Patienten aus Turin und Cagliari mit β -Thalassämie major in Abhängigkeit von der Lebereisenkonzentration unter der DFO-Monotherapie und DFO/DFP-Kombinationstherapie	46
Abb.25: Lebereisenkonzentration (LIC) und NTBI bei Patienten aus Athen mit β -Thalassämie major in Abhängigkeit von der Lebereisenkonzentration unter der DFO-Monotherapie und DFO/DFP-Kombinationstherapie	47
Abb.26: Gesamtkörper-Speichereisen-Eliminationsrate (TBIE) unter DFO-Monotherapie und DFO/DFP-Chelatortherapie: TBIE(DFO) = $21,7 \pm 4,8$ mg Fe/d, TBIE(DFO / DFP) = $22,5 \pm 5,3$ mg Fe/d	48

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Patientendaten der NTBI-Kinetik während eines Transfusionsintervalls	15
Tab. 2: Heizprogramm der AAS	21
Tab. 3: Variation von 2 Seren (B, C) in einer Bestimmung	24
Tab. 4: Variation von 3 Seren (A, B, C), Beobachtungszeitraum 2 Jahre	25
Tab. 5: Medianwerte der Eisenstoffwechselfparameter von 59 Patienten mit β -Thalassämie major in der alternierenden Chelatortherapie mit Desferrioxamine und Deferiprone im Vergleich zur Desferrioxamine-Monotherapie. Signifikante Unterschiede zwischen den Medianwerten zu Beginn (baseline) und am Ende der Studie (after 1 y) wurden mit dem Wilcoxon-Test für gepaarte Daten geprüft (p (W))	36

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomic absorption spectroscopy (Atomabsorptionsspektroskopie)
ALT	Alanin-Aminotransferase
DCT	Divalent cation transporter
DFO	Desferrioxamine (Desferal®)
DFP	Deferiprone (Ferriprox®)
DMT	Divalent metal transporter
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonuclein Acid-DNA)
ELISA	Enzym-linked-immunosorbent assay
ESR	Erythrocyte sedimentation rate (Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit)
Hb	Hämoglobin
HCV	Hepatitis C Virus
HNO ₃	Salpetersäure
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochdruckflüssigkeitschromatografie)
IRE	Iron responsive element (Eisen responsives Element)
IRP	Iron regulatory protein (Eisen regulierendes Protein)
LIC	Liver iron concentration (Lebereisenkonzentration)
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure (Messenger Ribonuclein Acid)
n	Anzahl
NTA	Nitrilotriacetic acid
NTBI	Nicht-Transferrin gebundenes Eisen
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
RES	Retikulo-endotheliales System
SF	Serumferritin
SI	Serum iron (Serumeisen)
SIC	Spleen iron concentration (Milzeisenkonzentration)
SQUID	Superconducting Quantum Interference Device
sTfR	Soluble transferrin receptor (Löslicher Transferrinrezeptor)
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure (Transfer Ribonuclein Acid)
TBI	Total body iron (Gesamtkörper-Speichereisen)
TBIE	Total body iron elimination rate (Gesamtkörper-Speichereisen-Eliminationsrate)
TEBK	Totale Eisenbindungskapazität
Tfs	Transferrinsättigung
TrFe	Transfundiertes Eisen
3'UTR	3'untranslated Region der mRNA
UEBK	Ungesättigte Eisenbindungskapazität
SD	Standardabweichung

COV	coefficient of variation (Variationskoeffizient)
r	Korrelation
r ²	Bestimmtheitsmaß
p	Signifikanz
t	Zeit [Sekunde: sec.; Stunde: h; Tag/day: d; Jahr/year: y]
π	griechisch Pi
α, γ, β, δ	Hämoglobinketten

1 Einleitung

1.1 Thalassämie

1.1.1 Vorkommen

Die Thalassämie (Synonym Mittelmeeranämie) ist eine Hämoglobinopathie, bei der die Bildung chemisch normaler Peptidketten quantitativ aufgrund eines genetischen Defektes der α - oder β -Kette vermindert ist. Daraus ergeben sich die 2 Formen α - und β -Thalassämie. Es ist eine autosomal rezessiv erbliche hypochrome, mikrozytäre Anämie. Die Erkrankung nimmt bei homozygoten Merkmalsträgern (Thalassaemia major) einen schweren Verlauf, bei heterozygoten (Thalassaemia minor) hingegen einen milden. Die β -Thalassaemia major oder Cooley-Anämie wurde zuerst von Cooley 1925 in Detroit beschrieben.

Die Verteilung der Hämoglobinopathien deckt sich nahezu mit den Malariagebieten (Malaria tropica: Erreger Plasmodium falciparum) (Modell et al., 1984). Die Resistenz gegen das Plasmodium falciparum wurde von Luzzatto bei Homo- und Heterozygotenstatus der Thalassämie nachgewiesen (Luzzatto et al., 1979). In den Ländern des Mittelmeers und des Arabischen Golfs gibt es mehr als 200000 β -homozygote Thalassämiepatienten. In Provinzen Griechenlands, Italiens, dem Süden Russlands, in Indien und Südostasien sind 10 bis 15 % β -Thalassämie-Gen-Träger, mit einer Inzidenz der homozygoten β -Thalassämie zwischen 1 : 150 bis 1 : 200 (Lucarelli et al., 1995).

Die Anämie wird heutzutage mit regelmäßigen Bluttransfusionen therapiert. Dadurch kommt es sekundär zu einer Transfusionssiderose, die dann mit Eisenchelatoren (z. B. Desferrioxamine) behandelt werden kann. Eine Heilung ist nur durch eine Knochenmarktransplantation möglich.

1.1.2 Genetik und Klinik

Normalerweise setzt sich das Hämoglobin (Hb) aus 4 Proteinuntereinheiten zusammen, die je eine Hämgruppe binden, d.h. aus 2 α -Ketten mit je 141 Aminosäuren und 2 β -Ketten mit je 146 Aminosäuren. Die beiden α -Gene werden auf Chromosom 16 und die Gene für Nicht- α -Ketten (γ , β , δ) auf Chromosom 11 kodiert. Die physiologischen Hämoglobine sind das adulte Hb A und das fetale Hb F, die je 2 identische Peptidketten aufweisen: 96 - 98 % Hb A₁ ($\alpha_2\beta_2$),

< 3 % Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) und Hb F ($\alpha_2\gamma_2$). Letzteres kommt beim Neugeborenen dominant, aber beim Erwachsenen < 1 % vor.

Am häufigsten ist die β -Thalassämie. Das Hb A₁ ($\alpha_2\beta_2$) ist aufgrund der quantitativ geringen β -Kettenbildung vermindert. Kompensatorisch kommt es zu einer Steigerung des Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) und Hb F ($\alpha_2\gamma_2$). Die Störung der Hämoglobinsynthese bei den Thalassämiesyndromen führt zu schweren Defekten in der Produktion und dem Überleben der Erythrozyten. Als Folge der Hämolyse und der ineffektiven Erythropoese entwickelt sich eine chronische Anämie und eine kompensatorische Knochenmarkhyperplasie.

Den meisten Thalassämien liegt eine Punktmutation zugrunde. In der Desoxyribonukleinsäure (**D**esoxyribonuclein **A**cid-DNA) unterbrechen Introns die kodierenden Extrons. Bei der Transkription der Messenger-Ribonukleinsäure (**M**essenger **R**ibonuclein **A**cid-mRNA) werden im Zellkern aus der DNA durch die RNA-Polymerase die Introns herausgeschnitten, und es entsteht die mRNA. Diese wird dann bei der Translation im Zytoplasma mittels Transfer-Ribonukleinsäure (**T**ransfer **R**ibonuclein **A**cid-tRNA), dem sogenannten genetischen Code, in die Aminosäuresequenz des Genproduktes überführt.

α -Thalassämien:

Es gibt vier α -Globingene, davon sind je zwei auf Chromosom 16 lokalisiert. Meistens werden die α -Thalassämien durch eine Deletion im Rahmen eines Crossovers auf einem oder beiden α -Globingenen verursacht (Weatherall et al., 2001).

Daraus ergeben sich folgende Formen: Eine extrem milde Form stellt die α -2 oder α^+ -Thalassämie dar. Hier liegt ein heterozygoter Status mit einem fehlenden α -Globingen, auch „silent carrier“ genannt, vor. Die α -1 oder α^0 -Thalassämie oder Thalassämie minor wird als der homozygote Status mit zwei fehlenden α -Globingenen definiert. Bei beiden Formen besteht ein partieller Mangel bei der α -Kettensynthese mit minimaler Mikrozytose und Kettenungleichgewicht im heterozygoten und etwas stärker im homozygoten Status.

Beim Fehlen von drei α -Globingenen liegt eine schwere Störung in der α -Kettensynthese vor. Die β -Ketten werden im Überschuss gebildet und können sich zu Tetrameren aus β -Ketten zusammenlagern, die Hb-H genannt werden („Hämoglobin-H-Thalassämie“). Die Kinder sind lebensfähig und leiden unter einer hämolytischen Anämie.

Wenn alle vier α -Globingene fehlen, kommt es zum völligen Fehlen der α -Ketten. Es bilden sich Tetramere aus γ -Ketten, die Hb Bart's genannt werden. Die Kinder sind nicht lebensfähig und sterben am Hydrops fetalis (Weatherall et al., 2001). Diese schwere Form der α -Thalassämie major kann jedoch durch intrauterine Bluttransfusionen und eventueller späterer hämatopoetischer Stammzelltransplantation erfolgreich behandelt werden.

β -Thalassämien:

Im Gegensatz zur α -Thalassämie liegt bei der β -Thalassämie meistens eine Punktmutation im β -Globinogen bzw. in den angrenzenden Sequenzen vor. Nach dem Modell von Jacob und Monod gibt es theoretisch 3 Typen von Veränderungen, die die β -Thalassämie-Syndrome begründen könnten: die Mutation oder Deletion von β -Operatorgenen, Kontrollseiten der γ - β Region zwischen den Genen und δ - / β -Strukturgenen (Jacob et al., 1961).

Die Diagnosestellung erfolgt aufgrund der typischen Blutbildveränderungen und mittels Hämoglobinelektrophorese, in der sich eine Zunahme der Hb F- und A2-Bande sowie eine Abnahme der Hb A1-Bande findet. Eine weitere Methode ist die Genamplifikation in der Polymerase-Ketten-Reaktion (**P**olymerase **C**hain **R**eaction-PCR), die eine Erkennung von 99 % der heterozygoten β -Thalassämiepatienten erlaubt. Seit 1977 ist die pränatale Diagnostik für die Thalassämie via der Chorionzottenbiopsie in der 9. - 10. Schwangerschaftswoche, der Amniozentese in der 15. - 17. Schwangerschaftswoche oder der Nabelschnurblutuntersuchung eingeführt. Die fetale DNA wird mittels Genamplifikation in der PCR untersucht.

Neuere Forschungen gibt es auf dem Gebiet der nicht-invasiven pränatalen Diagnostik auf der Grundlage des Nachweises von fetalen Zellen im mütterlichen Blut (Bianchi, 1999). Problematisch ist die Gewinnung der fetalen Zellen aufgrund ihrer niedrigen Anzahl im mütterlichen Blut bei einem normalen Karyotyp des Fetus mit ca. einer fetalen Zelle pro Milliliter mütterlichem Blut als auch deren Identifizierung. Es gibt verschiedene fetale Zelltypen (fetale Leukozyten, Trophoblasten und kernhaltige Erythrozyten), wobei sich nur die kernhaltigen Erythrozyten für die pränatale Diagnostik eignen. Sie kommen zeitlich begrenzt im 1. Trimester der Schwangerschaft vor. Die fetalen Leukozyten sind post partum noch nachweisbar und sind somit nicht sicher dem Fetus zuzuordnen. Bei den Trophoblasten stellt sich das Problem, dass deren Antigene von den mütterlichen Leukozyten adsorbiert werden können. Sie sind bei einer normalen Schwangerschaft nicht nachweisbar, können aber bei Chromosomenmosaiken neu auftreten. Die Zellseparation erfolgt meistens mittels Kombination von verschiedenen Techniken (Magnetisch / Fluoreszenz gestützte Zellseparation). Anschließend werden die fetalen kernhaltigen Erythrozyten aufgrund des Nachweises von Gammaglobulin und Zelloberflächenmarkern wie dem CD 71 Transferrinrezeptor und dem CD 36 Thrombospondinrezeptor identifiziert. Die genetische Analyse wird mit der Fluoreszenz in Hybridisierung mittels chromosomenspezifischer Proben und der Genamplifikation in der PCR durchgeführt.

Die verminderte β -Kettensynthese führt zu einem Ungleichgewicht in der Globinsynthese des Hämoglobins mit einem Überschuss an α -Ketten. Diese präzipitieren in den Vorläuferzellen der Erythrozyten. Als Folge treten eine Splenomegalie aufgrund der Hämolyse und eine

ineffektive Erythropoese wegen der Zerstörung der Vorläuferzellen auf. Es kommt zu einer Anämie mit einer reaktiven Knochenmarkexpansion. Diese führt zu Skelettdeformitäten wie z. B. einem Bürstenschädel, Wachstumsverzögerung und Folsäuremangel. Darüber hinaus kommt es zur Eisenüberladung infolge der erhöhten Eisenaufnahme im Rahmen der Knochenmarkexpansion und der therapeutischen Bluttransfusionen.

Aufgrund der Eisenüberladung treten multiple Insuffizienzen endokriner Organe, wie z. B. eine verzögerte Pubertät, ein Diabetes mellitus und eine Hypothyreose sowie Organsiderosen von Leber und Herz auf (Weatherall et al., 2001).

Das Herzversagen ist die Haupttodesursache bei β -Thalassämiepatienten. In etwa 50 % der Thalassämie major Patienten sterben vor dem 35. Lebensjahr zumeist an Herzversagen (Zurlo et al., 1989; Modell et al., 2000).

Klinisch lassen sich 3 Thalassämieformen unterscheiden: die asymptotische heterozygote Thalassämie minor, die Thalassämie intermedia bzw. die nichttransfusionsabhängige homozygote β -Thalassämie sowie die schwere β -Thalassämie major.

Die β -Thalassämie major ist die klinische Manifestation der Thalassämie bei homozygoten Merkmalsträgern. Nach dem Grad der ineffektiven Erythropoese unterscheidet man die schwerer verlaufende β^0 - von der β^+ -Thalassämie. Bei der β^0 -Thalassämie werden keine β -Ketten produziert. Bei der β^+ -Thalassämie werden quantitativ weniger β -Ketten produziert. Im Alter von 3 - 18 Monaten fallen die Kinder durch Symptome der Anämie auf. Sie weisen eine chronisch hämolytische Anämie mit Hepatosplenomegalie, Bürstenschädel und Wachstumsverzögerung auf. Im Blutausstrich zeigen sich eine Anisozytose, hypochrome Erythrozyten, Targetzellen und Normoblasten. Weiterhin ist eine erhöhte osmotische Resistenz der Erythrozyten nachweisbar.

Die Lebenserwartung ohne Behandlung liegt unter 5 Jahren. Mit Bluttransfusionen entwickeln sich die Kinder gut, aber es kommt zu einer sekundären Eisenüberladung.

Die β -Thalassämie intermedia ist in der Regel eine nichttransfusionsabhängige homozygote β -Thalassämie. Es besteht eine mäßige Anämie mit einer Hämoglobinkonzentration zwischen 7 und 10 g/dl. Die klinischen Probleme liegen in der massiven Knochenmarkexpansion und der erhöhten Eisenresorption (Pippard et al., 1979). Das Krankheitsbild weist eine große Heterogenität auf. Die Erkrankung kann einen schweren Verlauf wie eine Major-Form als auch einen milden Verlauf nehmen. Als Komplikationen treten Folsäuremangel, Beinulzerationen, Gallensteine und Thrombosen auf.

Die β -Thalassämie minor ist der Heterozygotenstatus und im Allgemeinen klinisch asymptomatisch mit meist nur einer geringen hypochromen Anämie und einer geringen Splenomegalie. Im Blutausstrich erscheinen die Veränderungen weniger ausgeprägt als im Homozygotenstatus. Die Lebenserwartung ist nicht eingeschränkt.

1.2 Eisenmetabolismus bei der Thalassämie

1.2.1 Eisenstoffwechsel

Beim Erwachsenen beträgt das Gesamtkörper Eisen 4 bis 5 g, davon sind normalerweise 67 % (2,5 g) im Hämoglobin, 27 % (1 g) im Speichereisen, 3,5 % (130 mg) im Myoglobin, 2,2 % (80 mg) im sog. labilen Eisenpool (Serumeisen) und 0,2 % (8 mg) in Enzymen verteilt. Das Speichereisen befindet sich im retikulo-endothelialen System von Leber, Milz und Knochenmark als Ferritin (0,5 g) und Hämosiderin (0,5 g).

Man unterscheidet die folgenden drei Gruppen von Proteinen des Eisenstoffwechsels: Häm-Proteine, Eisen-Schwefel-Cluster-Proteine und Nicht-Häm-, Nicht-Schwefel-Proteine (Nielsen, 1999).

Das Eisen kommt in Verbindungen als 2- und 3-wertiges Eisen vor. Über die Nahrung werden täglich 10 bis 20 mg Eisen zugeführt. Davon wird nur soviel absorbiert, wie durch die tägliche Eisenausscheidung (ca 0,5 bis 1,0 mg) verloren geht. Bei einem Eisenmangel oder einer erhöhten Erythropoese kommt es zu einer vermehrten Eisenabsorption. Das Eisen wird nur als 2-wertiges Eisen mittels Eisentransportern (DCT1 = DMT1¹) aus dem Gastrointestinaltrakt in die Mukosazellen aufgenommen. Die nichteisen absorbierenden Kryptenzellen im Gastrointestinaltrakt nehmen eine Schlüsselrolle in der Eisenstoffwechselregulierung ein. Bei Eisenmangel ist die Eisenkonzentration in den Kryptenzellen niedrig. Dies führt zur Aktivierung der Eisentransporterproteine in den Eisen absorbierenden Mukosazellen und somit zu einer erhöhten intestinalen Eisenaufnahme (Schümann et al., 1999). Im Blut ist das Eisen als 3-wertiges Eisen an Transferrin gebunden oder in den Mukosazellen als Ferritin gespeichert. Die Eisenspeicherung erfolgt im retikulo-endothelialen System, den Leberzellen und der Skelettmuskulatur (Nielsen, 1999).

Bei der Regulation des Eisenstoffwechsels spielt das Eisen responsive Element („iron responsive elements“ - IREs), eine 30 Nukleotidsequenz der mRNA des Ferritins bzw. des Transferrinrezeptors, eine wesentliche Rolle. Bei Eisenmangel bindet ein Eisen regulierendes Protein („Iron regulatory protein“ - IRP) an das IRE an der 3'UTR² der Transferrinrezeptor mRNA und führt zu deren Stabilisierung und somit zur Transferrinrezeptorsynthese. Hingegen hemmt die IRP-Bindung an die 5'UTR der Ferritin mRNA die Translation und somit die Ferritinsynthese.

¹ Abkürzung für **D**ivalent **c**ation **t**ransporter (DCT) bzw. **d**ivalent **m**etal **t**ransporter (DMT)

² Abkürzung für **3'** **u**ntranslated **R**egion der mRNA

1.2.2 Eisenüberladung

Zur Eisenüberladung kommt es bei regelmäßig transfusionsbedürftigen Anämien und einer erhöhten intestinalen Eisenresorption wie bei der hereditären Hämochromatose oder einer ineffektiven Erythropoese.

Bei der hereditären Hämochromatose liegt eine autosomal rezessive Erkrankung vor. Es handelt sich um eine Mutation des HFE-Gens auf dem Chromosom 6 nahe dem HLA-Komplex (Feder et al., 1996; Nielsen et al., 1998 a). Der homozygote Status ist mit 1 : 100 bis 1 : 400 in Nordeuropa häufig. Das HFE-Protein ist ein transmembranes Glykoprotein. C282Y ist die häufigste Mutation und liegt bei 90 bis 100 % der Patienten aus Deutschland, Australien und den USA vor (Nielsen et al., 1998 b). Es bindet an den Transferrinrezeptor und senkt damit die Affinität für die Transferrinbindung und beeinflusst somit die intrazelluläre Eisenkonzentration in den Kryptenzellen. Das führt zu einer erhöhten intestinalen Eisenabsorption von ca. 4 bis 5 mg Eisen pro Tag. Es resultiert eine vermehrte Eisenspeicherung in den Geweben von Muskulatur und Leber sowie dem retikulo-endothelialen System. Die Therapie besteht in der Entleerung der Eisenspeicher mittels Aderlässen (Nielsen et al., 2003).

Bei der Thalassämie führen die regelmäßigen Transfusionen, eine erhöhte Eisenaufnahme aufgrund eines vermehrten Zellumsatzes bei einer ineffektiven Erythropoese bei insuffizient bzw. nicht transfundierten Patienten sowie eine unzureichende Chelatortherapie zu einer Eisenüberladung.

Die regelmäßigen Bluttransfusionen führen zu einer Akkumulation von etwa 0,5 mg Eisen pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag. Ein 250 ml Erythrozytenkonzentrat enthält ca. 200 bis 250 mg Eisen. Das Eisen der abgebauten Erythrozyten wird im retikulo-endothelialen System des Knochenmarks gespeichert oder an Transferrin gebunden zur Erythropoese transportiert bzw. in den Leberparenchymzellen als Ferritin und / oder Hämosiderin gespeichert. Nach früheren Abschätzungen kann bei der Thalassämie major das Speichereisen auf ca. 35 g (30 g Hämosiderin und 4,5 g Ferritin) ansteigen. Darüber hinaus nimmt das Serumeisen und das nicht an Transferrin gebundene Eisen zu (Modell et al., 1984).

Die Schwelle für ein erhöhtes Risiko einer Lebererkrankung und / oder einer Schädigung endokriner Organe liegt nach Untersuchungen von Oliveri und Brittenham bei 40 bis 80 μmol Eisen/g Leberfeuchtgewicht. Das entspricht 7 bis 15 mg Eisen/g Lebertrockengewicht. (Oliveri et al., 1997). Am Herz führt die chronische Eisenüberladung mit Serumferritinkonzentrationen $> 2500 \mu\text{g/l}$ zu einer linksventrikulären Myokardrestriktion und

zu einem erhöhten Widerstand im Lungenkreislauf mit folgender Rechtsherzdilatation (Oliveri et al., 1994).

Das Serumeisen ist als 3-wertiges Eisen an Transferrin gebunden. Transferrin ist ein Plasmaprotein mit einem Molekulargewicht von 90 kD und kann zwei Eisenionen binden.

Durch eine regelmäßige intensive Eisenchelatortherapie wird die sekundäre Eisenüberladung vermindert. Aufgrund der Toxizität der Chelatoren ist deren Einsatz nur in einer engen Dosisbandbreite möglich. Das bedeutet bei geringer Eisenüberladung eine Reduktion der Chelator dosis und bei massiver Eisenüberladung eine Steigerung der Dosis unter Berücksichtigung der maximalen Dosis.

1.3 NTBI, Freie Radikale, Antioxidantien

Nicht-Transferrin gebundenes Eisen (**Non-Transferrin Bound Iron-NTBI**) tritt im Plasma auf, wenn das Transferrin über 60 % gesättigt ist. Es wurde zuerst von Hershko und Rachmilewitz (1978 b) bei eisenüberladenen β -Thalassämie major und intermedia Patienten beschrieben. Sie zeigten, dass NTBI ein chelierbarer Komplex ist, der an Transferrin bindet.

NTBI tritt im Rahmen von Eisenüberladung nach zahlreichen Transfusionen bei den Thalassämie-Syndromen oder durch eine abnorme Eisenabsorption wie bei der hereditären Hämochromatose auf. Darüber hinaus ist es bei Patienten mit myelodysplastischen Syndromen und bei der Behandlung mit einer zytotoxischen Chemotherapie sowie nach Knochenmarktransplantationen nachweisbar (Bradley et al., 1997; Gordeuk et al., 1992; Dürken et al., 1997).

NTBI wurde auch im Gehirn von Ratten nachgewiesen (Moos et al., 1998). Die Entstehung ist noch unklar. Mögliche NTBI-Formen sind monomere / oligomere Eisen(III)-Citrat-Komplexe, monomere / oligomere Eisen(III)-Albumin-Citrat-Komplexe und Ferritineisen mit einem geringen Molekulargewicht (Gosriwatana et al., 1999).

Bei Ratten wurde nachgewiesen, dass das von der Galle ausgeschiedene Eisen, das ursprünglich vom NTBI abstammt, vom Darm absorbiert wird. Es unterliegt somit einem enterohepatischen Kreislauf, wenn das Transferrin gesättigt ist (Brissot et al., 1997). Bei Entzündung produzieren die Leberzellen Stickstoffmonoxid (NO), das den Transport von NTBI in die Leber-G2-Zellen reduziert und somit zu einer NTBI-Erhöhung im Plasma führt (Barisani et al., 1999).

NTBI scheint der Hauptfaktor für die Lipidperoxidation und den niedrigen Antioxidantienstatus bei Thalassämiepatienten zu sein (Cappellini et al., 2001 a).

Das Häm wird zu Ferrichrom-Formen oxidiert, welche freie Hydroxylradikale erzeugen, die

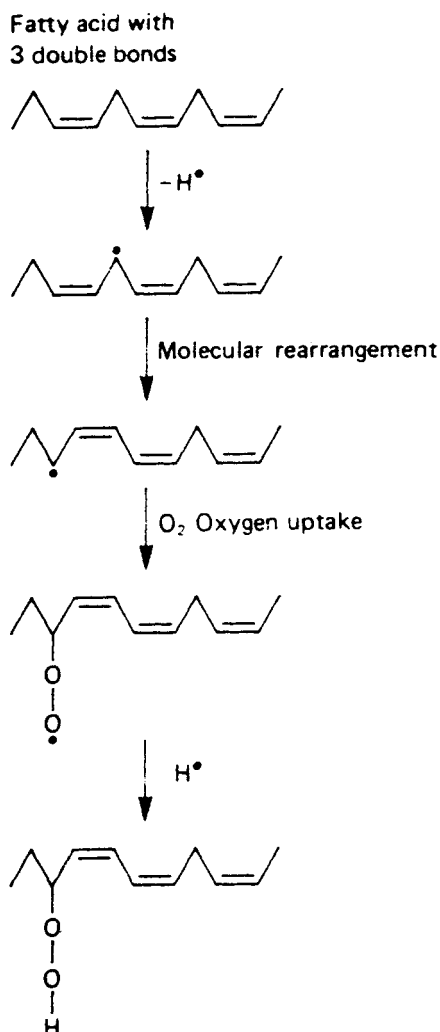
dann mit biologischen Prozessen interferieren und zur Lipidoxidation führen können (Rachmilewitz et al., 1976).

NTBI kann mit Wasserstoffperoxid reagieren und Hydroxylradikale bilden, die sehr reaktiv sind. Bei diesem Vorgang handelt es sich um die Fenton-Reaktion:



Gegen das Auftreten der Fenton-Reaktion in vivo spricht die niedrige Reaktionskonstante, die keine biologische Signifikanz aufweist (Gutteridge et al., 1989). Bei einer Radikalerzeugung kann jedoch eine biologische Konsequenz folgen.

Kettenreaktion der Lipidperoxidation (LPO):



1. Die Initiation der Peroxidation einer mehrfach ungesättigten Fettsäure in der Lipidmembran, d.h. das Abziehen eines Wasserstoffatoms, erfolgt durch reaktive Radikale wie z.B. einem Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$), Alkylradikal ($\text{RO}\cdot$), Peroxylradikal ($\text{ROO}\cdot$) und möglicherweise $\text{HO}_2\cdot$.

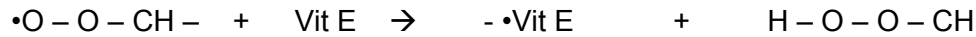
2. Das gebildete Lipidradikal wird molekular zu einem konjugierten Dien umgeordnet.

3. Das konjugierte Dien reagiert mit Sauerstoff unter Bildung eines Peroxylradikal.

4. Das Peroxylradikal kann wieder eine Seitenkette eines Lipids unter Wasserstoffatomabspaltung angreifen und ein Lipidradikal bilden sowie selbst zu einem Lipidperoxid reagieren.

Abb. 1: Lipidperoxidation
lipidperoxidation

5. Das Antioxidans Vitamin E stört diese Kettenreaktion, indem es Wasserstoffatome für die Peroxylradikale bereitstellt und damit die Initiation durch die Peroxylradikale stoppt:



Weitere Antioxidantien stellen die Superoxiddismutase (SOD), die Katalase und die Glutathionperoxidase dar.

Die Folgen der Lipidperoxidation sind Probleme in der Aufrechterhaltung des Membranpotenzials und eine erhöhte Permeabilität für Wasserstoffionen, was zur Zellschädigung führt (Gutteridge et al., 1989).

Antioxidantien:

Infolge massiver Eisenüberladung, NTBI und LPO sind die Vitamin C- und E-Plasmaspiegel erniedrigt (Reller et al., 1998; Livrea et al., 1996). Vitamin C hat antioxidative Eigenschaften und unterstützt das Kommunizieren aller Eisenspeicher. Es verstärkt die Eisen-Chelation mit **Desferrioxamine** (DFO, Desferal®), aber auch deren Toxizität (Nowak et al., 1998). Bei einem niedrigen Vitamin C-Plasmaspiegel werden 100 mg Vitamin C pro Tag 30 Minuten bis eine Stunde vor Beginn der subkutanen Desferrioxamine-Infusion empfohlen (Oliveri et al., 1997). Darüber hinaus besitzt Vitamin C auch prooxidative Effekte, die die Toxizität des NTBIs erhöhen (Nienhuis et al., 1976; Livrea et al., 1996).

Vitamin E (α -Tocopherol) ist ebenfalls ein Radikalfänger und Antioxidans. Es schützt in vitro die Erythrozyten, bei oraler Vitamin E Applikation ist jedoch in vivo kein effektiver Erythrozytenschutz sicher nachweisbar (Modell et al., 1984).

1.4 Therapie der Thalassämie

Zurzeit ist die zwei- bis vierwöchige Bluttransfusion und die Chelatortherapie mit Desferrioxamine die Standardtherapie bei der β -Thalassämie.

Knochenmarktransplantation:

Die allogene Knochenmarktransplantation von HLA-identischen Geschwistern oder Eltern mit Überführung in den Heterozygotenstatus ist zurzeit die einzig kurative Therapie, wobei die Erfolgsrate abhängig vom Leberstatus und der Chelatortherapie zwischen 65 bis 96 % liegt (Lucarelli et al., 1995). Lucarelli et al. fanden einen Zusammenhang zwischen der Post-Transplantations-Mortalität und der Eisenüberladung zum Transplantationszeitpunkt (Lucarelli et al., 1990). Nach der Transplantation sollte eine dann noch bestehende Eisenüberladung durch Aderlass oder / und durch eine Eisenchelatortherapie behandelt werden (Lucarelli et al., 1993).

Transfusionen:

Bei der Thalassämie ist die Anämie mit einer hyperaktiven Erythropoese verbunden, die intra- und extramedullär mit der Folge von Skelettdeformationen und einer Splenomegalie sowie einem gestörtem Wachstum und einer exzessiven gastrointestinalen Eisenabsorption stattfindet. Die Transfusionen schützen den Patienten vor dem Tod und ermöglichen eine normale Entwicklung. Das transfundierte Eisen akkumuliert in den Geweben und führt auf diese Weise zu Organschäden vor allem in der Leber und dem Herz (Oliveri et al., 1998).

Die Transfusionen werden alle zwei bis vier Wochen durchgeführt. Es gibt verschiedene Transfusionsregime. Das mäßige Transfusionsregime mit einem Basis-Hb zwischen 9 und 10 g/dl hat sich gegenüber der Hypertransfusion mit einem Basis-Hb zwischen 10 und 12 g/dl und der Niedrigtransfusion mit einem Hb unter 9 g/dl durchgesetzt (Cazzola et al., 1997; Gabutti et al., 1980). Die Vorteile der moderaten Transfusion liegen in der effektiven Prävention der Eisenüberladung, einer weitgehend spontanen Pubertätsentwicklung und der Vermeidung einer exzessiven Knochenmarkexpansion (Cazzola et al., 1997).

Bei einem hohen Blutverbrauch und einer massiven Splenomegalie kann eine Splenektomie notwendig werden. Bei einem Blutbedarf > 200 ml Erythrozytenkonzentrat pro Kilogramm Körpergewicht pro Jahr verringert sich durch eine Splenektomie signifikant der Blutbedarf und somit die Eisenakkumulation (Olivieri et al., 1998). Die Milz spielt als lymphatisches und retikulo-endotheliales Organ eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Immunsystems mittels Antigenpräsentation. Nach der Splenektomie sind insbesondere Kleinkinder

gefährdet, schwere bakterielle Infektionen vor allem durch *Haemophilus influenzae* und durch Pneumokokken zu entwickeln. Deshalb sollte eine Impfung vor der Splenektomie vorgenommen werden und die Operation möglichst nicht vor dem 5. Lebensjahr erfolgen.

Chelatortherapie:

Um die sekundäre transfusionsbedingte Eisenüberladung zu behandeln, werden Eisenchelatoren eingesetzt. Zurzeit sind folgende zwei Chelatoren zugelassen, das parenteral zu applizierende **Desferrioxamine** (DFO, Desferal®) und das oral zu applizierende **Deferiprone** (DFP, Ferriprox®).

Der Chelator DFO wurde 1960 eingeführt und gilt als Standardtherapie bei allen Erkrankungen, die mit Eisenüberladung und pathologischer Eisenspeicherung im Gewebe assoziiert sind. Des Weiteren ist es bei Aluminiumüberladung bei Dialysepatienten indiziert. Die aktive Form ist Desferrioxamine B. Es ist ein Eisen bindender Komplex abstammend vom Ferrioxamin B und wird von *Actinomyces* produziert (*Streptomyces pilosus*; Bickel et al., 1960). Die Chelatorbindung erfolgt im molaren Verhältnis von 1 : 1, d. h., dass 1 g DFO theoretisch 85 mg 3-wertiges Eisen binden kann.

Die Dosis wird individuell angepasst und liegt zwischen 20 - 60 mg DFO pro kg Körpergewicht pro Tag. Die Gabe erfolgt meistens als nächtliche 10- bis 12-stündige subkutane Infusion, aber auch die intravenöse Verabreichung ist möglich, z. B. parallel zur Bluttransfusion oder über einen vaskulären Port.

Das Wirkprinzip des DFOs und seiner Metabolite ist in den chemischen Hexadentat-Chelator-Strukturen begründet, diese erhöhen die Eisenausscheidung im Urin und in den Faeces (Lehmann et al., 1990). In Abhängigkeit von der Größe der Eisenspeicher erscheinen zwei Drittel des chelierten Eisens im Urin und ein Drittel in den Faeces (Pippard et al., 1982).

Die maximale Eisenausscheidung unter langsamer subkutaner DFO-Infusion liegt bei 40 mg Eisen in 24 Stunden, d. h., dass der labile Eisenpool bei eisenüberladenen Patienten in 24 Stunden mehr als 2-mal mobilisiert werden kann (Pippard et al., 1978; Propper et al., 1977).

Die Substitution von Vitamin C führt unter DFO-Gabe zusätzlich zu einer Freisetzung von chelierbaren Eisen und damit zu einer verbesserten Eisenausscheidung unter DFO-Therapie (s. Kap. 1.3).

Die Anwendung von DFP als oraler Chelator wurde von Hider, Kontoghiorghes und Silver 1982 patentiert und stellt eine Alternative zum DFO bei Eisenüberladung dar (Hider et al., 1982). Die Zulassung erfolgte 1995 in Indien und 1999 in Europa und Kanada. Der Vorteil liegt in der oralen Anwendung, was die Patientencompliance erhöht. Der Wirkstoff ist

Deferiprone (3-Hydroxy-1,2-dimethylpyridin-4-on), ein zweizähniger Ligand, der sich an Eisen im molaren Verhältnis von 3 : 1 bindet (Hider et al., 1982). Es werden oral 50 bis 100 mg /kg Körpergewicht /d in 3 bis 4 Portionen zu ca. 25 mg /kg Körpergewicht verabreicht. Tierexperimentell greift Deferiprone bei Ratten in den intrazellulären Eisenpool ein und optimiert die Eisenausscheidung vor allem durch eine biliäre Exkretion von NTBI (Brissot et al., 1997). Beim Menschen wird der größte Teil des DFP (> 70 %) über die Nieren ausgeschieden. Dies erfolgt unverändert, an Eisen gebunden, als Glukuronidderivat und / oder an Zink und Aluminium gebunden (Hoffbrand et al., 1996). Als Nebenwirkung tritt in 0,6 % der behandelten Patienten eine Agranulozytose auf, die zum Therapieabbruch führt. Deshalb müssen regelmäßige Blutbildkontrollen unter DFP-Therapie durchgeführt werden. Darüber hinaus kann es zum Auftreten von Arthralgien / Arthritis (15 %), gastrointestinalen Nebenwirkungen (10 %) und Zinkverlust (1 %) kommen.

Eine weitere Therapiemöglichkeit stellt die Anwendung von **Hydroxyurea** (HU) dar. HU führt zur unspezifischen Aktivierung des Hb F und wird bei der Thalassämie intermedia in einer oralen Dosierung von 15 bis 20 mg /kg Körpergewicht /d eingesetzt. Eine vielversprechende Ergänzung zu diesem Therapiekonzept stellt die Anwendung von Decitabine dar, das einen fundamentalen Effekt auf die hämatopoetische Differenzierung von Zellen hat und u. a. die Reaktivierung von Hb F auch bei HU-resistenten Patienten erlaubt (Sauntharajah et al., 2003). Darüber hinaus wird insbesondere der Histondecarboxylase-Inhibitor Apicidin als stärker stimulierend auf die HbF-Synthese untersucht (Witt et al., 2003).

Neuere Forschungen beschäftigen sich mit der Gentherapie basierend auf dem Gentransfer mittels Globin-Vektoren (Rivella et al., 2003; Persons et al., 2003).

Zur Therapiebeurteilung ist es notwendig, die Parameter des Eisenstatus und der Erythropoese zu erheben. Dazu werden u. a. folgende Blutparameter bestimmt: als Eisenparameter Ferritin, Transferrinsättigung, Serumeisen sowie NTBI und als Erythropoeseparameter Hämoglobin, Retikulozyten sowie der Serumtransferrinrezeptor. Die Ermittlung des Gesamtkörpereisens, das zu etwa 80 % in der Leber gespeichert wird, kann invasiv mittels Leberbiopsie oder nicht-invasiv mittels biomagnetischer Lebersuszeptometrie bzw. quantitativer Kernspinresonanztomografie erfolgen (s. Kap. 4.1.2).

1.5 Problemstellung

Bei der Thalassämie kommt es zu einer transfusionsbedingten Eisenüberladung und in diesem Rahmen zum Auftreten von freiem Eisen. Die Toxizität des NTBIs ist in der Radikalerzeugung und Lipidperoxidation von Biomembranen begründet (s. Kap. 1.3). Diese Reaktionen führen zu Gewebe- und Organschäden (Gutteridge et al., 1985).

Unter der Annahme, dass durch eine erfolgreiche Hemmung der ineffektiven Erythropoese das freie Eisen im Serum vermindert wird, wurde in dieser Arbeit erstmalig NTBI als Funktion der Erythropoese während eines Transfusionsintervalls gemessen. Das Ziel dieser Untersuchung war die Beurteilung des NTBIs als geeigneten Verlaufsparemeter für eine dynamische Chelatorbehandlung bei β -Thalassämiepatienten innerhalb eines Transfusionsintervalls im Gegensatz zum bisherigen konstanten Dosisregime.

Darüber hinaus wurde im Rahmen einer multizentrischen Studie der Eisenstatus von β -Thalassämiepatienten bei einem alternierenden Therapieregime mit DFO und DFP im Gegensatz zur DFO-Monotherapie (Standardtherapie) verglichen. Das Ziel war die Wirksamkeit dieser Kombinationstherapie zu untersuchen. Insbesondere war der Einfluss dieser beiden Therapieregime auf NTBI festzustellen.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

2.1.1 Patienten für die Untersuchung der Reproduzierbarkeit der standardisierten NTBI-Bestimmung und der Kobalt-Sättigungsmethode

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit der standardisierten NTBI-Bestimmung wurden 3 Serumpools angelegt. Bei Serumpool B und C wurde NTBI in Serie an einem Tag bestimmt. Alle 3 Serumpools (A, B und C) wurden bei folgenden NTBI-Messungen insgesamt über einem Zeitraum von 2 Jahren mitgeführt. Es handelte sich um Patienten mit hereditärer Hämochromatose, die mit regelmäßigen Aderlässen behandelt wurden. Der Serumpool A zeigte eine sehr niedrige NTBI-Konzentration. Der Serumpool B hatte eine niedrige NTBI-Konzentration. Der Serumpool C zeichnete sich durch eine hohe NTBI-Konzentration aus. Zusätzlich wurde bei dem Serumpool B die Transferrinsättigung mit 48 % bestimmt, sodass hier die Kobalt-Sättigungsmethode angewendet wurde. Die Serumproben wurden innerhalb von 30 Minuten abzentrifugiert, portioniert bei -20°C eingefroren und wurden maximal für 2 Jahre gelagert. Die einzelnen Serumportionen wurden jeweils einmalig zur NTBI-Bestimmung verwendet.

Weiterhin wurden NTBI-Doppelbestimmungen am gleichen Tag bei β -Thalassämiepatienten im Rahmen der Chelatorvergleichsstudie (n=58, Messung zum Zeitpunkt 0 und nach einem Jahr) und bei der NTBI-Kinetik der Cataniagruppe (n=10) durchgeführt. Darüber hinaus wurden NTBI-Doppelbestimmungen auch nach einem Jahr bei den β -Thalassämiepatienten der Chelatorvergleichsstudie (n=58) durchgeführt (s. Kap. 2.1.2 und 2.1.3).

2.1.2 Patientengruppe für die Messung der NTBI-Kinetik als Funktion der Erythropoese während eines Transfusionsintervalls

Im Rahmen eines intensiven Therapie-Monitorings bei 14 Patienten mit β -Thalassämie major und intermedia sowie einem Patienten mit Sichelzell- β -Thalassämie aus Catania (Italien) und Hamburg wurden in einem Transfusionsintervall oder in zwei Transfusionsintervallen (22 ± 3 Tage) wöchentliche Blutentnahmen durchgeführt (s. Tab. 1).

Alle Patienten erhielten regelmäßig Bluttransfusionen und nächtliche subkutane DFO-Infusionen. Die Blutentnahmen erfolgten nach einem mindestens 12-stündigen chelatorfreiem Intervall. Die Serumproben wurden innerhalb von 30 Minuten abzentrifugiert

und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Folgende Parameter wurden bestimmt: NTBI, als Eisenüberladungparameter Serumeisen, Transferrinsättigung, Serumferritin und die Lebereisenkonzentration (LIC), als Parameter der erythropoetischen Aktivität der lösliche Transferrinrezeptor, Hb und Retikulozyten. Weiterhin wurde die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (Erythrocyte sedimentation rate = ESR) und als Leberfunktionsparameter die Alanin-Aminotransferase (ALT) ermittelt.

Gruppe 1 (Catania): $n = 10$, Alter: 22 ± 2 Jahre, LIC: $2,4 \pm 0,4$ mg/g_{Leber}

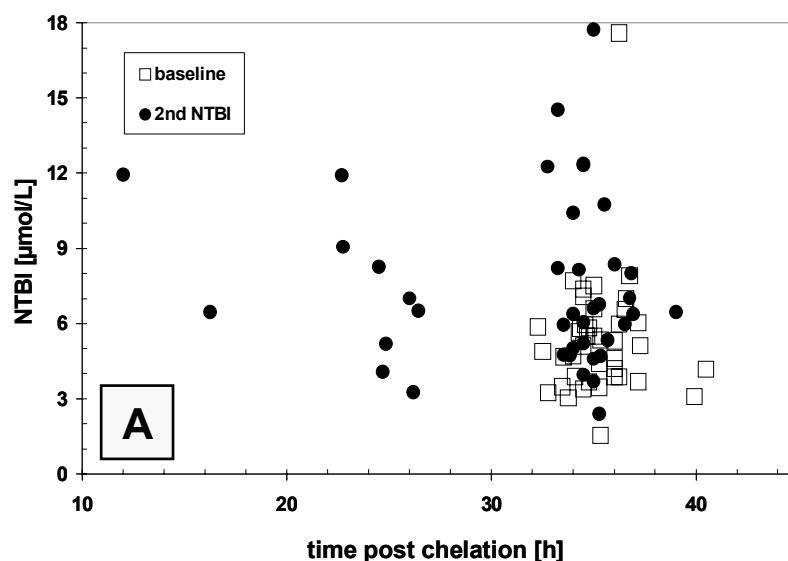
Gruppe 2 (Hamburg): $n = 5$, Alter: 18 ± 3 Jahre, LIC: $1,2 \pm 0,1$ mg/g_{Leber}

Patient No.	group	sex	age [y]	splenectomy	DFO [mg/kg/d]	transfusion-interval [d]
1	2	f	22,1	yes	34	28
2	2	f	9,7		43	22
3	2	f	22,8	yes	46	28
4	2	f	23,6		39	21
5	2	m	13,7		59	18
6	1	f	15,6		53	21
7	1	m	19,6		40	21
8	1	f	12,5		45	21
9	1	m	28,0	yes	46	21
10	1	f	23,4	yes	41	21
11	1	f	21,8	yes	63	21
12	1	m	24,5	yes	49	22
13	1	m	27,6	yes	78 (DFP)	21
14	1	m	23,1	yes	42	21
15	1	f	25,2	yes	48	26
mean			20,9	9	46,3	22,2
sd			5,5		7,8	2,8

Tab. 1: Patientendaten der NTBI-Kinetik während eines Transfusionsintervalls.
Data of patients for NTBI-Kinetics during one transfusion interval.

2.1.3 Patientengruppen für den Vergleich der alternierenden Chelatortherapie mit Desferrioxamine und Deferiprone zur Desferrioxamine-Monotherapie in der Behandlung der Eisenüberladung bei Thalassämien

Es wurde eine randomisierte, prospektive italienisch-griechisch-kanadisch-deutsche multizentrische Studie der Firma APOTEX (LA08-9701) durchgeführt. Daran nahmen 61 β -Thalassämie major Patienten aus Athen (n = 17), Cagliari (n = 31) und Turin (n = 13) im Alter von $19,7 \pm 5,6$ Jahren teil. Die mittleren Serumferritin-Konzentrationen der Patienten lagen zwischen 1500 bis 3500 $\mu\text{g/l}$ bei ständiger DFO-Chelatortherapie. Den Studien wurde von den Ethikkommissionen in Athen, Cagliari, Turin und Hamburg zugestimmt. Es handelte sich um eine Vergleichsstudie. Die eine Patientengruppe (n = 30) erhielt die subkutane DFO-Therapie mit der üblichen Dosierung (20 bis 60 mg/kg/d, 10- bis 12-stündige Infusionsdauer, 5 bis 7 Tage /Woche), die andere Gruppe (n = 29) eine Kombinationstherapie mit DFO für zwei Tage und DFP für die folgenden fünf Tage (75 mg/kg/d in 3 fraktionierten Dosen) in der Woche. Drei Patienten brachen die Studie ab. 12 Patienten waren splenektomiert. 28 Patienten waren HCV positiv. Folgende Parameter wurden erhoben: Standardparameter wie Serumferritin, ALT sowie weitere Parameter wie Compliance, Transfusionsmenge und Zink in den Thalassämie-Zentren. Darüber hinaus wurde die Lebereisenkonzentration und Milzeisenkonzentration mit dem SQUID-Biosuszeptometer, die Leber- und Milzvolumina sowie NTBI, Transferrinsättigung und Serumeisen in Hamburg gemessen. Diese Parameter wurden jeweils zu Studienbeginn (baseline) und nochmals nach einem Jahr (1 y) bestimmt. Die Blutentnahmen wurden standardisiert in den Thalassämie-Zentren vorgenommen, wobei die Chelatortherapie mindestens 12 Stunden vor der Blutabnahme abzusetzen war und die Zeit relativ zur letzten Transfusion zu dokumentieren war. Die Seren wurden bei -20°C eingefroren.



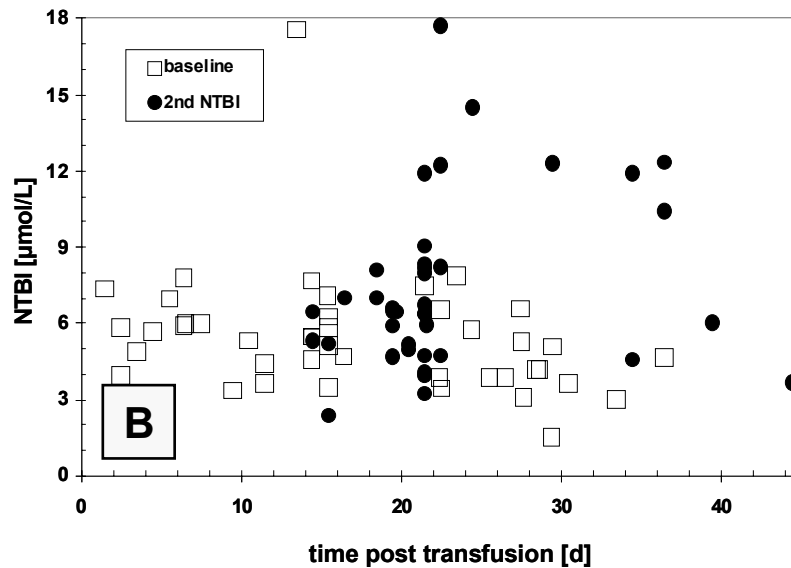


Abb. 2: Zeit [h] zwischen Chelatortherapie-Ende und Blutentnahme (a) und Zeit [d] zwischen letzter Transfusion und Blutabnahme (b) für die Patientengruppen aus Cagliari und Turin.

time [h] between chelation therapy end and blood sampling (a) and time [d] between last transfusion and blood sampling (b) for the patients groups of Cagliari and Torino

Die Abbildung 2 zeigt die Zeit zwischen dem Chelatortherapie-Ende und der Blutentnahme (a) sowie die Zeit zwischen der letzten Transfusion und der Blutabnahme (b) für die Patientengruppen aus Cagliari und Turin. Für die Gruppe aus Athen konnten keine Angaben gemacht werden. Daher wurde sie getrennt betrachtet.

2.2 Messmethoden und Laborparameter

2.2.1 Eisen- und Volumen-Bestimmung in den Organen Leber und Milz

Bestimmung der Leber- und Milzeisenkonzentration:

(LIC = Liver iron concentration; SIC = Spleen iron concentration)

Norm: < 18 Jahren: 80 – 370 µg/g-liver, > 18 Jahren: 90 – 480 µg/g-liver

Die Eisenkonzentrationsmessung erfolgte mit dem SQUID-Biosuszeptometer (SQUID = Superconducting Quantum Interference Device), einer nicht-invasiven Methode, in einer Präzisionsmessung (5 Einzelmessungen gegen eine Wasserreferenz) gemäß dem Protokoll des Hamburger Biosuszeptometers (Fischer et al., 1998 b).

Dabei wurde der Patient in links lateraler Rückenlage auf einem Patientenbett gelagert. Mittels Sonografie unter Laserkreuzführung wurde die optimale Leberposition ermittelt, und

der Patient wurde dann durch eine Vakuummatratze fixiert. Der Leber (oder Milz)-Haut-Abstand wurde aus 4 Ultraschallbildern (sagittal, transversal, 2 diagonal) bestimmt. Ein Ellipsoid wurde dabei an die anteriore Lebergeometrie angepasst. Weiterhin wurde die Thoraxgeometrie ermittelt. Der Patient wurde danach unter dem SQUID-Sensorsystem positioniert. Die diamagnetischen Gewebeeigenschaften (Haut, Muskeln, Fett, Rippen) wurden durch eine Wasserkopplungsmembran kompensiert. Die eigentliche Messung erfolgte dann durch eine Absenkung des Patienten um ca. 7 cm mit maximal 0,7 cm pro Sekunde in einem inhomogenen Magnetfeld von supraleitenden Magnetfeldspulen (Fischer et al., 1998 a).

Lebervolumen-Bestimmung mittels Sonografie:

In Rückenlage wurden in einem 2 cm Abstand in der Sagittalebene Ultraschall-Schnittbilder der Leber erstellt. Die Leberflächen der einzelnen Schnittbilder wurden jeweils mit dem Abstand der Schichten (= Schichtdicke) multipliziert und addiert.

Milzvolumen-Bestimmung mittels Sonografie:

Sonografisch wurde von der Milz ein transversales und longitudinales Schnittbild erstellt. Das Volumen wurde mittels der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Volumen} = \frac{4}{3} \pi * \text{Transversalfläche} * \text{Longitudinalfläche} / \text{Durchmesser (Anterior-Posterior)} / 2.$$

War die Milz stark vergrößert, mit einem geschätzten Volumen von mehr als ca. 350 ml, erfolgten in einem 2 cm Abstand in der Transversalebene die Ultraschall-Schnittbilder. Aus diesen wurde dann wie bei der Lebervolumetrie das Volumen berechnet.

Das Gesamtkörpereisen wurde aus der LIC und der SIC und den entsprechenden Organvolumina nach folgender Formel berechnet (Fischer et al., 1999):

$$\text{Gesamteisen} = (\text{LIC} * \text{Lebervolumen} + \text{SIC} * \text{Milzvolumen}) / 0,8$$

2.2.2 Blutparameter

Serumeisen (Serum iron = SI)

Norm: 64 – 170 µg/dl

Das Serumeisen wurde durch HCl vom Transferrin abgespalten und nach Reduktion zu 2-wertigem Eisen, Eiweißfällung und Zugabe von Bathophenanthrolin (Chelatbildung) fotometrisch bei 546 nm bestimmt.

Ungesättigte Eisen-Bindungs-Kapazität (UEBK) und Totale Eisen-Bindungs-Kapazität (TEBK)

Norm: 250 – 395 µg/dl (TEBK)

Die UEBK wurde nach Eisensättigung ohne Proteinfällung kolorimetrisch bestimmt. Die TEBK ist die Summe aus SI und UEBK.

Transferrinsättigung (Tfs)

Norm: 20 – 52 %

Die Tfs ermittelt sich aus dem Quotienten von SI und TEBK.

Serumferritin (SF)

Norm: 35 – 235 µg/l

Das SF wurde mit dem ACCESS[®] Ferritin Immunoassay System (Firma: SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR; INC.), einem Enzymimmunoassay nach dem Sandwichprinzip, bestimmt. Es nutzt paramagnetische Partikel als Festphase und einen Chemolumineszenznachweis zur quantitativen Ferritinbestimmung im Humanserum.

Löslicher Serumtransferrinrezeptor (Soluble transferrin receptor = sTfR)

Norm: 0,7 – 2,25 mg/l

Der sTfR wurde quantitativ mit einem standardisierten **Enzym-linked-immunosorbent assay** (ELISA; Quantikine[™] IVD[™], R&D systems) gemessen.

Das Testprinzip beruht auf einem enzymgekoppelten Sandwich-Immunoassay. In die mit monoklonalen Antikörpern beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden jeweils 100 µl sTfR-Test-Verdünnungspuffer pipettiert. Dazu wurde 20 µl Standard, Probe oder Kontrolle innerhalb von 15 Minuten pipettiert und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Inhalt der Vertiefungen abgesaugt sowie viermal mit einem Waschpuffer aufgefüllt und anschließend wieder abgesaugt. Dann wurden 100 µl Konjugat (monoklonaler Antikörper) in jede Vertiefung pipettiert und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte das Absaugen und viermalige Waschen der Vertiefungen. Als Nächstes wurde jeweils 100 µl Substratlösung dazugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Dazu wurden 100 µl Stopplösung pipettiert. Innerhalb von 30 Minuten nach der Stopplösungszugabe wurde die optische Dichte aller Proben in den Vertiefungen mittels Mikrotiterplatten-Reader bei 450 nm und einer Korrekturwellenlänge von 540 nm bestimmt. Es wurde eine Standardkurve erstellt, anhand der die Konzentration des sTfRs ermittelt wurden.

Hämoglobin (Hb), Retikulozyten

Norm: 12 – 8 g/dl (Hb)

bis 18 Retikulozyten / 1000 Erythrozyten

Hb und Retikulozyten wurden von der Kinderklinik in Hamburg bzw. in Catania bestimmt. Die Retikulozytenzahl wurde mit einem Zählgerät ermittelt.

Transaminasen (ALT) und Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (ESR)

Norm: ALT bis 19 U/l (weiblich) und bis 23 U/l (männlich)

ESR bis 15 mm/h (männlich) und bis 20 mm/h (weiblich)

ALT und ESR wurden in Catania bestimmt.

2.3 NTBI

Norm: < 0,5 µmol/l

2.3.1 Standardisierte NTBI-Bestimmung

Es gibt verschiedene Möglichkeiten der NTBI-Bestimmung. Die Mobilisierung von NTBI kann mit anionischen Liganden, z. B. EDTA, Citrat oder NTA, erfolgen. Nach anschließender Ultrafiltration wird NTBI mittels AAS³ oder HPLC⁴ quantifiziert (Hershko, 1978 a; Singh et al., 1990). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit der Komplexbildung von NTBI mit DFP und folgender Separation bzw. Identifikation mittels HPLC.

In dieser Arbeit wurde die Methode von Singh et al. (1990) ausgewählt, die an die AAS adaptiert wurde.

Die Methode basiert darauf, dass ein Eisenkomplexbildner (Nitrilotriessigsäure, NTA) das niedermolekulare und nichtspezifisch an Serumproteine gebundene Eisen bindet. Bereits an Transferrin oder Ferritin gebundenes Eisen kann nicht an NTA gebunden werden. Der Eisen-NTA-Komplex kann mittels der HPLC oder der AAS gemessen werden.

Alle Arbeitsmaterialien wurden eisenfrei mit einer Lösung aus 1 % Triton X-100 und 0,02 M HNO₃ über Nacht gewaschen. Anschließend wurden sie mit eisenfreiem Millipore-Wasser gespült und dann getrocknet.

³ Abkürzung für (englisch) **a**tomic **a**bsorption **s**pectroscopy;

(deutsch) Atomabsorptionsspektroskopie

⁴ Abkürzung für (englisch) **H**igh **p**erformance **l**iquid **c**hromatography;

(deutsch) Hochdruckflüssigkeitschromatografie

Analyse der Serumproben:

Als Erstes wurden zu 270 µl Serum (Probe) bzw. 270 µl Millipore-Wasser (Probenleerwert) 30 µl 800 mM NTA-Lösung (pH 7,0) gegeben, um eine Endkonzentration von 80 mM zu erhalten. Das Gemisch wurde 15 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur (25 °C) inkubiert. Danach wurde ein Ultrafiltrat mittels eines Mikrofiltersystems (Ultrafree MC Centrifugal Filter Unit; 10000 NMWL; Millipore) bei einer Zentrifugengeschwindigkeit von 3500 Umdrehungen pro Minute für 3 bis 4 Stunden hergestellt. Im Ultrafiltrat befanden sich alle Stoffe mit einem Molekulargewicht < 10000 Dalton, d. h. auch der Eisen-NTA-Komplex.

NTBI-Bestimmung mittels der AAS (Firma: Perkin Elmer, Modell: 2100 AAS, Überlingen):

Die Ultrafiltrate wurden im Verhältnis von 1 : 5 mit einer Matrixlösung (1 % Triton X 100 und 0,02 M HNO₃) verdünnt. Hiervon wurden jeweils 20 µl in einen Grafitofen mittels Autosampler pipettiert und dann nach folgendem Heizprogramm verascht:

step	oven temperature [°C]	time for heating up [sec.]	stopping time [sec.]	gas flow
1	60	10	10	300
2	20	1	10	300
3	80	12	10	300
4	400	10	3	300
5	1200	20	15	300
6	2500	0	6	0
7	2650	1	3	300

Tab. 2: Heizprogramm an der AAS
Heating program of the AAS

Die mit Eisen bedampfte Hohlkathode lieferte ein elementspezifisches Linienspektrum. Dieses wurde von einem Monochromator bei einer Wellenlänge von 248,3 nm analysiert und deren Lichtintensität von einem Fotomultiplier gemessen.

Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz wurde die Extinktion E berechnet:

$$E = \lg I_0 / I = \varepsilon * c * d.$$

Mittels AAS-Software (Perkin Elmer) wurde die Eisenkonzentration in der vorbereiteten Probe über die berechnete Extinktion und die Standardkurve ermittelt. Hierbei erfolgte eine dreifache Bestimmung der einzelnen Proben, aus der der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet wurden.

Hierbei wurde eine Standardkurve wie folgt erstellt:

In zwei Reaktionsgefäße wurden jeweils 800 µl Matrix-Lösung und 400 µl Matrix-Lösung sowie 100 µl einer 100 µg/l Eisenstandardlösung (Verdünnung aus einem 1000 µg/ml Eisenstandard., Sigma) pipettiert. Unter Verwendung des Autosamplers wurden Proben mit vier Standardkonzentrationen (25; 50; 75; 100 µg/l) erstellt, aus denen die Standardkurve kalkuliert wurde. Der Messbereich reichte von 30 bis 100 µg/l Eisen.

Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit der AAS wurden drei Verdünnungen einer Eisenstandardlösung sowie 3 Serumpools als Qualitätsstandard mitgeführt.

Die Proben wurden ebenfalls 1 : 5 mit der Matrixlösung verdünnt. Lag der Messwert außerhalb des Messbereiches, musste weiter verdünnt werden.

2.3.2 Kobalt-Sättigungsmethode zur NTBI-Bestimmung

Die Kobalt-Sättigungsmethode dient zur NTBI-Bestimmung bei Patienten mit einer Transferrinsättigung zwischen 30 bis 60 %.

Sie wurde von Gosriwatana (Gosriwatana et al., 1998) eingeführt. Er adaptierte die Herstellung des Kobalt-Komplexes Tris-Carbonatocobaltate(III) trihydrate / $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{CO}_3)_3] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$. 52 mg Kobalt-Komplex wurden in 10 ml einer 1M Sodiumbicarbonat-Lösung gelöst und anschließend gefiltert. Die fertig gestellte Kobaltlösung (grün) wurde bei -4°C gelagert.

Mechanismus:

Der Kobalt-Komplex besetzt die freien Bindungsstellen des Transferrins. Das Transferrin wird auf diese Weise abgesättigt (Kobalt(III)-Transferrin). Der Kobalt-Komplex verdrängt nicht das an Transferrin gebundene Eisen. Das in vivo bestehende NTBI, welches in vitro sonst an das ungesättigte Transferrin bindet, wird messbar.

Analyse der Serumproben:

Als Erstes wurde zu 225 µl Serum (Probe) bzw. 225 µl Millipore-Wasser (Probenleerwert) 50 µl Kobaltlösung gegeben. Anschließend wurde dieser Ansatz für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Dann wurden 30 µl 800 mM NTA-Lösung (pH 7,0) dazugegeben. Das Gemisch wurde 15 - 30 Minuten bei Raumtemperatur (25°C) inkubiert. Danach wurde ein Ultrafiltrat mittels eines Mikrofiltersystems (Ultrafree MC Centrifugal Filter Unit; 10000 NMWL; Millipore) bei einer Zentrifugengeschwindigkeit von 3500 Umdrehungen pro Minute für 3 bis 4 Stunden hergestellt. Im Ultrafiltrat befanden sich alle Stoffe mit einem Molekulargewicht < 10000 Dalton, d. h. auch der Eisen-NTA-Komplex.

Als Kontrollen wurden die Serumproben bzw. die Probenleerwerte ohne Kobaltlösung gemessen, dabei wurde die Kobaltlösung durch Millipore-Wasser ersetzt.

Die NTBI-Bestimmung erfolgte mittels der AAS (s.o. Kap. 2.3.1).

2.4 Statistische Methoden

Die Daten wurden mit den statistischen Funktionen der Tabellenkalkulationssoftware EXCEL 2000 (Microsoft Corp., Seattle, WA, USA) und der Statistiksoftware STATISTICA (StaSoft Inc., Tulsa, OK, USA) ausgewertet.

Mittelwerte (mean), Standardabweichungen (SD), Fehler der Mittelwerte (SEM) und Korrelationskoeffizienten (Pearson) wurden für normal verteilte Variablen bestimmt. Die Normalverteilung wurde für eine Schiefe (skewness) < 1 angenommen. Für die nicht normal verteilten Variablen wurden nichtparametrische Werte und Tests benutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Reproduzierbarkeit der standardisierten NTBI-Bestimmung

Die Arbeitsmaterialien zur NTBI-Bestimmung wurden mit Ausnahme der Mikrofiltersysteme eisenfrei gewaschen. Bei bestimmten Chargen der Mikrofiltersysteme fanden sich Eisenkontaminationen, sodass die Probenleerwerte zwischen 0,56 bis 10,0 $\mu\text{mol Eisen/l}$ lagen. Ein Waschen der Mikrofilter mit 10 mM bzw. 80 mM NTA-Lösung, 100 mg DFP/l-Lösung oder Millipore-Wasser erbrachten keine signifikanten Eiseneliminationen.

Zur Ermittlung der Präzision der NTBI-Bestimmung wurden Kontrollseren eingeführt. Diese wurden in einer Mehrfachbestimmung an einem Tag (s. Tab. 3) gemessen und bei folgenden Messungen (s. Tab. 4) mitgeführt.

3.1.1 NTBI-Bestimmung in Serie

Serumpool (n)	Mean NTBI [$\mu\text{mol/l}$]	SD [$\mu\text{mol/l}$]	COV [%] brutto	COV [%] netto
B (9)	0,68	0,13	5,7	18,9
C (7)	4,51	0,23	4,5	5,20
blank B (2)	0,81			
blank C (2)	0,74			

Tab. 3: Variation von 2 Seren (B, C) in einer Bestimmung.
Variation of 2 sera (B, C) in one measurement.

Die Ergebnisse in Tabelle 3 verdeutlichen eine gute Reproduzierbarkeit der standardisierten NTBI-Bestimmung. Beim Ansatz der Probenleerwerte wird eisenfreies Wasser sog. Millipore-Wasser anstelle von Serum verwendet. Die teilweise hohen Probenleerwerte klären sich durch Eisenkontaminationen der Mikrofiltersysteme, dieses Eisen wird an NTA gebunden und als Eisen-NTA-Komplex gemessen. Bei verschiedenen Mikrofilterchargen als auch innerhalb einer Charge fanden sich quantitative Unterschiede. Im Serum von Normalpersonen liegt eine freie Transferrinbindungskapazität vor, sodass das Eisen aus den Mikrofiltersystemen an Transferrin gebunden wurde. Dieses erscheint folglich nicht als Eisen-NTA-Komplex. Dies stellt die Erklärung für negative NTBI-Konzentrationen bei

gesunden Patienten dar. Aufgrund dieses Ergebnisses ist die Einführung eines Serumleerwertes zumindestens bei Normalpersonen zu diskutieren. Bei Patienten mit ausgeprägter Eisenüberladung, gesättigtem Transferrin und hohem NTBI ist weiterhin der Probenleerwert mit Millipore-Wasser zu empfehlen.

3.1.2 NTBI-Bestimmung über einen Zeitraum von 2 Jahren

Serumpool (n)	Mean NTBI [$\mu\text{mol/l}$]	SD [$\mu\text{mol/l}$]	COV [%] brutto	COV [%] netto
A (14)	0,16	0,19	14,5	118,4
B (11)	0,70	0,15	9,8	22,0
C (10)	4,84	0,60	10,2	12,5
blanks (29)	0,90	0,17	19,2	19,2

Tab. 4: Variation von 3 Seren (A, B, C), Beobachtungszeitraum 2 Jahre.
Variation of 3 sera (A, B, C) in an observation time of 2 years.

Auch in der Mitführung der Serumpole über 2 Jahre zeigte sich eine gute Reproduzierbarkeit. Insbesondere bei sehr niedrigen NTBI-Konzentrationen wie bei Serumpool A bestätigte sich der bereits bei den Bestimmungen in Serie ausgeprägte Einfluss der Probenleerwerte auf den Variationskoeffizienten. Deshalb wäre es wie bereits unter Kap. 3.1.1 diskutiert sinnvoll bei zu erwartenden NTBI-Konzentrationen unter $0,5 \mu\text{mol/l}$ einen Serumleerwert als Probenleerwert einzusetzen.

3.1.3 Kobalt-Sättigungsmethode

Serumpool B wurde für die Anwendung der Kobalt-Sättigungsmethode ausgewählt. Es bestand die Annahme nach der Arbeit von Gosriwatana (1999), dass das Kobalt die freien Bindungsstellen des Transferrins bei einer niedrigen Transferrinsättigung von 48 % besetzt und somit NTBI messbar wird (s. Kap. 2.3.2). Es konnten jedoch in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede in den Ergebnissen der NTBI-Bestimmung mit und ohne Kobalt-Komplex festgestellt werden.

3.1.4 NTBI-Doppelbestimmung von Seren am gleichen Tag

Es wurde NTBI von 150 Seren jeweils in Doppelbestimmungen am gleichen Tag über 2 Jahre in 8 Messungen bestimmt. Die Seren wurden bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert und erstmalig für die

Doppelbestimmung aufgetaut. Das Bestimmtheitsmaß zwischen 1. und 2. Bestimmung lag bei $r^2 = 0,99$. Die Geradengleichung mit $NTBI_2 = 0,99 * NTBI_1$ ergab keinen Hinweis auf eine systematische Abweichung zwischen 1. und 2. Bestimmung.

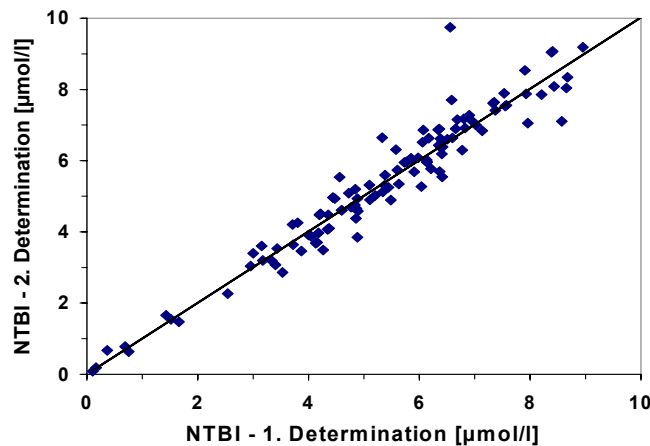


Abb. 3: Variation des NTBIs in Doppelbestimmungen von Seren am gleichen Tag bei β -Thalassämiepatienten ($r^2 = 0,99$), Beobachtungszeitraum = 2 Jahre.
Variation of NTBI in the same batch in a series of sera from patients with β -thalassemia major ($r^2=0,99$), observation time = 2 years.

3.1.5 NTBI-Reproduzierbarkeit in Seren nach 1 Jahr

In 58 Seren wurde NTBI bei Beginn der Studie und nochmals nach einem Jahr bestimmt. Die Seren wurden bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert und erstmalig für die NTBI-Bestimmung zum Zeitpunkt 0 y (Beginn der Studie) aufgetaut und ein weiteres Mal nach einem Jahr (1 y). Das Bestimmtheitsmaß lag bei $r^2 = 0,97$. Der Regressionskoeffizient zeigt mit $1,07 \pm 0,01$ keine signifikante Abweichung von 1.

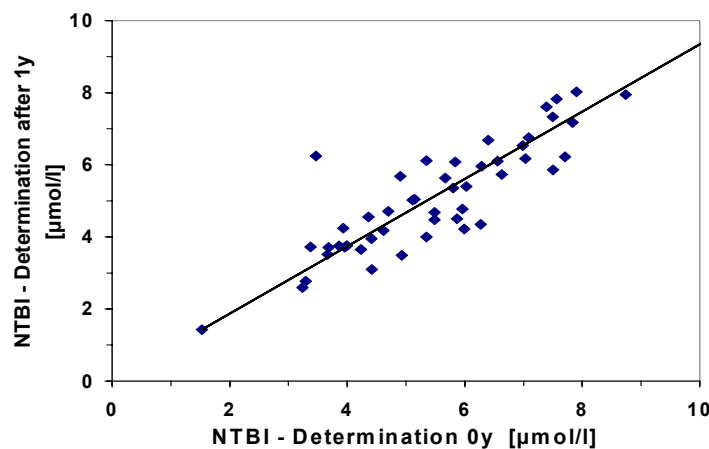


Abb. 4: Variation des NTBIs in Doppelbestimmungen initial und nach einem Jahr in Seren von Patienten mit β -Thalassämie major ($r^2 = 0,97$).
Variation of NTBI in the same batch at baseline and after one year in sera from patients with β -thalassemia major ($r^2=0,97$).

3.2 Messung der NTBI-Kinetik als Funktion der Erythropoese während eines Transfusionsintervalls

Die NTBI-Konzentrationen zeigten sowohl eine Abhängigkeit von der Transferrinsättigung als auch von der Erythropoese und den Entzündungsparametern (s. Abb. 10, 13, 14).

Der Median-NTBI-Wert stieg nach der Transfusion in Gruppe 1 (Catania) von 4,4 $\mu\text{mol/l}$ (t-Start) auf 5,6 $\mu\text{mol/l}$ (t-Ende) an, während die SI-Konzentration und die Tfs abfielen (s. Abb. 5). Es zeigten sich bei den Patienten aus Catania keine signifikanten Änderungen im Transfusionsintervall. Bei den Hamburger Patienten war der Median-NTBI-Wert 7 bis 14 Tage nach der Transfusion signifikant niedriger ($p < 0,05$). Bei einem Patienten lagen zwei NTBI-Konzentrationen $< 1 \mu\text{mol/l}$ zwischen den Transfusionen (s. Abb. 7, Patient Nr. 2).

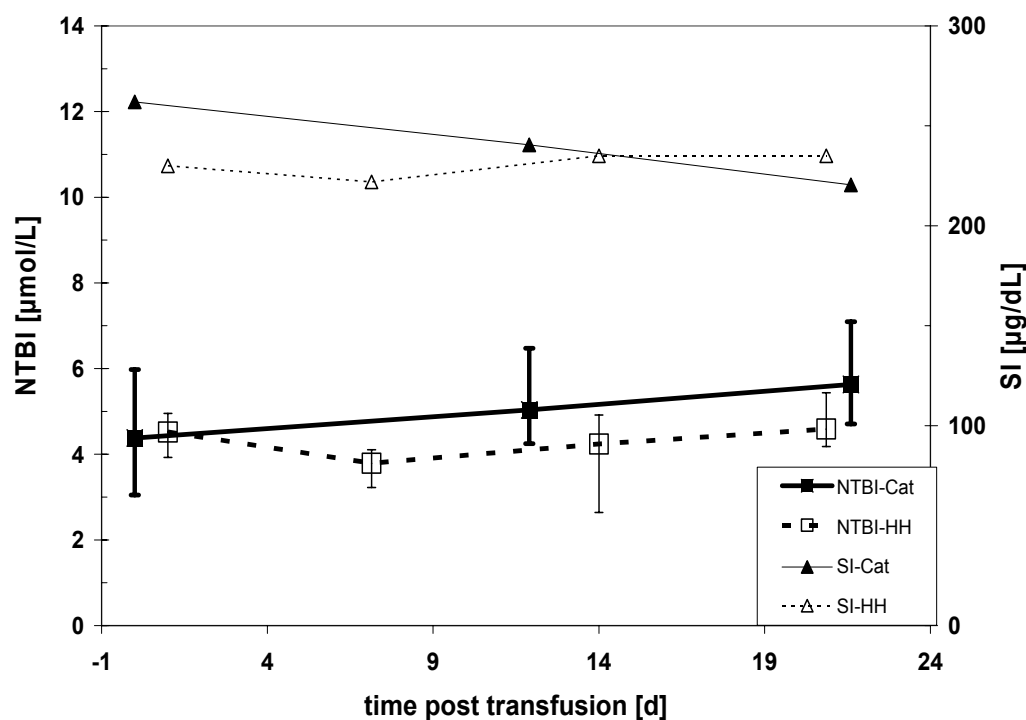


Abb. 5: NTBI- und Serumeisen (SI)-Kinetik in den Gruppen 1 (Hamburg) und 2 (Catania) der Patienten mit β -Thalassämie major unter Chelatortherapie (Blutentnahme nach einem mindestens 12-stündigen chelatorfreiem Intervall) in einem Transfusionsintervall (Median \pm 0,25 Perzentile).

NTBI and serum iron (SI)-kinetics in the groups 1 (Hamburg) and 2 (Catania) of the patients with β -thalassemia major under chelator therapy within one transfusion interval (median \pm 0.25 percentiles).

3.2.1 NTBI-Kinetiken einzelner Patienten aus Catania (Gruppe 1) und Hamburg (Gruppe 2):

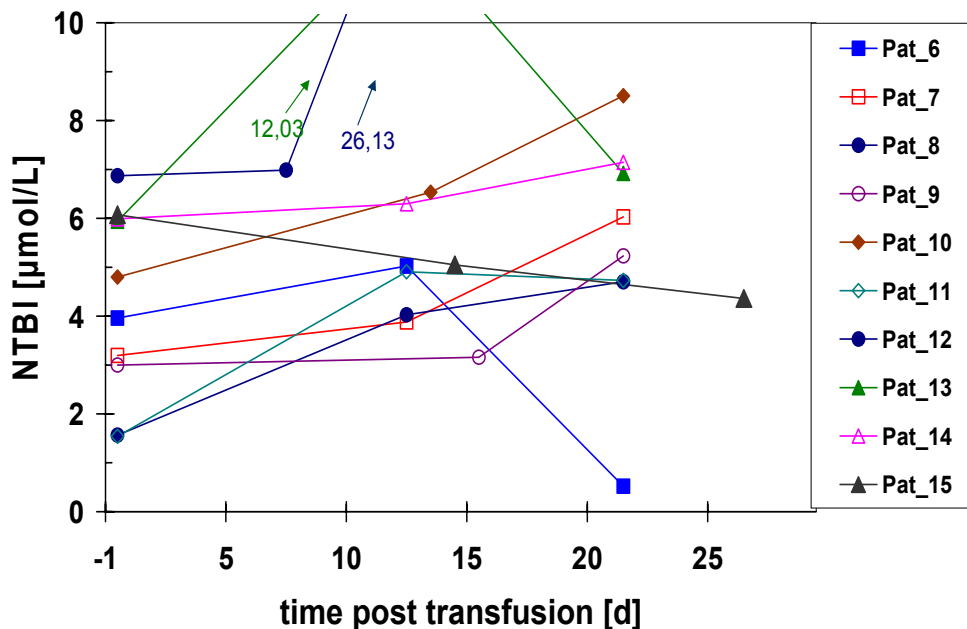


Abb. 6: NTBI-Kinetiken der Gruppe 1 (Catania) während eines Transfusionsintervalls unter Chelatortherapie.

NTBI-kinetics of group 1 (Catania) during one transfusion interval under chelator treatment.

Die Abb. 6 zeigt NTBI-Werte der Gruppe 1 (Catania) von 0,52 bis 26,13 µmol/l mit einem Median von 5,0 µmol/l. Der Median-NTBI-Wert stieg von 4,4 µmol/l (t-Start, Prätransfusion) über 5,0 µmol/l (t-Mitte) auf 5,6 µmol/l (t-Ende, Prätransfusion) an. Dieser Anstieg wurde hauptsächlich durch zwei Extremwerte über 10 µmol/l (Patient Nr. 12 und 13) verursacht.

Das Verhalten der Einzelkinetiken war sehr heterogen. Die Mehrheit der Patienten zeigte während des Transfusionsintervalls ansteigende NTBI-Werte (Patient Nr. 7 bis 10 und Nr.12), ein Patient ein abfallendes NTBI (Patient Nr. 15) und zwei ein ansteigendes NTBI in der Mitte des Transfusionsintervalls (Patient Nr. 11, 13 und 14). Die Prätransfusions-Median-NTBI-Werte waren entgegen der Erwartung gleicher Werte mit 4,4 bzw. 5,6 µmol/l verschieden. Der Messpunkt zwischen den Transfusionen lag bis auf Pat. Nr. 12 bei ca. 14 Tagen nach der letzten Transfusion.

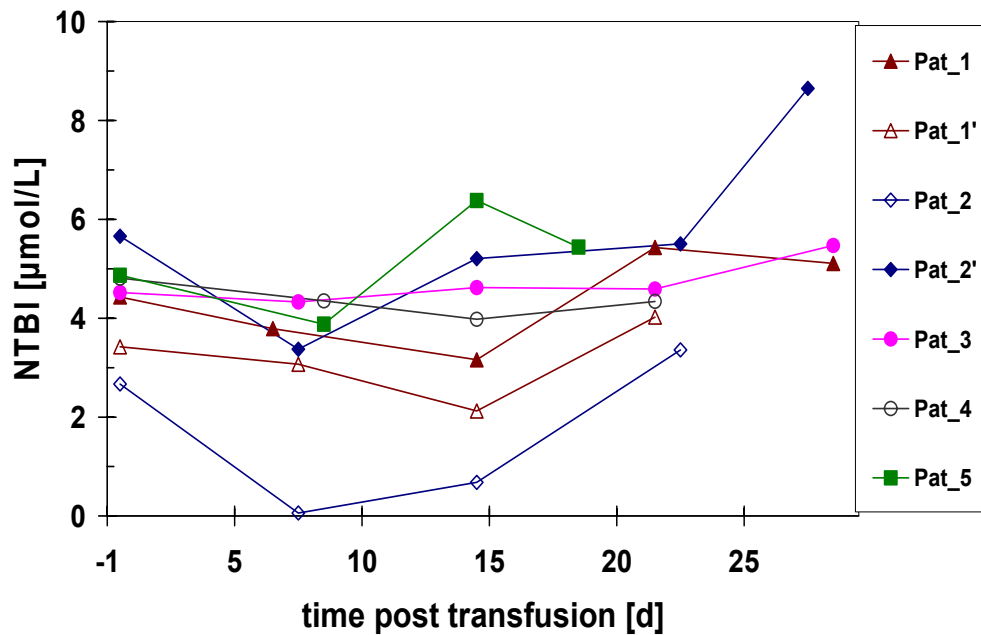


Abb. 7: NTBI-Kinetiken der Gruppe 2 (Hamburg) während eines Transfusionsintervalls unter Chelatortherapie.

NTBI-kinetics of group 2 (Hamburg) during one transfusion interval under chelator treatment.

In der Gruppe 2 (Hamburg) (s. Abb. 7) reichten die NTBI-Werte von 0,06 bis 8,65 µmol/l mit einem Median von 4,4 µmol/l. Die NTBI-Mittelwerte vor der Transfusion mit 4,4 µmol/l (t-Start) und 4,7 µmol/l (t-Ende) waren signifikant höher als die NTBI-Werte 7 und 14 Tage nach der Transfusion (t-Mitte) mit 3,3 und 3,8 µmol/l ($p < 0,05$). Bei einem Patienten (Patient Nr. 2) lagen die NTBI-Werte zwischen den Transfusionen unter 1 µmol/l.

Bei allen Patienten war NTBI 7 Tage nach der Transfusion abgefallen. Nach 14 Tagen fiel NTBI bei 3 Patienten weiter ab, im Gegensatz dazu war es bei 4 Kinetiken bereits wieder ansteigend. Am Ende des Transfusionsintervalls stieg NTBI mit Ausnahme von 2 Patienten (Patient Nr. 1 und 5) wieder an.

Die Prätransfusions-NTBI-Werte mit 4,4 bzw. 4,7 µmol/l unterlagen den üblichen Schwankungen.

Bei den folgenden zwei Patienten (Patient Nr. 1 und 2, s. Anhang Tab. A IV) wurde NTBI über zwei Transfusionsintervalle hinweg gemessen (s. Abb. 8 und 9):

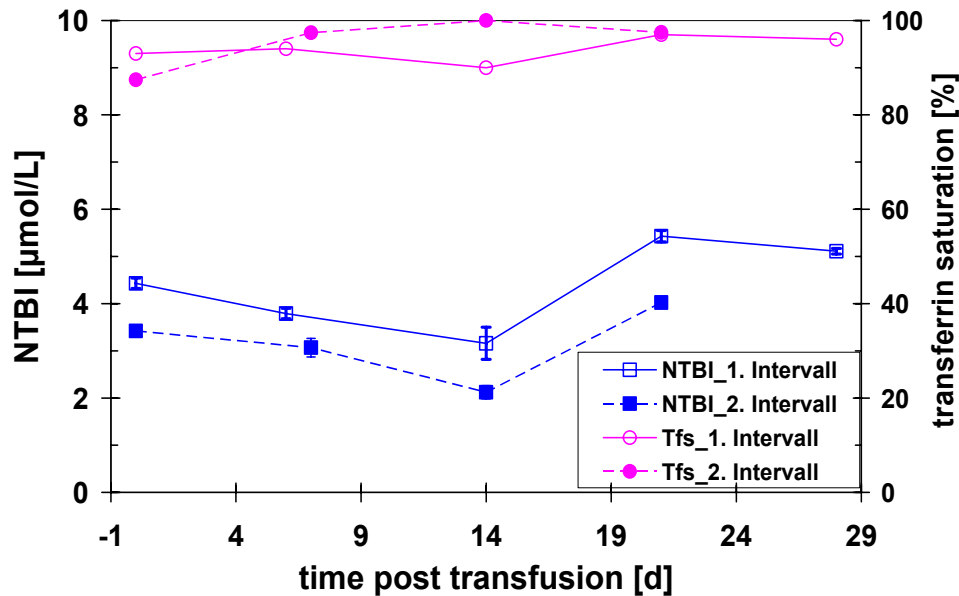


Abb. 8: NTBI-Kinetik während zweier Transfusionsintervalle eines β -Thalassämiepatienten, 1. Intervall unter Chelatortherapie, nach 14 Wochen 2. Intervall ohne Chelatortherapie, 22 y, weiblich, LIC = 980 $\mu\text{g/g}$ Leber.
NTBI-kinetics during two transfusion intervals in β -thalassemia patient, 1. interval under chelator treatment, after 14 weeks 2. interval without chelator treatment, 22 y, female, LIC = 980 $\mu\text{g/g}$ liver.

Die Abb. 8 zeigt die NTBI-Kinetik in zwei Transfusionsintervallen von Patientin Nr. 1. Zwischen den Transfusionen lagen im 1. Transfusionsintervall 28 Tage und die Chelatortherapie mit DFO wurde regelmäßig durchgeführt. Nach 14 Wochen erfolgte die Beobachtung über ein weiteres Transfusionsintervall von 21 Tagen ohne Chelatortherapie aufgrund schlechter Compliance. Die NTBI-Werte lagen zwischen 3,07 und 5,11 $\mu\text{mol/l}$ und waren somit deutlich erhöht. Es gab weder einen signifikanten Unterschied zwischen den NTBI-Einzelwerten innerhalb eines Transfusionsintervalls noch zwischen den beiden Kinetiken. Es zeigte sich aber der Trend niedrigerer NTBI-Werte 7 bis 14 Tage nach der Transfusion, diese Beobachtung traf auch für das Serumeisen zu. Das NTBI-Minimum im Transfusionsintervall lag reproduzierbar 14 Tage nach der letzten Transfusion. Bemerkenswert waren die niedrigeren NTBI-Konzentrationen ohne Chelatortherapie im 2. Intervall. Die Transferrinsättigung lag zu allen Zeitpunkten über 85%. Das Ferritin stand in keinem direkten Zusammenhang zum NTBI. Der Serumtransferrinrezeptor war auf das 1,5- bis 3-fache der Normalwerte erhöht.

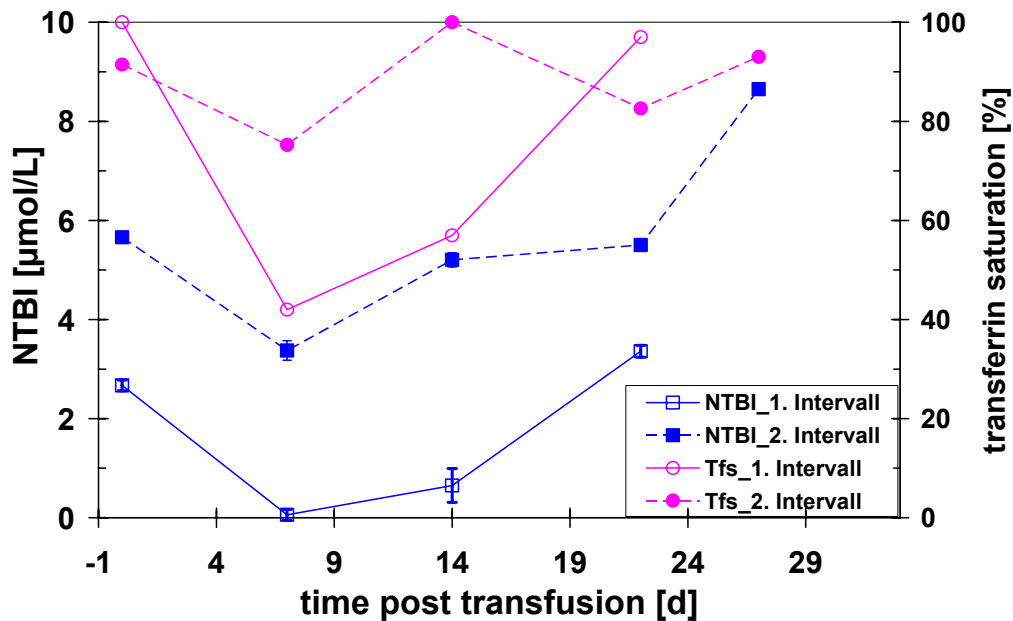


Abb. 9: NTBI-Kinetik während zweier Transfusionsintervalle, 1. und 2. Intervall unter Chelatortherapie im Abstand von 13 Wochen, eines β -Thalassämiepatienten, 10 y, weiblich, LIC = 1100 $\mu\text{g/g}$ Leber.

NTBI-kinetics during two transfusion intervals, 1. and 2. interval after 13 weeks under chelator treatment, in β -thalassemia patient, 10 y, female, LIC = 1100 $\mu\text{g/g}$ liver.

Die Abb. 9 zeigt die NTBI-Kinetik der Patientin Nr. 2 in zwei Transfusionsintervallen unter regelmäßiger Chelatortherapie mit DFO. Im 1. Transfusionsintervall lagen 22 Tage zwischen den Transfusionen. Nach 13 Wochen wurde ein weiteres Transfusionsintervall mit 27 Tagen zwischen den Transfusionen untersucht. Die NTBI-Werte lagen zwischen 0,06 und 8,65 $\mu\text{mol/l}$. Die Kinetik im 1. Transfusionsintervall zeigte signifikant niedrigere NTBI-Werte ($p < 0,05$) sowie niedrigere Serumeisen- und Transferrinsättigungswerte 7 bis 14 Tage nach der Transfusion. Die Kinetik im 2. Intervall zeigte den Trend des NTBI- und Transferrinsättigungsabfalls nach 7 Tagen. Die NTBI-Werte zwischen den Transfusionen waren jedoch nicht signifikant niedriger.

Das NTBI-Minimum lag reproduzierbar 7 Tage nach der Transfusion. Das Ferritin war unabhängig von dieser Kinetik erhöht. Der Serumtransferrinrezeptor war auf das 3- bis 4-fache der Normalwerte erhöht.

3.2.2 Parameter der erythropoetischen Aktivität

Die Parameter wurden zu verschiedenen Zeitpunkten des Transfusionsintervalls bestimmt: direkt vor der Transfusion ($t=0$), 7 ± 2 Tage nach der Transfusion ($t=1$), 14 ± 2 Tage nach der Transfusion ($t=2$), 21 ± 2 Tage nach der Transfusion bzw. direkt vor der nächsten Transfusion abhängig von der Transfusionsintervalldauer ($t=3$) und 28 ± 2 Tage nach der Transfusion bzw. vor der nächsten Transfusion ($t=4$).

Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen den NTBI-Konzentrationen und dem Serumtransferrinrezeptor (sTfR) (s. Abb. 10).

Der sTfR von $4,9 \pm 0,2$ mg/l (Mittelwert \pm SEM) bei einem Prä-Transfusions-Hb von $9,4 \pm 0,14$ g/dl (Mittelwert \pm SEM) zeigte eine 1- bis 4-fach gesteigerte erythropoetische Aktivität. Es gab keine Korrelation zwischen dem sTfR und dem Prä-Transfusions-Hb (s. Abb. 11). Weiterhin gab es keine Unterschiede in den sTfR-Konzentrationen bei einem Hb zwischen 8,5 und 11 g/dl.

Der sTfR der einzelnen β -Thalassämiepatienten war während des Transfusionsintervalls stabil und korrelierte signifikant mit der Retikulozytenzahl ($p < 0,01$), dargestellt in der Abb. 12.

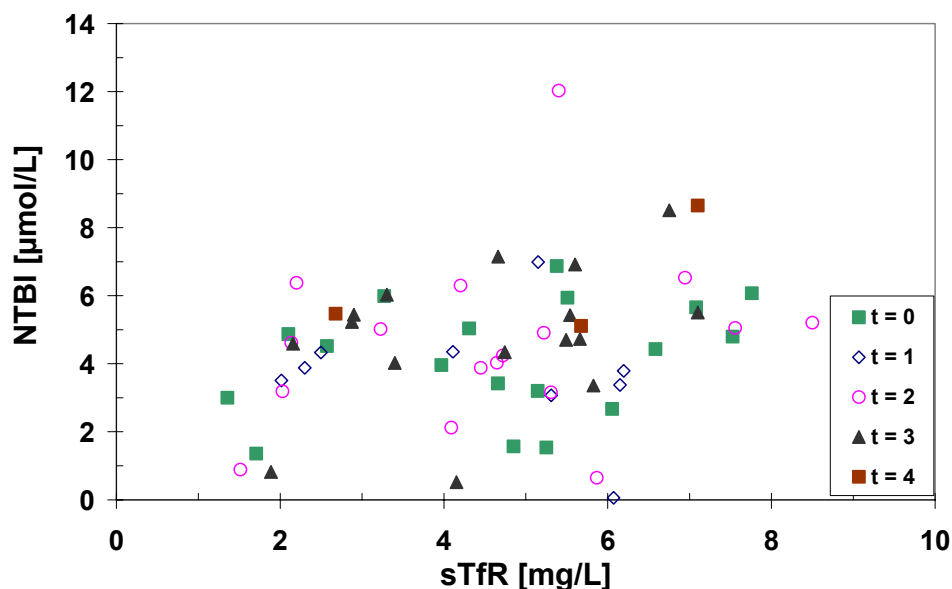


Abb. 10: Erythropoetische Aktivität (sTfR) und NTBI, $t = 0$, (3), 4 entsprechen den Zeitpunkten vor der Transfusion, $t = 1$, 2, (3) sind Messpunkte zwischen den Transfusionen. ($t=0$ - vor der Transfusion, $t=1 - 7 \pm 2$ Tage, $t=2 - 14 \pm 2$ Tage, $t=3 - 21 \pm 2$ Tage, $t=4 - 28 \pm 2$ Tage nach der Transfusion).

Erythroid activity (sTfR) and NTBI, $t = 0$, (3), 4 are the pre-transfusion times, $t = 1$, 2, (3) are the times between the transfusions. ($t=0$ - pretransfusion, $t=1 - 7 \pm 2$ days, $t=2 - 14 \pm 2$ days, $t=3 - 21 \pm 2$ days, $t=4 - 28 \pm 2$ days post transfusion).

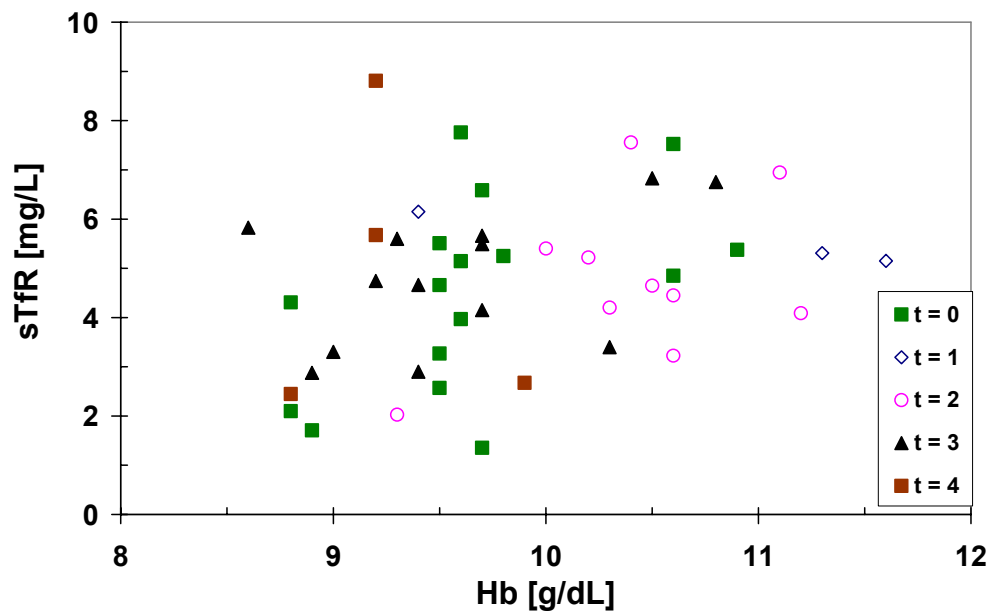


Abb.11: Darstellung der Beziehung des Serumtransferrinrezeptors (sTfR) zum Hämoglobin (Hb), t=0, (3), 4 entsprechen dem Prä-Transfusions-Hb, t=1, 2, (3) sind Messpunkte zwischen den Transfusionen, n=47.

Soluble transferrin receptor (sTfR) depending on the hemoglobin (hb), t=0, (3), 4 are the times pre-transfusion hb, t=1, 2, (3) are the times between the transfusions, n=47.

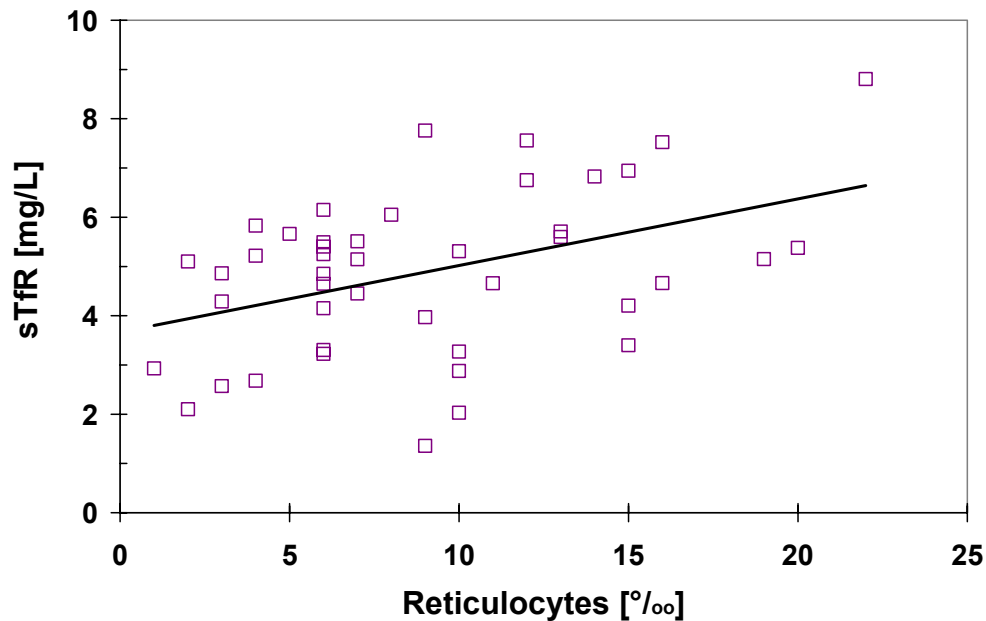


Abb. 12: Korrelation zwischen Serumtransferrinrezeptor (sTfR) und Retikulozytenzahl $r = 0,41$ $p(n=44) < 0,01$.

Correlation between soluble transferrin receptor (sTfR) and reticulocytes $r = 0,41$ $p(n=44) < 0,01$.

Die Abb. 13 zeigt, dass es keine signifikante Korrelation zwischen NTBI und dem Hb zu verschiedenen Zeitpunkten des Transfusionsintervalls gab ($r = 0,079$ p ($n = 49$) $> 0,1$).

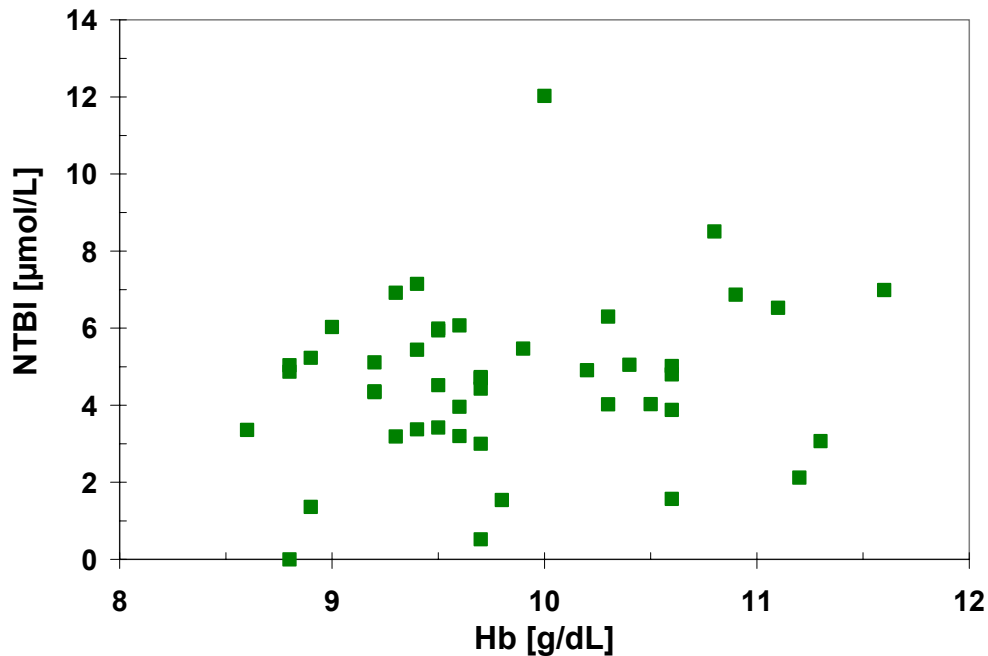


Abb. 13: Der Vergleich zwischen NTBI und Hämoglobin (Hb) zeigte keine signifikante Korrelation innerhalb eines Transfusionsintervalls.

There was no significant correlation between NTBI and hemoglobin (hb) during one transfusion interval.

3.2.3 Darstellung der Entzündungsparameter in Abhängigkeit vom NTBI

Zwischen dem NTBI und der ESR fand sich keine signifikante Korrelation (s. Abb. 14). Die Patienten mit einer Hepatitis C Infektion hatten alle eine erhöhte ESR und ALT. Bei den HCV negativen Patienten fanden sich Normalwerte oder mäßig erhöhte Entzündungsparameter. Zwischen dem Ferritin als Eisenspeicher- und Entzündungsparameter und der ESR fand sich keine signifikante Korrelation (s. Abb. 15).

Die Ferritin- und ESR-Werte der einzelnen Patienten zeigten keine signifikanten Unterschiede (T-Test) während des Transfusionsintervalls.

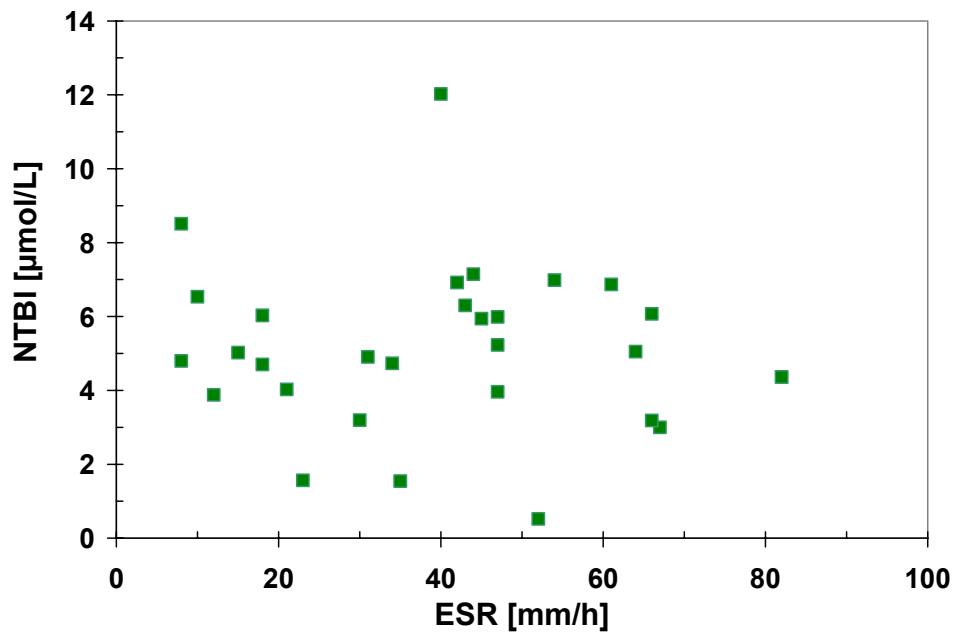


Abb. 14: NTBI in Abhängigkeit von der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (ESR).
NTBI and Erythrocyte sedimentation rate (ESR) .

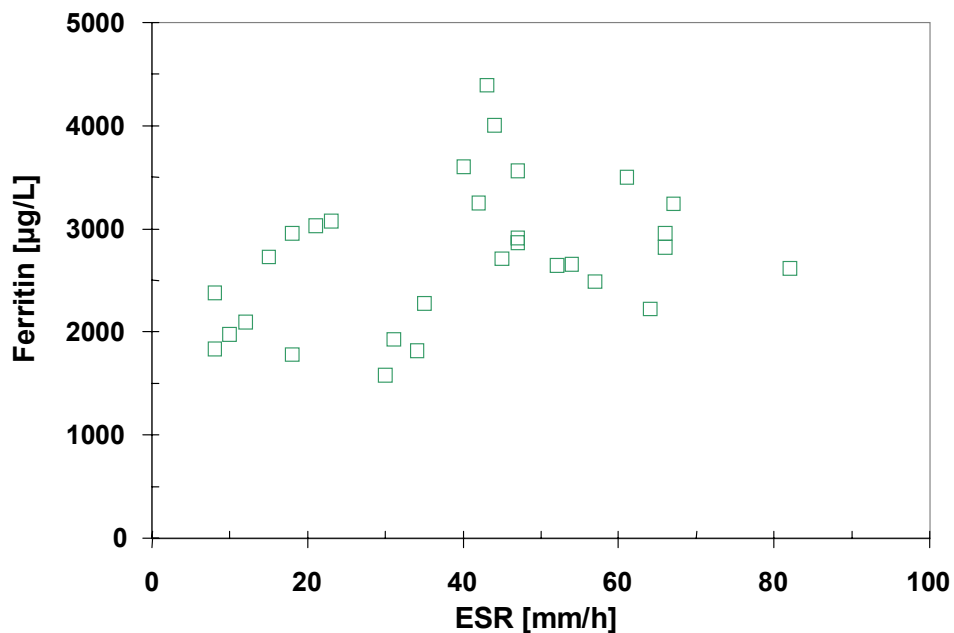


Abb. 15: Ferritin in Abhängigkeit von der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (ESR)
 $r = 0,31$ $p (n = 30) > 0,01$.
Ferritin and Erythrocyte sedimentation rate (ESR) $r = 0,31$ $p (n = 30) > 0,01$.

3.3 NTBI unter der alternierenden Chelatortherapie mit Desferrioxamine und Deferiprone im Vergleich zur Desferrioxamine Monotherapie in der Behandlung der Eisenüberladung bei Thalassämiepatienten

3.3.1 Eisenparameter

Alle Eisenparameter der 59 Thalassämiepatienten waren pathologisch erhöht.

Die folgende Tab. 5 zeigt bei Beginn und Ende der Studie Parameter des Eisenstoffwechsels (LIC = Liver Iron Concentration, SIC = Spleen Iron Concentration, SI = Serum iron = Serumeisen, NTBI = Non-Transferrin Bound Iron = Nicht-Transferrin gebundenes Eisen, TrFe = transfundiertes Eisen, TBI = Total body iron = Gesamtkörper-Speichereisen, TBIE = Total body iron elimination = Gesamtkörper-Speichereisen-Eliminationsrate):

Parameter	n	DFO monotherapy		p (W)	n	Combined therapy DFO/DFP		p (W)
		baseline	after 1 y			baseline	after 1 y	
LIC [$\mu\text{g Fe/g-liv}$]	30	1441	1213	<0,01	29	1481	1510	n.s.
SIC [$\mu\text{g Fe/g-liv}$]	4	1638	1438	n.s.	2	n.a.	n.a.	n.a.
Ferritin [$\mu\text{g/dl}$]	30	2182	1975	<0,01	29	2140	1718	n.s.
SI [$\mu\text{g/dl}$] ¹⁾	19	224	195	n.s.	19	219	210	n.s.
SI [$\mu\text{g/dl}$] ²⁾	7	218	164	< 0,05	8	267	218	n.s.
NTBI [$\mu\text{mol/l}$] ¹⁾	22	5,2	6,7	< 0,01	20	5,2	6,5	< 0,05
NTBI [$\mu\text{mol/l}$] ²⁾	8	9,0	4,3	n.s.	9	10,7	8,1	n.s.
TrFe [mg Fe/d]	30	20,4	19,8	n.s.	29	22,4	21,9	n.s.
TBI [mg Fe]	30	2682	2608	< 0,01	29	3089	3267	n.s.
TBIE [mg Fe/d]	30	n.a.	21,9 ³⁾		29	n.a.	22,6 ³⁾	

1) patients from Cagliari and Torino

2) patients from Athens

3) p = n.s., significance was tested between DFO monotherapy and DFO/DFP by U-test

Tab. 5: Medianwerte der Eisenstoffwechsellparameter von 59 Patienten mit β -Thalassämie major in der alternierenden Chelatortherapie mit Desferrioxamine und Deferiprone im Vergleich zur Desferrioxamine Monotherapie. Signifikante Unterschiede zwischen den Medianwerten zu Beginn (baseline) und am Ende der Studie (after 1 y) wurden mit dem Wilcoxon-Test für gepaarte Daten geprüft (p (W)).

Median values of iron metabolism parameters of 59 patients with β -thalassemia major in the alternate chelator therapy with DFO and DFP as compared with DFO monotherapy. Significant differences between median values at baseline and after one year were tested by the paired Wilcoxon-test (p (W)).

3.3.2 Eisen- und Volumenbestimmung in Leber und Milz

Die LIC reichte von 332 bis 4016 $\mu\text{g/g}_{\text{Leber}}$ ($n = 118$, Mittelwert: 1536 $\mu\text{g/g}_{\text{Leber}}$). Wie in Tab. 5 gezeigt, sank sie in der DFO-Gruppe signifikant von einem Medianwert von 1441 (baseline) auf 1213 $\mu\text{g Fe/g}_{\text{Leber}}$ (after 1 y). In der DFO/DFP-Gruppe war keine signifikante Änderung zu verzeichnen. Dies spiegelte sich auch in den Ferritinwerten und im TBI wider. Wegen der Schwierigkeiten bei der TEBK-Bestimmung wurde nur das Serumeisen statt der mehr geeigneten Tfs in die statistische Analyse einbezogen. Interessanterweise zeigten die NTB-Werte unter DFO-Monotherapie in der Turin-Cagliari-Gruppe einen signifikanten Anstieg von 5,7 auf 6,7 $\mu\text{mol/l}$.

Die TBIE, die auch Änderungen im Transfusionsregime berücksichtigt, zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen einer Chelatormonotherapie mit DFO an 5 bis 6 Tagen pro Woche zur kombinierten Chelatortherapie mit DFO und DFP, die alternierend an 2 Tagen (DFO) und 5 Tagen (DFP) pro Woche angewandt wurde.

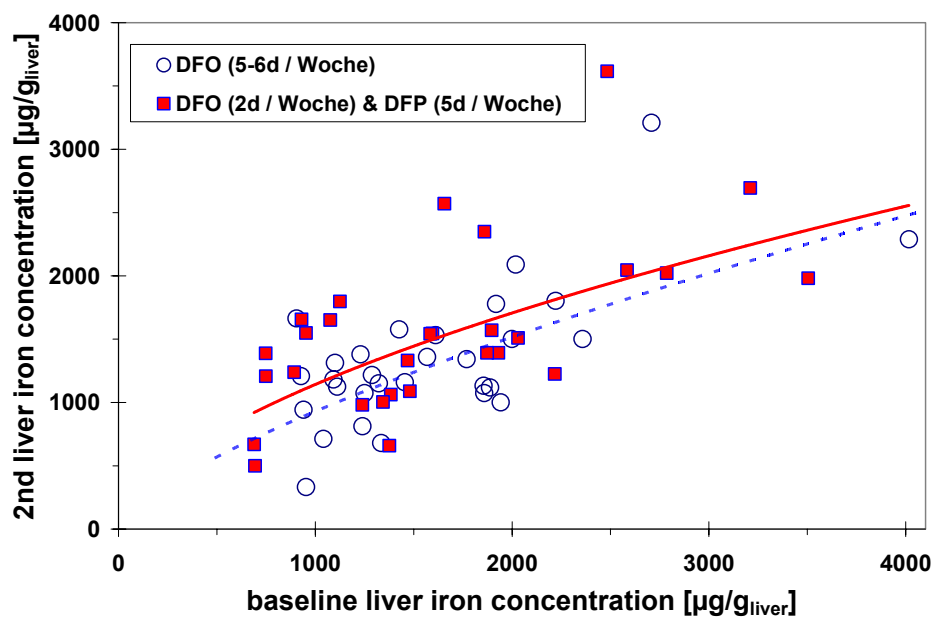


Abb. 16: Korrelation der Lebereisenkonzentration nach logarithmischer Transformation bei Beginn mit der nach einem Jahr: DFO-Monotherapie und DFO / DFP-Kombinationstherapie.

Correlation of liver iron concentration after logarithmic transformation at baseline with LIC after 1 year: DFO-monotherapy and DFO / DFP alternate chelation therapy.

In Abb. 16 wurden die LIC-Werte für die beiden Therapiegruppen bei Beginn (0 y) mit denen nach einem Jahr (1 y) korreliert. Wegen der Schiefe der Verteilung wurden die Werte logarithmisch transformiert (äquivalent: Potenzfunktion).

DFO: $\ln(\text{LIC}(0 \text{ y})) = (2.0 \pm 1.3) + (0.7 \pm 0.2) \cdot \ln(\text{LIC}(1 \text{ y}))$

DFO / DFP: $\ln(\text{LIC}(0 \text{ y})) = (3.0 \pm 1.0) + (0.6 \pm 0.1) \cdot \ln(\text{LIC}(1 \text{ y}))$

Die Korrelationen sind zwar hoch signifikant (DFO: $p < 0.01$, DFO / DFP: $p < 0.001$), die Funktionsparameter lassen jedoch im 95 %-Vertrauensbereich keinen deutlichen Unterschied im gesamten LIC-Bereich erkennen.

Die SIC wurde nur bei Patienten mit einem Milzvolumen von mehr als 400 ml mittels SQUID bestimmt und konnte nur bei insgesamt 6 Patienten bei Beginn und Ende der Studie gemessen werden. Die SIC der anderen Patienten wurde berechnet. Bei den meisten Patienten waren sowohl Leber als auch Milz vergrößert (s. Anhang, Tab. A4). Mit zunehmender LIC nimmt die Hepatosplenomegalie zu (s. Abb. 17). Der Lebervergrößerungsindex (enlargement ratio: mean \pm SD) in Relation zu einem normalen Organvolumen betrug $1,2 \pm 0,2$ und der Milzvergrößerungsindex $1,4 \pm 0,6$.

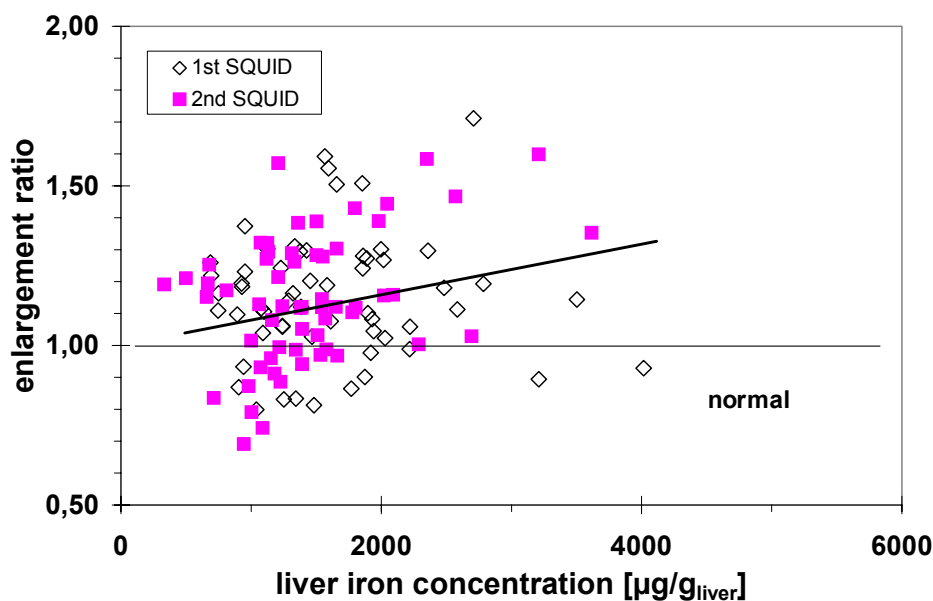


Abb. 17: Lebervolumen-Vergrößerung bei 59 Patienten mit β -Thalassämie major als Funktion der Lebereisenkonzentration unter DFO-Monotherapie und DFO / DFP-Kombinationstherapie. Die Linie zeigt die Beziehung zwischen Lebervolumenvergrößerung in Bezug zur LIC in der 1. SQUID-Messung.

Liver enlargement of 59 patients with β -thalassaemia major as function of the liver iron concentration under DFO-monotherapy and alternate chelation therapy with DFO and DFP.

3.3.3 Serumeisen und Transferrinsättigung

Der SI-Median sank signifikant (T-Test, $p < 0,01$) bei Betrachtung aller Patienten unabhängig vom Therapieregime von basal 223 $\mu\text{g}/\text{dl}$ auf 200 $\mu\text{g}/\text{dl}$ ($n = 57$; range: 127 – 311 $\mu\text{g}/\text{dl}$) nach einem Jahr. Diese signifikante Änderung wird durch die Athener Patientengruppe mit extrem hohen SI-Werten bei Studienbeginn verursacht. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass es bei der Athener Patientengruppe keine Angaben zum Blutabnahmezeitpunkt im Bezug zur letzten Transfusion gibt.

In den beiden Therapiegruppen war die Tfs sowohl bei Beginn als auch nach einem Jahr pathologisch erhöht und fiel von $95 \pm 18 \%$ ($n = 46$, range: 48 - 144 % baseline) auf $80 \pm 15 \%$ ($n = 48$, range: 41 – 99 nach 1 Jahr) ab. Die Problematik der Tfs besteht zum einem darin, dass sie sich aus dem Verhältnis vom SI zur TEBK berechnet und sich somit rein rechnerisch Werte über 100 % finden. Zum anderen kann man aus der Höhe der pathologischen Tfs nicht auf den Grad der Eisenüberladung oder die Höhe des NTBI schließen.

3.3.4 NTBI in Bezug zum Transfusionsintervall

Wie in Tab. 5 bereits gezeigt, gab es keine hoch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Chelatortherapieregimen.

Bei der griechischen Patientengruppe sind die NTBI-Werte unabhängig vom Therapieregime nach einem Jahr nicht signifikant niedriger (s. Kap. 3.3.1, Tab. 5). Es gab im Gegensatz zur italienischen Gruppe keine Angabe über den Blutentnahmezeitpunkt in Beziehung zum Transfusionsintervall oder der letzten Chelatoreinnahme.

In der Abb. 18 sind die NTBI-Werte der Athener Gruppe zu Beginn der Studie (1) und nach einem Jahr (2) dargestellt. Bei 4 Patienten (Patient Nr. 708, 714, 715 und 716, s. Anhang Tab. A3) waren die NTBI-Konzentrationen nach einem Jahr angestiegen, bei den anderen 13 Patienten waren die NTBI-Werte stationär oder nicht signifikant niedriger.

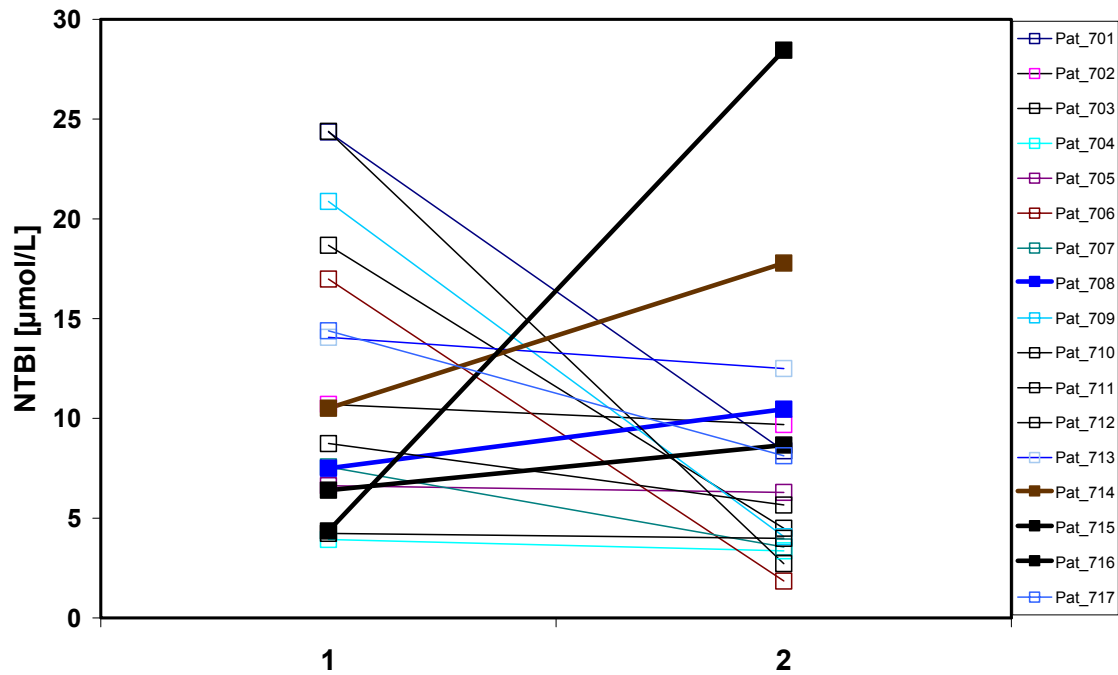
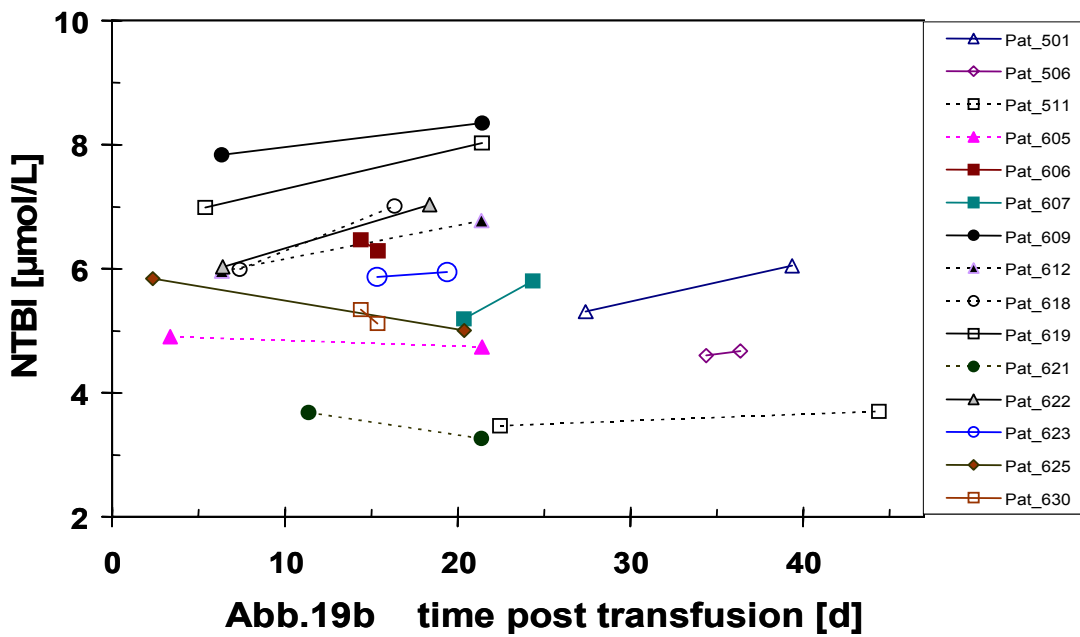
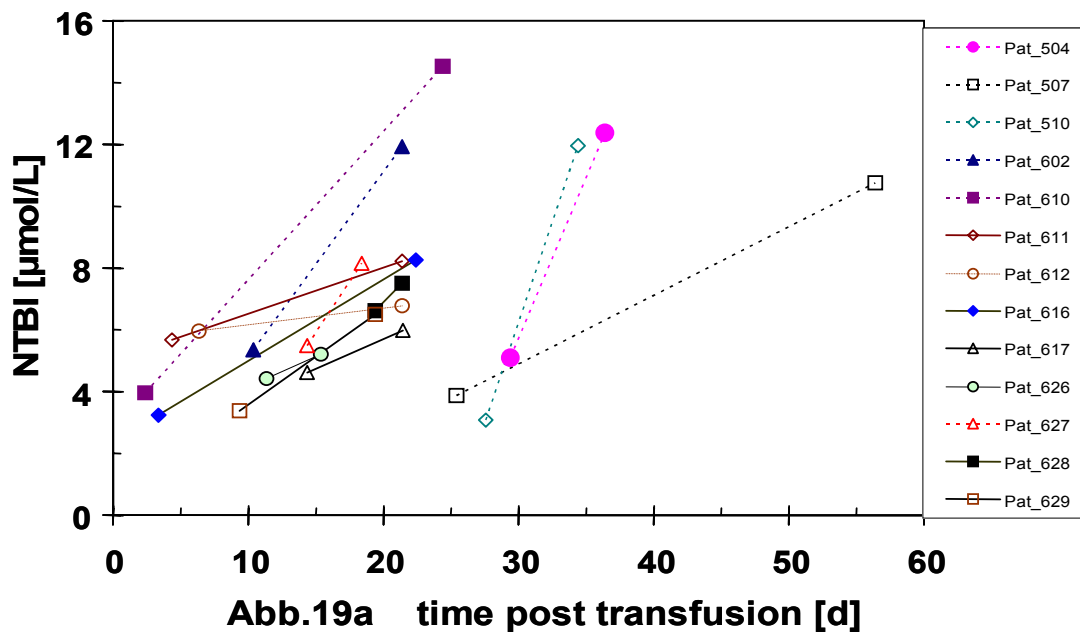


Abb. 18 NTBI unter DFO-Monotherapie und kombinierter DFO / DFP Therapie bei Beginn der Studie (1) und nach einem Jahr (2) in der Athener-Patientengruppe.
NTBI under DFO-monotherapy and combined DFO / DFP treatment at baseline (1) and after one year (2) of the Athens patients group.

Bei den italienischen Patientengruppen aus Turin und Cagliari fanden sich nach einem Jahr bei dem DFO/DFP- Therapieregime nicht signifikant, bei dem DFO-Therapieregime signifikant höhere NTBI-Werte (s. Kap. 3.3.1, Tab. 5). Die Blutentnahmen basal erfolgten weitestgehend zu Beginn des Transfusionsintervalls im Gegensatz zu denen nach einem Jahr, die weitestgehend am Ende des Transfusionsintervalls abgenommen wurden (s. Kap. 2.1.2, Abb. 2). Zwischen der Blutentnahme und der letzten Chelatoreinnahme lagen mindestens 12 Stunden.

Die folgenden vier Abbildungen (Abb. 19 a, b, c, d) zeigen die NTBI-Werte der einzelnen italienischen Patienten zu Studienbeginn und nach einem Jahr unter DFO-Monotherapie oder DFO / DFP-Kombinationstherapie in Bezug zum Blutentnahmezeitpunkt zur letzten Transfusion.



In Abb. 19 a zeigen sich hohe NTBI-Werte am Ende des Transfusionsintervalls und in Abb. 19 b nahezu konstant hohe NTBI-Werte innerhalb des Transfusionsintervalls. Dieses Ergebnis ist bedingt vereinbar mit der Hypothese, dass nach der Transfusion die ineffektive Erythropoese gehemmt wird und weniger NTBI auftritt.

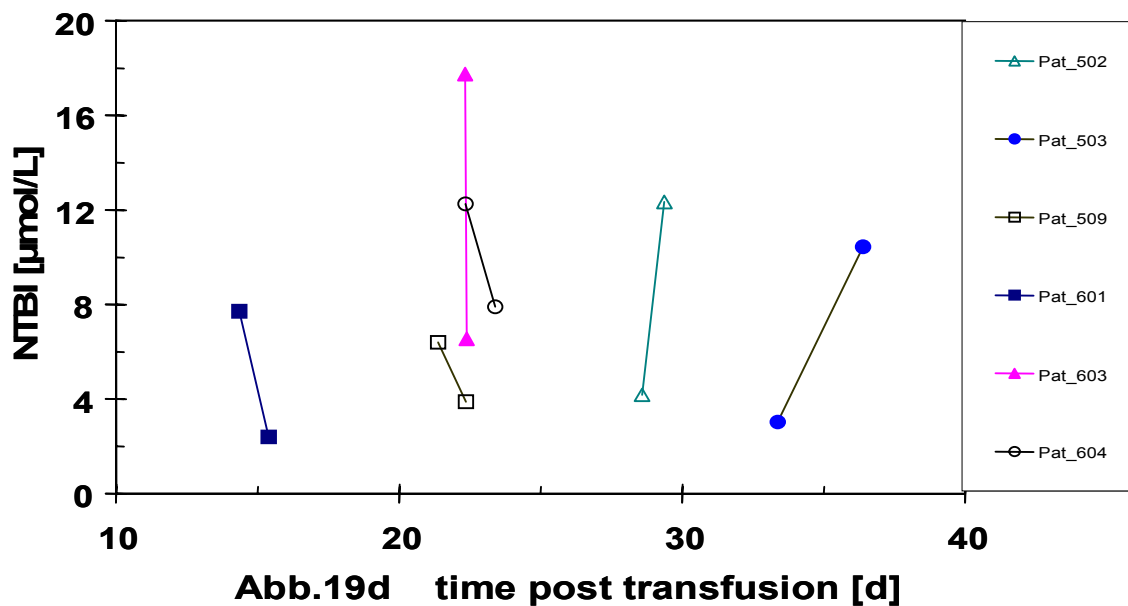
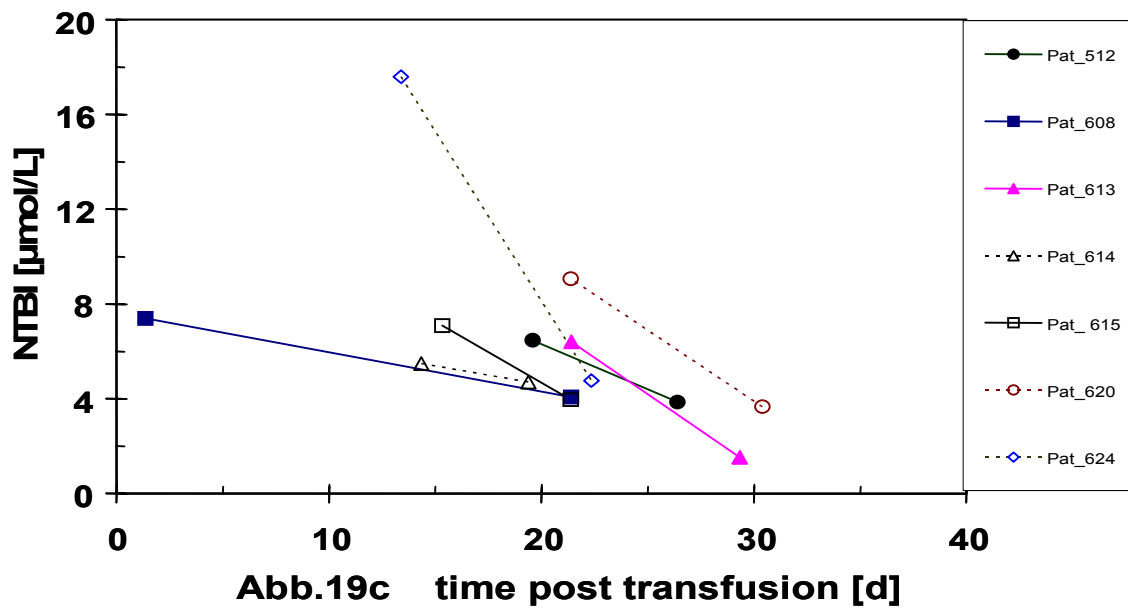


Abb.19: NTBI unter DFO-Monotherapie und DFO / DFP-Kombinationstherapie bei Beginn der Studie und nach einem Jahr bezüglich des Blutentnahmezeitpunktes zur letzten Transfusion in der Turin- und Cagliari-Patientengruppe. (a) höhere NTBI-Werte am Ende des Transfusionsintervalls, (b): gleich bleibende NTBI-Konzentrationen im Transfusionsintervall, (c): niedrigere NTBI-Werte am Ende des Transfusionsintervalls, (d): verschiedene NTBI-Werte zum gleichen Zeitpunkt \pm 2 Tage im Transfusionsintervall.

NTBI under DFO-monotherapy and combined DFO / DFP treatment at baseline and after one year of the Torino and Cagliari patients groups.

Hingegen lässt sich für Abb. 19 c mit niedrigen NTBI-Konzentrationen zum Ende des Transfusionsintervalls und Abb. 19 d mit individuell sehr verschiedenen NTBI-Konzentrationen zum gleichen Zeitpunkt innerhalb des Transfusionsintervalls kein Erklärungsmodell aufstellen.

3.3.5 NTBI in Abhängigkeit von der Eisenüberladung, dem Therapieregime und der Splenektomie

Die Rolle des NTBI bei Eisenüberladung

Beziehung zwischen NTBI und Serumeisen:

Die NTBI-Werte korrelierten unabhängig vom Therapieregime (DFO-Monotherapie; DFO 2 d /Woche und DFP 5 d /Woche) als auch vom Messzeitpunkt (basal 0 y; nach 1 Jahr 1 y) signifikant mit dem SI ($n = 113$, $r = 0,52$ $p < 0,001$) (s. Abb. 20 und 21). Ausnahmen bildeten der Patient Nr. 714 mit einem NTBI von $17,8 \mu\text{mol/l}$ bei sonst niedrigen Eisenparametern (SI $27 \mu\text{g/dl}$, Tfs 41 %, Ferritin $1475 \mu\text{g/l}$) und Patient Nr. 715 mit einem extrem hohem NTBI von $28,5 \mu\text{mol/l}$ bei sonst mäßig erhöhten Eisenparametern (SI $225 \mu\text{g/dl}$, Tfs 67 %, Ferritin $1718 \mu\text{g/l}$).

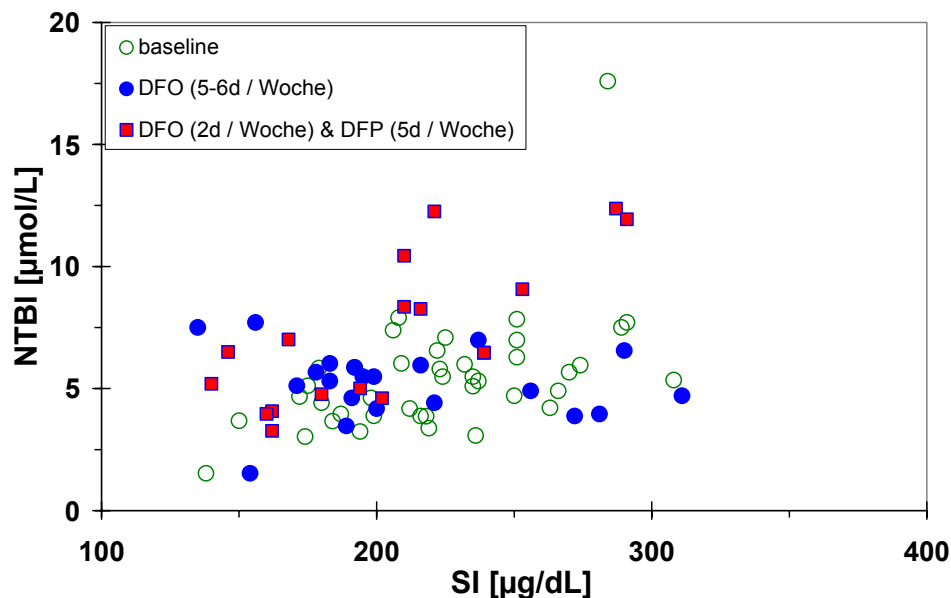


Abb. 20: Korrelation zwischen NTBI und Serumeisen (SI) in den Patientengruppen aus Turin und Cagliari $n = 81$.

Correlation between NTBI and serum iron (SI) of the Torino and Cagliari patients groups $n = 81$.

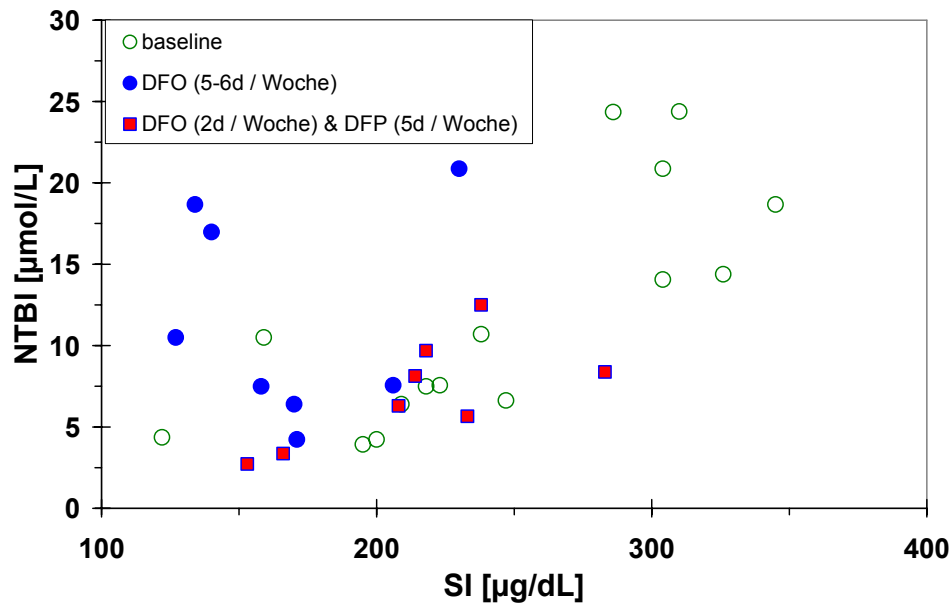


Abb.21: Korrelation zwischen NTBI und Serumeisen (SI) in der Patientengruppe aus Athen n = 32.

Correlation between NTBI and serum iron (SI) of the Athens patients group n = 32.

Beziehung zwischen NTBI und Transferrinsättigung:

Es war keine signifikante Korrelation zwischen NTBI und der Tfs nachweisbar. Alle NTBI-Werte und Tfs waren pathologisch erhöht. Der Unterschied zwischen dem griechischen Patientenkollektiv mit extrem hohen NTBI-Werten bei teilweise im Normbereich liegenden Tfs-Werten und dem italienischen Patientenkollektiv mit gering erhöhten NTBI-Werten könnte die fehlende signifikante Korrelation begründen (s. Abb. 22 und 23, Anhang Tab. A3, Patienten Nr. 701 - 717). Bei dem griechischen Patienten Nr. 714 wurde eine im oberen Normbereich liegende Transferrinsättigung von 50 % (baseline) bzw. 41 % (nach 1 Jahr) gemessen. Bei einer zu erwartenden freien Eisenbindungskapazität wäre kein NTBI bzw. eine niedrige NTBI-Konzentration anzunehmen, aber es wurden hohe NTBI-Werte von 10,5 µmol/ (baseline) bzw. 17,8 µmol/l (nach einem Jahr) gemessen.

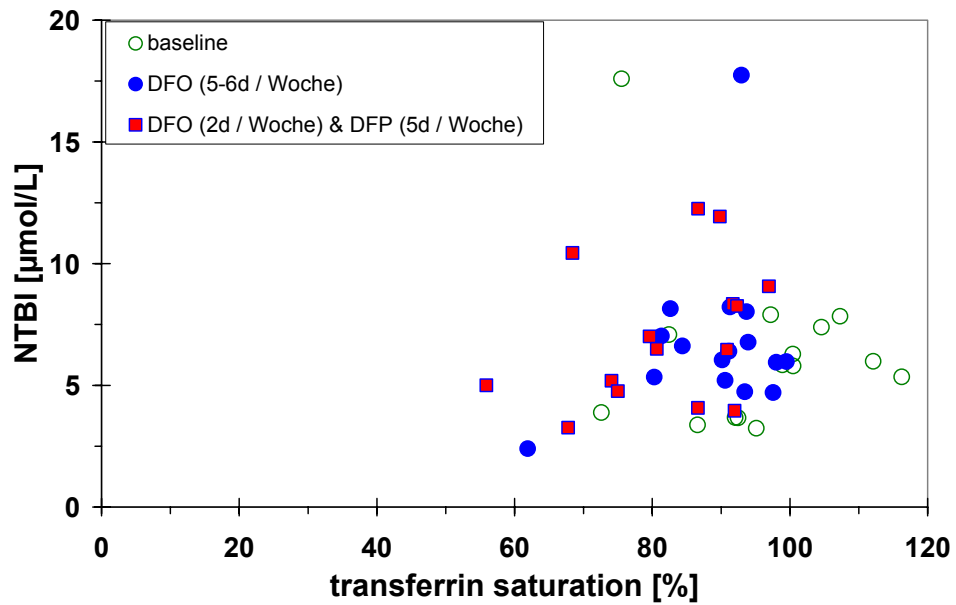


Abb. 22: Vergleich zwischen NTBI und Transferrinsättigung in der Patientengruppe aus Turin und Cagliari.

Comparison between NTBI and transferrin saturation of the Torino and Cagliari patients groups.

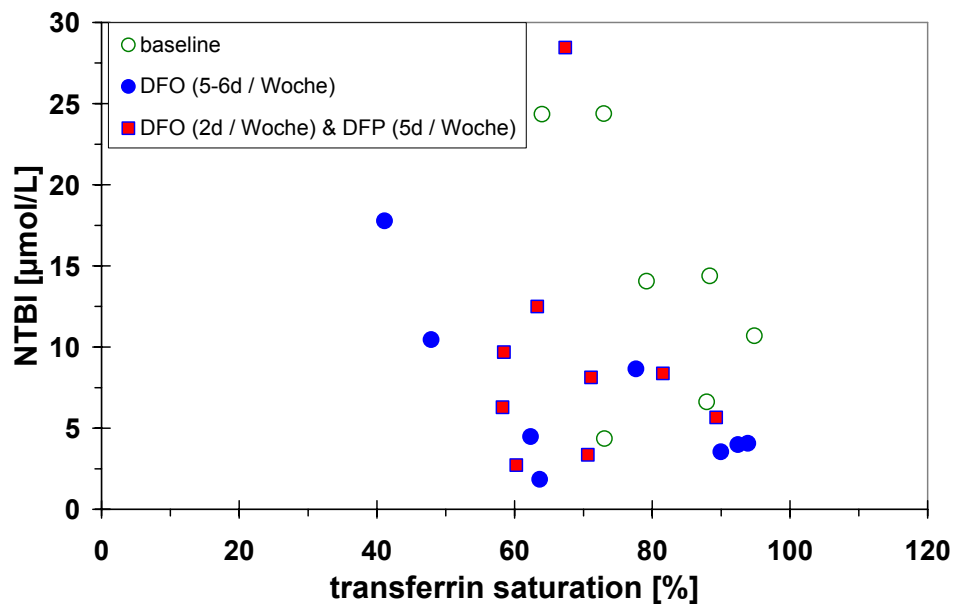


Abb. 23: Vergleich zwischen NTBI und Transferrinsättigung in der Patientengruppe aus Athen

Comparison between NTBI and transferrin saturation of the Athens patients group

Lebereisenkonzentration:

Es gab keine Korrelation zwischen NTBI und LIC. Dieses Ergebnis war unabhängig von einer Trennung der Patientenkollektive (Turin und Cagliari / Athen). Bei einer erhöhten LIC war das NTBI bei allen Patienten nachweisbar. Von der absoluten Höhe des NTBIs konnte man nicht auf die LIC schließen.

In Abb. 24 ist die Beziehung zwischen NTBI und LIC bei dem italienischen Patientenkollektiv dargestellt. Über 80 % der NTBI-Werte lagen im Bereich von 500 bis 2500 $\mu\text{g Fe/g}_{\text{Leber}}$. In diesem Bereich lag der Median-NTBI bei 5,98 $\mu\text{mol/l}$ (25 % Quantil 4,66 $\mu\text{mol/l}$; 75 % Quantil 7,61 $\mu\text{mol/l}$).

Eine Ausnahme bildete der Patient Nr. 603. Bei diesem Patienten fand sich nach einem Jahr eine LIC von 332 $\mu\text{g Fe/g}_{\text{Leber}}$ und eine SIC von 508 $\mu\text{g Fe/g}_{\text{Milz}}$ bei sonst erhöhten Eisenstoffwechselfparametern: NTBI 17,7 $\mu\text{mol/l}$, Tfs 93 % und einem Ferritin von 2080 $\mu\text{g/l}$.

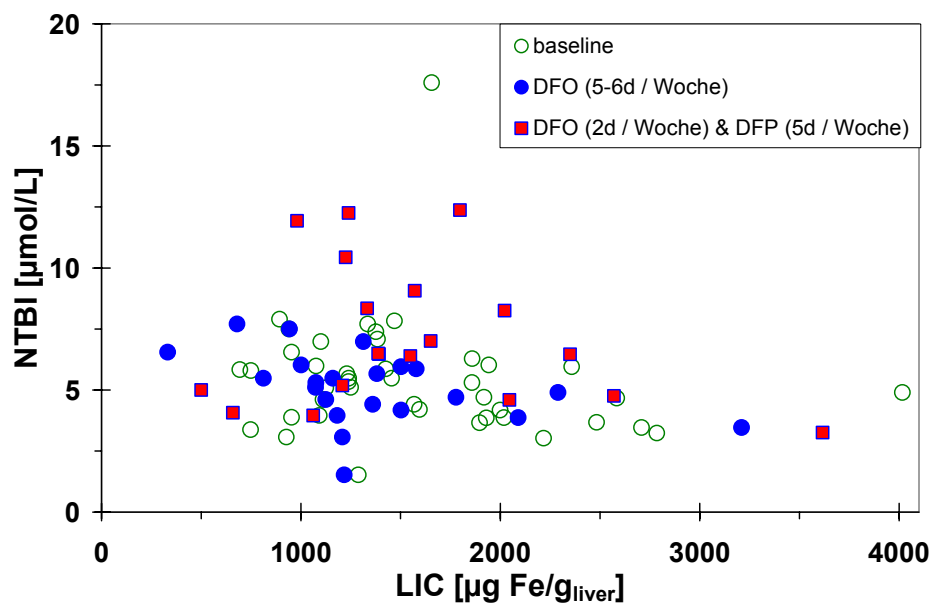


Abb. 24: Lebereisenkonzentration (LIC) und NTBI bei Patienten aus Turin und Cagliari mit β -Thalassämie major in Abhängigkeit von der Lebereisenkonzentration unter der DFO-Monotherapie und DFO/DFP-Kombinationstherapie.

Liver iron concentration (LIC) and NTBI of the Torino and Cagliari patients groups under DFO monotherapy and combined DFO/DFP therapy.

In Abb. 25 ist die Athener Patientengruppe dargestellt. Auch hier lagen deutlich über 80 % der NTBI-Werte im Bereich zwischen 500 bis 2500 $\mu\text{g Fe/g}_{\text{Leber}}$. Im Gegensatz zum italienischen Patientenkollektiv fand sich in diesem Bereich ein Median-NTBI von 8,52 $\mu\text{mol/l}$ (25 % Quantil 5,37 $\mu\text{mol/l}$; 75 % Quantil 14,14 $\mu\text{mol/l}$). Die deutlich höheren NTBI-

Konzentrationen bei dem griechischen Patientenkollektiv könnten möglicherweise in einer bestimmten Genmutation der griechischen β -Thalassämiepatienten begründet sein.

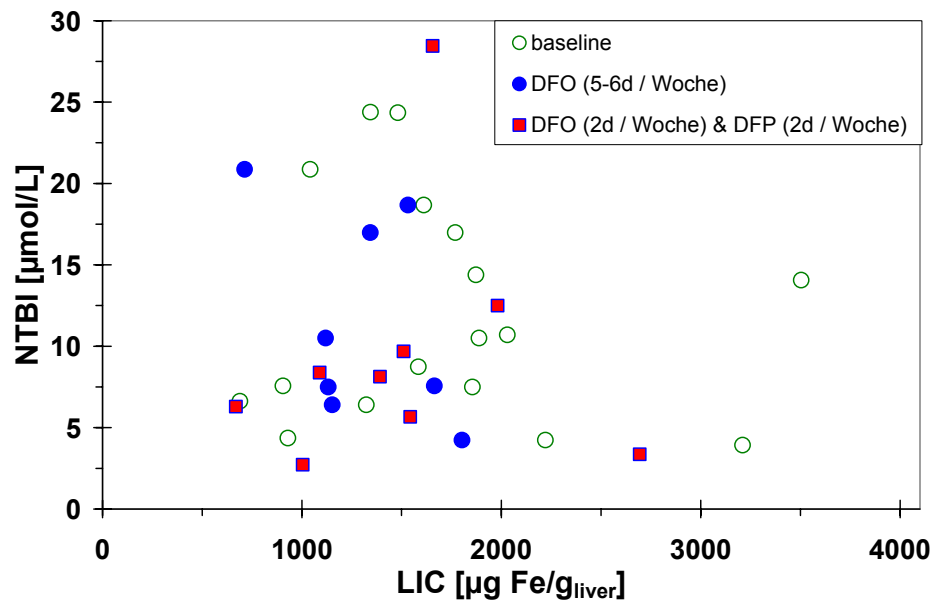


Abb. 25: Lebereisenkonzentration (LIC) und NTBI bei den Patienten aus Athen mit β -Thalassämie major in Abhängigkeit von der Lebereisenkonzentration unter der DFO-Monotherapie und DFO/DFP-Kombinationstherapie.

Liver iron concentration (LIC) and NTBI of the Athen patients group under DFO monotherapy and combined DFO/DFP therapy.

Zusammenhänge zwischen NTBI und weiteren Parametern:

- Die NTBI-Werte zeigten weder eine Abhängigkeit von der Chelator dosis generell noch von den einzelnen Chelatortherapieregimen.
- Auch die spezifische Chelator dosis (= Chelator dosis bezogen auf das Gesamtkörper-Speichereisen) hatte keinen signifikanten Einfluss auf das NTBI.
- Es war keine Abhängigkeit vom Ferritin festzustellen.
- Der Leberfunktionsparameter ALT hatte keinen signifikanten Einfluss auf das NTBI.
- Es gab keine NTBI-Unterschiede in Bezug auf splenektomierte Patienten.
- Das NTBI zeigte eine Abhängigkeit von der Erythropoese.

3.3.6 Chelatorwirksamkeit

Die Abb. 26 zeigt die Gesamtkörper-Speichereisen-Eliminationsrate (TBIE) bei Patienten mit β -Thalassämie major unter konventioneller DFO-Monotherapie und alternierender DFO / DFP-Chelatorbehandlung. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten der TBIE von $21,7 \pm 4,8$ mg Fe/d bei einer DFO-Dosis von $2,35 \pm 0,83$ mmol/d und der TBIE von $22,5 \pm 5,3$ mg Fe/d bei einer DFO / DFP-Dosis von $7,82 \pm 1,47$ mmol/d (s. Kap. 3.3.1, Tab. 5). Aus dem Verhältnis von molarer TBIE und molarer Chelator dosis ergab sich die molare Chelatoreffektivität im Mittel mit $18,2 \pm 5,6$ % bzw. $5,2 \pm 0,8$ % für die konventionelle DFO-Monotherapie bzw. für das alternierende DFO / DFP-Therapieregime.

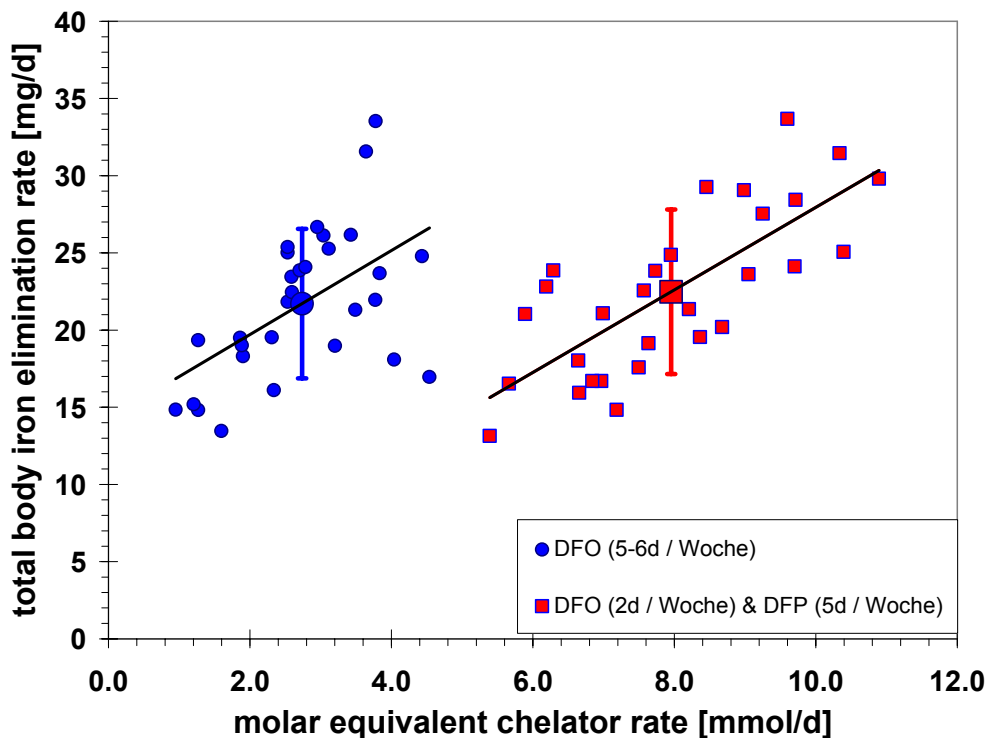


Abb. 26: Gesamtkörper-Speichereisen-Eliminationsrate (TBIE) unter DFO-Monotherapie und DFO / DFP-Chelatortherapie: $TBIE(DFO) = 21,7 \pm 4,8$ mg Fe/d, $TBIE(DFO / DFP) = 22,5 \pm 5,3$ mg Fe/d.

Total Body iron elimination rate under DFO monotherapy and combined DFO/DFP therapy: $TBIE(DFO) = 21,7 \pm 4,8$ mg Fe/d, $TBIE(DFO / DFP) = 22,5 \pm 5,3$ mg Fe/d.

4 Diskussion

Erstmalig wurde NTBI als Funktion der Erythropoese innerhalb eines Transfusionsintervalls beurteilt. Darüber hinaus wurden mögliche Unterschiede und die Effektivität in der Langzeittherapie mit Desferrioxamine als Monotherapie im Vergleich zu einer alternierenden Chelatortherapie mit Deferiprone und Desferrioxamine untersucht.

4.1 Diskussion der angewandten Methoden

In dieser Arbeit wurde die Methode der NTBI-Bestimmung mittels der Atomabsorptionsspektroskopie untersucht und ihre Anwendung auf Patienten mit β -Thalassämie major, insbesondere über einen längeren Zeitraum hinweg überprüft.

4.1.1 NTBI-Bestimmung

Im Serum gesunder Normalpersonen findet man kein freies Eisen, weil das Serumeisen unter physiologischen Bedingungen an Transportproteine, vor allem an das Transferrin, gebunden ist. Freie Bindungskapazität liegt bei einer Transferrinsättigung um 30 % vor. Negative NTBI-Werte werden bei Normalpersonen und bei Thalassämiepatienten mit guter Compliance der Chelatortherapie gemessen. Dies kann durch eine Übersensitivität einiger Bestimmungsmethoden sowie durch Bindung des Eisen-NTAs durch das ungesättigte Transferrin erklärt werden (Al-Refaie et al., 1992 a; Bates et al., 1967).

In dieser Arbeit wurde bestätigt, dass die NTBI-Bestimmung nach der Methode von Singh et al. (1990), die an die AAS adaptiert wurde (Dresow, 1998), sensitiv und gut reproduzierbar ist. Die Variationskoeffizienten lagen bei den Kontrollseren mit niedrigen und mäßig erhöhten NTBI-Werten in Serie zwischen 4,5 % und 5,7 % und bei der Mitführung über einen Zeitraum von zwei Jahren zwischen 9,8 % und 14,5 % (s. Kap. 3.1.1 und 3.1.2). Das Bestimmtheitsmaß r^2 bei den NTBI-Doppelbestimmungen am gleichen Tag und nach einem Jahr betrug 0,99 bzw. 0,97 (s. Kap. 3.1.3 und 3.1.4). Diese Ergebnisse sind mit anderen Methoden und Arbeitsgruppen vergleichbar. Bei der kolorimetrischen und bei der HPLC-Methode lagen die Variationskoeffizienten bei Dreifachbestimmung in Serie bei 2,1 % bis 6,7 % und von Tag zu Tag bei 1,4 % bis 9,3 % (Gosriwatana et al., 1999). Im Vergleich von verschiedenen NTBI-Analyse-Methoden waren mit der **I**nductively **C**oupled **P**lasma **A**tomic

Emission Spectroscopy (ICP-AES) NTBI-Konzentrationen ab 0,1 µmol/l und mit der HPLC sowie der kolorimetrischen Methode ab 0,5 µmol/l detektierbar (Gosriwatana et al., 1999). Die Korrelation zwischen den NTBI-Bestimmungsmethoden basierend auf der DEAE-CDS Gelfiltration und der Ultrafiltration sind hoch signifikant ($r = 0,8$ $p < 0,001$; Hershko et al. 1978 b). Die Reproduzierbarkeit von niedrigen NTBI-Konzentrationen (unter 0,7 µmol/l) war wegen des inkomplett gesättigten Transferrins schwierig. In diesem Konzentrationsbereich können die freien Eisenbindungsstellen des Transferrins mit Kobalt III nach der Methode von Gosriwatana et al. (1999) geblockt werden, um das NTBI durch Bindung an Transferrin in vitro nicht zu unterschätzen. In der vorliegenden Arbeit konnte die Effektivität der Kobalt-Sättigungsmethode nicht bestätigt werden. Eine weitere Methode zur Bestimmung von geringen NTBI-Konzentrationen im Transferrinsättigungsbereich zwischen 30 und 60 % mit dem Ansatz der Absättigung der freien Transferrinbindungsstellen stellt die Methode von Breuer et al. (2000) mittels ELISA unter Verwendung des Metalls Mangan dar.

Des Weiteren liegt beim NTA eine geringgradige Eisenkontamination vor, dieses Eisen wird von dem ungesättigten Transferrin gebunden. Die Probenleerwerte aus Millipore-Wasser und NTA-Zusatz waren mit einem Variationskoeffizienten von 19,2 % mäßig reproduzierbar und teilweise wurden höhere Konzentrationen von freiem Eisen als bei Seren von Normalpersonen nachgewiesen. Aufgrund dieses Ergebnisses sollte die Einführung eines Normalserums als stabiler Probenleerwert vor allem bei niedrigen NTBI-Konzentrationen erwogen werden. Darüber hinaus ist auf potenziell eisenkontaminierte Mikrofiltersysteme zu achten, deshalb sollten Doppelbestimmungen der zu analysierenden Proben durchgeführt sowie Kontrollseren mitgeführt werden.

4.1.2 Lebereisenkonzentration

Die Bestimmung der Lebereisenkonzentration steht vor allem bei Erkrankungen mit primärer (z. B. hereditärer Hämochromatose) und sekundärer Eisenüberladung (z. B. Thalassämie) im Vordergrund.

Neben der invasiven Lebereisenbestimmung mittels Biopsie setzen sich seit ca. 25 Jahren zunehmend nicht-invasive Methoden für Patienten mit Eisenüberladung durch. Klinisch relevant sind die quantitative Magnetresonanztomografie und die Biomagnetometrie mittels dem SQUID-Biosuszeptometer (Brittenham et al., 1981 und 1982). Der Vorteil gegenüber der invasiven Leberbiopsie liegt in dem geringen Risiko und der beliebigen Wiederholungsmöglichkeit der Messungen. Das Ergebnis der Leberbiopsie wird durch fibrotische und zirrhotische Lebergewebeveränderungen beeinflusst und ist bei schwerer Eisenüberladung mit einer Lebereisenkonzentration über 4000 µg/g_{Leber} ungenau (Villeneuve et al., 1996). Besonders profitieren Kinder und Patienten mit notwendigen jährlichen

Lebereisenkontrollen von der nicht-invasiven Methode. Der Fehler bei der Lebereisenbestimmung mittels SQUID liegt bei 50 bis 300 $\mu\text{g/g}_{\text{Leber}}$ sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen. Er ist abhängig vom Leber-Haut-Abstand und der Fettverteilung im Thoraxbereich (Fischer et al., 1999).

Eine hoch signifikante Korrelation wurde zwischen dem Serumferritin und Lebereisenkonzentration nachgewiesen (Brittenham et al., 1993: $r = 0,76$ $p < 0,0001$; Fischer et al., 1999: $r = 0,64$ $p < 0,001$). Andere Arbeitsgruppen wiesen größere Schwankungen des Ferritins nach, sodass die korrekte Einschätzung der individuellen Eisenüberladung bei β -Thalassämiepatienten anhand des Ferritins nur begrenzt möglich ist (Gabutti et al., 1980; Nielsen et al., 1995). Es finden sich ebenfalls erhöhte Ferritinwerte bei Entzündungen und Tumorerkrankungen. Bei einem Vitamin C Defizit sind hingegen erniedrigte Ferritinkonzentrationen nachweisbar (Roeser et al., 1980; Chapman et al., 1982). Trotzdem ist das Ferritin der am häufigsten genutzte Parameter zur Beurteilung der Eisenüberladung (Wang et al., 1986; Brittenham et al., 1981 und 1993).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 NTBI

Unter physiologischen Bedingungen ist das Eisen an Transport- und Speicherproteine gebunden. Eine zentrale Rolle spielt das Transferrin als Transportprotein. Wenn die Proteine mit Eisen gesättigt sind, kommt es zum Auftreten von freiem Eisen (Non-Transferrin Bound Iron = NTBI). NTBI im Serum ist toxisch und beim Gesunden nicht nachweisbar. Es erzeugt freie Radikale und führt auf diesem Weg zur Lipidperoxidation mit Schädigung von Biomembranen und Biomolekülen (Gutteridge et al., 1985). Daher ist es wichtig, die Bedeutung vom NTBI sowie dessen Einflussgrößen bzw. Abhängigkeiten in der Transfusions- und Chelatortherapie bei Thalassämien zu untersuchen.

Hershko et al. (1978 b) wiesen bei β -Thalassämiepatienten mit gesättigtem Transferrin NTBI-Konzentrationen zwischen 2,7 und 7,1 $\mu\text{mol/l}$ nach. Im Rahmen der Chemotherapie und der Knochenmarktransplantation wurde ebenfalls das Auftreten von freiem Eisen infolge eines massiven Zellumsatzes und Zellunterganges nachgewiesen (Bradley et al., 1997; Dürken et al., 1997). Bei der primären Hämochromatose beobachteten Batey et al. (1981) eine pathologisch abnorme NTBI-Fraktion, die schneller als unter normalen Umständen in die Leber aufgenommen wurde. Er stellte die These auf, dass es zu einer Eisenüberladung der Lysosomen kommt. Damit verbunden ist eine erhöhte Fragilität der Lysosomen, infolge dessen es zu Zellschäden kommt.

In dieser Arbeit wurde bei allen eisenüberladenen Patienten mit einer pathologisch erhöhten Transferrinsättigung über 60 % freies Eisen nachgewiesen. Jedoch auch bei normaler Transferrinsättigung (s. Anhang Tab. A3, Patient Nr. 510, 708 und 714) wurde freies Eisen gemessen. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen den NTBI-Konzentrationen und dem Ferritin konnte nicht erhoben werden. Diese Beobachtungen wurden auch in Studien mit chemotherapierten Patienten gemacht (Bradley et al., 1997). Der Patient Nr. 510 wies bei normaler Transferrinsättigung einen mäßig erhöhten Eisenstatus (NTBI 3,1 $\mu\text{mol/l}$, Tfs 48 %, Serumeisen 236 $\mu\text{g/dl}$, Ferritin 1571 $\mu\text{g/l}$, LIC 927 $\mu\text{g Fe/g}_{\text{Leber}}$) auf. Bei dem Patienten Nr. 714 wurde eine sehr hohe NTBI-Konzentration von 17,78 $\mu\text{mol/l}$ bei einer Transferrinsättigung von 41 % und einer Serumeisenkonzentration von 127 $\mu\text{g/dl}$ (Ferritin 1475 $\mu\text{g/l}$, LIC 1119 $\mu\text{g Fe/g}_{\text{Leber}}$, SIC 1018 $\mu\text{g Fe/g}_{\text{Milz}}$) gemessen. Das Transferrin besitzt eine sehr hohe Affinität zum freien Eisen, sodass es bei freier Bindungskapazität normalerweise nicht zum Auftreten von NTBI kommt. Dieses Ergebnis könnte durch eine gesteigerte, ineffektive Erythropoese kurz vor der Transfusion oder durch eine verminderte NTBI-Aufnahme in den intrazellulären Eisenpool begründet sein (Barisani et al., 1999). Der hohe NTBI-Wert von 17,78 $\mu\text{mol/l}$ von Patient Nr. 714 wäre mit einer Leberparenchymveränderung im Rahmen einer chronischen HCV-Infektion vereinbar, bei normalen Transaminasen erscheint dies jedoch eher unwahrscheinlich.

Bei einigen Patienten (s. Anhang Tab. AIII und A3) wurde eine Transferrinsättigung über 100 % errechnet. Dies ist in der Bestimmungsmethode begründet, in der die Transferrinsättigung aus dem Verhältnis des Serumeisens zur totalen Eisenbindungskapazität berechnet wird.

4.2.2 NTBI und die Beziehung zu anderen Eisenparametern

In dieser Arbeit wurde eine signifikante Korrelation ($n = 113$, $r = 0,52$, $p < 0,001$) zwischen NTBI und dem Serumeisen bei Patienten mit β -Thalassämie major unabhängig vom Therapieregime nachgewiesen. Dieser Zusammenhang wurde bereits von Anuwatanakulchai et al. (1984) und Al-Refaie et al. (1992 a/b) beschrieben. Die Arbeitsgruppe von Wang et al. (1986) fand allerdings keine signifikante Korrelation zwischen NTBI und dem Serumeisen.

Im Gegensatz zu anderen Arbeiten zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen NTBI und der Transferrinsättigung, der Lebereisenkonzentration und / oder dem Serumferritin (Reller, 2000; Al-Refaie et al., 1992 a/b). Die geringe Korrelation zwischen dem NTBI und der Transferrinsättigung in dieser Arbeit ist in der Verteilung der Transferrinsättigungswerte mit einem Mittelwert (\pm Standardabweichung) von 71 (± 18) % ($n = 94$) begründet. In der vorliegenden Arbeit trat NTBI auf, wenn das Transferrin gesättigt war, wobei keine Aussage über die Höhe der NTBI-Konzentration gemacht werden konnte. In anderen Arbeiten konnte

eine signifikante Korrelation des NTBIs mit den Lebereisenkonzentrationen und / oder dem Ferritin nachwiesen werden (Reller et al., 2000). Auch Al-Refaie et al. (1992 a/b) fanden eine signifikante Korrelation mit dem Ferritin, der Transferrinsättigung und dem Serumeisen. Hershko et al. (1975) wies eine signifikante Korrelation zwischen dem freien Eisen und der Transfusionsanzahl ($r = 0,7$) nach, was auf eine Abhängigkeit des freien Eisens vom Grad der Eisenüberladung hindeutet.

4.2.3 NTBI und die Abhängigkeit von der Erythropoese

Bradley et al. (1997) konnten bei Patienten eine Kinetik des Auftretens und Verschwindens von freiem Eisen unter Chemotherapie nachweisen. Es gab keine Korrelation zwischen NTBI und dem Serumeisen sowie dem Ferritin. Darüber hinaus fand sich ein inverses Verhalten von NTBI zum Serumtransferrinrezeptor und der Retikulozytenzahl. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass das Erscheinen von NTBI im Zusammenhang mit der erythropoetischen Aktivität steht (Bradley et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Zusammenhang bei β -Thalassämiepatienten in einem oder zwei Transfusionsintervallen näher untersucht. Weiterhin wurden die quantitative Beziehung zwischen NTBI und dem Eisenhaushalt während eines Transfusionsintervalls sowie weitere Einflussparameter dargestellt. Die Ergebnisse belegen die Abhängigkeit des NTBIs von der Erythropoese. Die Gruppe 2 (Hamburg) zeigte einen signifikanten NTBI-Abfall 7 bis 14 Tage nach der Transfusion. Insbesondere bei einem Patienten fanden sich zwischen den Transfusionen zwei NTBI-Werte unter $1 \mu\text{mol/l}$. Bei den über zwei Transfusionsintervallen beobachteten Patienten (Hamburg) fanden sich reproduzierbar niedrigere NTBI-Konzentrationen zwischen den Transfusionen als Zeichen einer gehemmten ineffektiven Erythropoese.

In der Gruppe 1 (Catania, Italien) waren die NTBI-Werte nicht auswertbar, da der Prä-Transfusions-NTBI-Median mit $4,4$ bzw. $5,6 \mu\text{mol/l}$ deutlichen Schwankungen unterlag und somit der zu erwartende Effekt eines NTBI-Abfalls zwischen den Transfusionen nicht messbar war. Die NTBI-Kinetiken der einzelnen Patienten variierten individuell sehr stark.

In der weiterhin durchgeführten Chelatorvergleichsstudie bei 42 italienischen β -Thalassämiepatienten unterstützt das Ergebnis mit einem signifikanten NTBI-Anstieg von basal $5,7 \mu\text{mol/l}$ auf $6,7 \mu\text{mol/l}$ nach einem Jahr die Annahme der Abhängigkeit des NTBIs von der Erythropoese. Dies war im Blutabnahmezeitpunkt innerhalb des Transfusionsintervalls begründet. Bei der NTBI-Bestimmung nach einem Jahr wurden die Blutentnahmen weitestgehend am Transfusionsintervallende vorgenommen, was mit einer gesteigerten ineffektiven Erythropoese mit signifikant höheren NTBI-Werte vereinbar ist. Im Gegensatz dazu wurden niedrigere NTBI-Werte bei Blutentnahmen zu verschiedenen Zeiten eines Transfusionsintervalls bei Studienbeginn gemessen (s. Abb. 2a und 2b sowie 19a-d).

Bei Ladis et al. (2001) fand sich bei 4 Thalassämiepatienten 4 Stunden nach der Transfusion ein signifikanter Abfall vom NTBI, dies unterstützt die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. In der Arbeit von Reller (2000) wurde eine hoch signifikante inverse Korrelation zwischen dem Hämoglobinwert und dem freien Eisen bei β -Thalassämiepatienten belegt. Dies war in dieser Arbeit nicht nachweisbar (s. Kap. 3.2, Abb. 13). Die Erklärung liegt in der geringen Patientenanzahl und dem Transfusionsregime mit Hämoglobinwerten im Bereich der optimalen Hemmung der ineffektiven Erythropoese ($n = 51$, $r = 0,079$).

Aus dem Ergebnis von Pippard et al. (1982), die eine direkte Beziehung zwischen der Urineisenausscheidung unter der DFO-Therapie und der Erythropoese (Hämoglobin, Transfusion) fanden, lässt sich die Hypothese aufstellen, dass der chelierbare Eisenpool nach der Transfusion kleiner ist. Diesem Modell folgte die NTBI-Kinetik der Gruppe 2 (Hamburg). Des Weiteren wird dieses Modell durch das Ergebnis der Chelatorvergleichsstudie mit höheren NTBI-Werten am Transfusionsende, im Gegensatz zu den niedrigeren Basalwerten zu Beginn des Transfusionsintervalls, unterstützt (s. Kap. 3.3.1, Tab. 5).

Demgegenüber fanden sich bei der Gruppe 1 (Catania, Italien) teilweise extrem hohe NTBI-Werte zum Zeitpunkt der angenommenen gehemmten ineffektiven Erythropoese direkt nach der Transfusion als auch zum Zeitpunkt der angenommenen gesteigerten Erythropoese am Ende des Transfusionsintervalls. Hohe NTBI-Werte kurz nach der Transfusion wären vereinbar mit einem möglichen Zellzerfall von geschädigten transfundierten Erythrozyten. Des Weiteren wurde im Gegensatz zur Hamburger Patientengruppe nur ein Messpunkt und dieser ca. 12 bis 14 Tage nach der letzten Transfusion (mit Ausnahme eines Patienten) zwischen den Transfusionen erhoben. Der NTBI-Abfall in der Hamburger Patientengruppe im Transfusionsintervall war besonders deutlich nach 7 Tagen nach der letzten Transfusion.

Der Serumtransferrinrezeptor als erythropoetischer Parameter war bei allen Patienten bis auf das Vierfache pathologisch erhöht. Nach den Untersuchungen von Cazzola et al. (1999) ist eine fünf- bis sechsfache Serumtransferrinrezeptorerhöhung mit einem deutlichen Risiko für eine Eisenüberladung assoziiert.

Übereinstimmend mit Tancabelic et al. (1999) fand sich keine signifikante Korrelation zwischen Serumtransferrinrezeptor und dem Hämoglobin bei β -Thalassämiepatienten. Die Arbeitsgruppe von Cazzola et al. (1995) hingegen beobachtete eine Korrelation zwischen dem Serumtransferrinrezeptor und dem Prätransfusionshämoglobin. Dieser Zusammenhang wurde in dieser Arbeit nicht bestätigt, was möglicherweise in der kleinen Spanne der Hämoglobinwerte bei einem moderatem Transfusionsregime begründet ist.

Cappellini et al. (1998) fanden keine Korrelation zwischen NTBI, Parametern der Eisenüberladung und Parametern der erythropoetischen Aktivität. Darüber hinaus spielt die

ineffektive Erythropoese nicht die einzig bedeutende Rolle bei der NTBI-Entstehung bei β -Thalassämien. Das NTBI scheint u. a. unabhängig von den geschädigten Erythrozyten zu sein (Cappellini et al., 2001 b).

Im Gegensatz hierzu stellte Porter fest, dass die NTBI-Entstehung durch den Erythrozytenverbrauch für den Beitrag des NTBI-Umsatzes deutlich wichtiger als die absolute Eisenüberladung ist (Porter et al., 1996). Darüber hinaus zeigte er, dass das NTBI während der intravenösen Chelatortherapie rasch fällt und nach 5 Stunden nicht mehr nachweisbar ist. Die Ausgangs-NTBI-Werte werden etwa 6 Stunden nach DFO-Infusionsende wieder erreicht.

Livrea et al. (1996) beobachteten, dass zwischen NTBI und Ferritin eine wenn auch nicht signifikante Korrelation bestand. Bei der Untersuchung der Parameter des peroxidativen Stresses (Malondialdehyd, konjugierte Diene) und des Vitamin E in Bezug zum NTBI konnte keine Korrelation hergestellt werden.

4.3 Effektivität der Chelatortherapie mit Desferrioxamine und Deferiprone

Mit der Einführung der Chelatortherapie bei der Thalassämie wurden die Komplikationen aufgrund der transfusionsbedingten Eisenüberladung reduziert und die Lebenserwartung verbessert.

In dieser Arbeit wurde die Anwendung von Deferiprone (DFP) und Desferrioxamine (DFO) im Vergleich über ein Jahr untersucht. Das DFP wurde in einer Dosis von maximal 75 mg/kg/d oral und das DFO mit 20 bis 60 mg/kg/d als nächtliche 10- bis 12-stündige subkutane Infusion angewendet.

Die Ergebnisse zeigten, dass das DFP ein ebenso wirksamer Eisenchelator wie das DFO ist. Die Gesamtkörper-Speichereisen-Eliminationsrate (TBIE) liegt unter der DFO-Monotherapie bei 21,9 mg Fe/d und unter der Kombinationstherapie von DFO und DFP bei 22,6 mg Fe/d. Somit ist die TBIE nicht signifikant verschieden. Aus dem Verhältnis von molarer TBIE und molarer Chelator dosis ergibt sich die molare Chelatoreffektivität im Mittel von $18,2 \pm 5,6$ % für das konventionelle DFO-Therapieregime und $5,2 \pm 0,8$ % für das alternierende DFO/DFP-Therapieregime. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Eisenausscheidung durch Chelator kombinationen von DFO und DFP effektiv ist und die zusätzliche orale DFP-Gabe eine Alternative zur alleinigen subkutanen DFO-Applikation darstellt.

Die Effektivität der DFO-Therapie wurde in vielen Studien nachgewiesen. Porter et al. (1996) fanden 2 bis 4 Stunden nach Chelatortherapieende erneut NTBI im Serum. Araujo et al. (1986) zeigten bei intensiver Chelatortherapie mit DFO subkutan oder intravenös einen

signifikanten Abfall des Serumferritins. Das NTBI fiel signifikant während einer 12-stündigen DFO-Infusion, wobei es bei intravenöser Applikation nicht mehr detektierbar und bei subkutaner Gabe mit einem Mittelwert von 2 µmol/l nachweisbar war.

Die Wirksamkeit von DFP wurde bereits von Al-Refaie et al. (1992 b) bei β-Thalassämiepatienten mit Serumferritinwerten über 5000 µg/l und NTBI-Werten über 6 µmol/l nachgewiesen. Es wurde ein signifikanter Ferritin- und NTBI-Abfall nach einer sechsmonatigen DFP-Monotherapie verzeichnet. Fischer et al. (2003) zeigten die Wirksamkeit von DFP und DFO als Monotherapie in einem Beobachtungszeitraum von 4 Jahren.

In dieser Arbeit wurde die Effektivität von DFP in Kombination mit DFO bei einer Patientengruppe mit Ferritinkonzentrationen unter 2500 µg/l und NTBI-Werten um 7 µmol/l gezeigt.

Im Gegensatz dazu kam die Arbeitsgruppe von Olivieri et al. (1995, 1998) trotz eines signifikanten Abfalls des Serumferritins zu dem Ergebnis, dass DFP die Eisenüberladung nicht adäquat reduziert und zu Leberfibrose führt. Da die Leberhistologien bereits vor Beginn der DFP-Therapie pathologisch verändert waren, konnte keine sichere Aussage darüber werden, ob DFP zu Leberfibrose führt (Tricta et al., 1998). Cohen et al. (1998) konnten bei β-Thalassämiepatienten nach einem Jahr DFP-Monotherapie in der üblichen Dosis von 75 mg/ kg/ d keine signifikante Änderung der Ferritinwerte bei Basalwerten über 2000 µg/l nachweisen.

In der vorliegenden Arbeit stieg das NTBI unter der DFO-Chelatormonotherapie im italienischen Patientenkollektiv signifikant ($p < 0,01$) nach einem Jahr an. Dies ist in dem Blutentnahmezeitpunkt nach einem Jahr zum Ende des Transfusionsintervalls im Gegensatz zum Blutentnahmezeitpunkt basal eher zum Beginn des Transfusionsintervalls begründet. Dies spiegelt die Abhängigkeit des NTBIs von der Erythropoese wider.

In dieser Arbeit sank die Lebereisenkonzentration (LIC) in der DFO-Gruppe signifikant nach einem Jahr (s. Kap. 3.3.1, Tab. 5). Im Gegensatz dazu fand sich in der DFO/DFP-Gruppe keine signifikante Änderung. Dieses Ergebnis dokumentiert sich auch in den Ferritinwerten und im Gesamtkörper-Speichereisen. Die Arbeitsgruppe von Cohen et al. (1998) konnte bei alleiniger Chelatortherapie mit DFP keinen signifikanten Abfall der Ferritinkonzentrationen aufzeigen. In dieser Arbeit konnte keine Korrelation zwischen NTBI und dem Grad der Eisenüberladung (Gesamtkörperereisen), dem Ferritin und der Lebereisenkonzentration belegt werden. Diese Resultate unterstützen die Annahme, dass es keinen direkten Zusammenhang zwischen dem Grad der Eisenüberladung und NTBI gibt. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Cappellini et al. (1998) überein und widerspricht denen von Anuwatanakulchai et al. (1984) und Al-Refaie et al. (1992 a), die eine hoch signifikante Korrelation zwischen NTBI und dem Serumferritin ermittelt haben.

Pippard et al. (1978) untersuchten die Urineisenexkretion nach DFO-Gabe und stellten eine individuelle Variation und eine Kinetik der Eisenentfernung in Abhängigkeit von der DFO-Administration fest. Kontoghiorghes et al. (1987) wiesen die gleiche Effektivität von DFO und DFP in der Urineisenausscheidung nach.

Anderson et al. (2002) untersuchten den Einfluss und die Effektivität von DFO und DFP auf den myokardialen Eisengehalt, gemessen mittels Magnetresonanztomografie T2*, und auf die kardiale Funktion. Die Patienten mit der DFP-Therapie hatten eine signifikant niedrigere myokardiale Eisenkonzentration und eine höhere Ejektionsfraktion als die Patienten mit der subkutanen DFO-Therapie. Bezüglich der Lebereisenkonzentration zeigten die Patienten unter DFO-Therapie jedoch niedrigere Konzentrationen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde Nicht-Transferrin gebundenes Eisen (NTBI) und dessen Abhängigkeit von der Erythropoese bei insgesamt 15 β -Thalassämiepatienten in zwei Patientengruppen (Hamburg, Catania/Italien) unter regelmäßiger Eisenchelatortherapie mit Desferrioxamine (DFO) (n=14) oder Deferiprone (DFP) (n=1) entweder in einem oder in zwei Transfusionsintervallen untersucht. Zwischen den Transfusionen lagen ca. 21 bis 27 Tage. NTBI im Serum wurde mittels Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt. Hohe NTBI-Konzentrationen sind assoziiert mit Eisenüberladung und Zelltoxizität infolge freier Radikalerzeugung durch NTBI und anschließender Lipidperoxidation. Deshalb stellt die NTBI-Reduktion einen bedeutenden Therapieansatz in der Behandlung der Thalassämien dar.

Darüber hinaus wurde die Eignung von NTBI als Verlaufsparemeter untersucht. In der Hamburger Patientengruppe (n=5) lagen die NTBI-Mittelwerte mit 3,3 bzw. 3,8 $\mu\text{mol/l}$ 7 bis 14 Tage nach der Transfusion signifikant niedriger ($p < 0,05$) als direkt vor der Transfusion mit 4,4 bzw. 4,7 $\mu\text{mol/l}$. Bei den über zwei Transfusionsintervallen beobachteten Patienten fanden sich reproduzierbar niedrigere NTBI-Konzentrationen zwischen den Transfusionen als Zeichen einer gehemmten ineffektiven Erythropoese, was NTBI als therapeutischen Verlaufsparemeter in der Chelatortherapie bestätigt. Durch die Catania-Patientengruppe (n=10) kann dieses Ergebnis weder bestätigt noch widerlegt werden. Deren NTBI-Werte waren nicht auswertbar, da der Prä-Transfusions-NTBI-Median vor zwei aufeinander folgenden Transfusionsintervallen mit 4,4 und 5,6 $\mu\text{mol/l}$ deutlichen Schwankungen unterlag und somit der zu erwartende Effekt eines NTBI-Abfalls zwischen diesen Transfusionen nicht messbar war.

Ergänzend wurden weitere Parameter wie Serumeisen, Transferrinsättigung, Serumferritin, Leber-/Milzeisenkonzentration, Hämoglobin, Retikulozyten, Serumtransferrinrezeptor, Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit und Alanin-Aminotransferase bestimmt. Der Serumtransferrinrezeptor zeigte in Bezug zum Prätransfusionshämoglobin eine bis zu vierfach gesteigerte erythropoetische Aktivität und korrelierte signifikant mit der Retikulozytenzahl ($p < 0,01$).

In einer weiteren Studie wurde NTBI bei 59 β -Thalassämiepatienten über ein Jahr erhoben. Die eine Patientengruppe erhielt die konventionelle DFO-Monotherapie mit 20 bis 60 mg DFO/kg/d als nächtliche 10- bis 12-stündige subkutane Infusion für 5 bis 6 Tage pro Woche und die andere die kombinierte Chelatortherapie mit DFO für 2 Tage in der üblichen Dosierung sowie DFP für 5 Tage mit 75 mg DFP/kg/d per os. Die

Gesamtkörper-eisen-Eliminationsrate war unter der konventionellen DFO-Monotherapie mit $21,7 \pm 4,8$ mg/d nicht signifikant verschieden zu der unter der kombinierten DFO/DFP-Therapie mit $22,5 \pm 5,3$ mg/d ($p(t\text{-Test}) < 0,6$). Dieses Ergebnis belegt, dass der kombinierte Einsatz von DFO und DFP genauso effektiv wie die Standardtherapie mit der ausschließlichen Applikation von DFO ist. Innerhalb dieser Untersuchung zeigte sich jedoch ein signifikanter NTBI-Anstieg unter DFO-Monotherapie von basal 5,7 auf 6,7 $\mu\text{mol/l}$ nach einem Jahr. Dies ist höchstwahrscheinlich im Blutentnahmezeitpunkt innerhalb des Transfusionsintervalls begründet, da nach einem Jahr die Blutentnahmen weitestgehend am Transfusionsintervallende vorgenommen wurden. Eine folglich gesteigerte ineffektive Erythropoese aufgrund des Blutentnahmezeitpunktes am Transfusionsintervallende und somit signifikant höhere NTBI-Werte relativieren daher den nachgewiesenen NTBI-Anstieg über ein Jahr. Im Gegensatz dazu erfolgten bei Studienbeginn (basal) die Blutentnahmen der einzelnen Patienten normalverteilt über das Transfusionsintervall.

Das Verhalten von NTBI gestaltete sich insgesamt sehr heterogen. Bei den über zwei Transfusionsintervallen beobachteten Patienten fanden sich reproduzierbar niedrigere NTBI-Konzentrationen zwischen den Transfusionen als Zeichen einer gehemmten ineffektiven Erythropoese. Ein dynamischeres Konzept bezüglich der Eisenchelator-dosis ist im Einzelfall erforderlich. Daher eignet sich NTBI als individueller Verlaufsparemeter in der Beurteilung der Effektivität der Chelatortherapie in Bezug auf die Erythropoeseaktivität innerhalb des Transfusionsintervalls.

Ausblick:

In Untersuchungen werden als NTBI-Komponenten das direkt durch DFO chelierbare Eisen, das sog. DCI (**d**irectly **c**helatable **i**ron) und das labile Plasmaeisen, das sog. LPI (**l**abile **p**lasma **i**ron) bestimmt. Das LPI wird durch DFP und / oder DFO cheliert und stellt redoxaktive Formen, sog. ROS (**r**eactive **o**xidant **s**pecies), dar.

Die Bestimmung dieser NTBI-Komponenten besitzen ein großes Potenzial, da LPI und DCI als frühe Indikatoren für die Eisenüberladung und die effektive Chelatortherapie gelten (Esposito et al., 2003; Pootrakul et al., 2004).

Zur Beurteilung der Chelatortherapie untersuchten Breuer et al. (2001) das DCI als eine Komponente vom NTBI. Bei zusätzlicher DFP-Gabe fand sich ein intrazellulärer Eisentransfer zu höher affinen Liganden wie dem Apotransferrin und dem DFO, was somit den Einsatz von Chelator-kombinationen sinnvoll macht.

Summary

In this work, Non-Transferrin Bound Iron (NTBI) in the serum of 15 patients with β -thalassaemia in two patient groups (Hamburg, Catania/Italy) and this dependence of erythropoiesis has been measured under regular iron chelation therapy with desferrioxamine (DFO) (n=14) or deferiprone (DFP) (n=1) within one or two transfusion intervals. The period between transfusions was around 21 to 27 days. NTBI was measured by atom absorption spectroscopy. High NTBI concentrations are associated with iron overload and cell toxicity due to the formation of free radicals resulting in lipid peroxidation processes. Therefore, reduction of NTBI appears as an important therapy approach in treatment of thalassaemias. Furthermore the applicability of NTBI has been examined as a monitoring parameter. In patients group of Hamburg (n=5) the average NTBI concentrations were significantly lower ($p < 0,05$) than directly before next transfusion. NTBI values were 3,3 and 3,8 $\mu\text{mol/l}$ 7 – 14 days after the last transfusion and 4,4 and 4,7 $\mu\text{mol/l}$ directly before next transfusion. Two patients were observed within two transfusion intervals and reproducible lower NTBI concentrations were observed between the transfusions due to inhibited ineffective erythropoiesis. Thus might be NTBI suitable as a therapeutic monitoring parameter in chelation therapy. This result is neither confirmed nor refuted by investigation of the catanian patients group (n=10), the clear deviation in pre transfusion NTBI medians with values of 4,4 and 5,6 $\mu\text{mol/l}$. Therefore, the expected effect of NTBI decrease between this transfusions was not detectable.

In addition serum iron, transferrin saturation, serum ferritin, liver iron concentration, spleen iron concentration, hemoglobin, reticulocytes, serum transferrin receptor, ESR and ALT were measured.

The serum TfR showed - compared to pre transfusion hemoglobin - an erythroid activity 1 to 4 times higher than normality. These results correlate significantly with the number of reticulocytes ($p < 0,01$).

In an other study, NTBI has been measured in the serum of 59 β -thalassaemia patients over one year. One patient group was treated with the conventional DFO monotherapy with 20 – 60 mg DFO/kg/d as a nightly 10 to 12 hour subcutan infusion for 5 to 6 days a week. The other group had an alternate chelator therapy with DFO for 2 days a week in the standard dose and DFP for 5 days week with 75 mg DFP/kg/d per os. The total body iron elimination rate of $21,7 \pm 4,8$ mg iron /d under conventional DFO-monotherapy was not significantly different from $22,5 \pm 5,3$ mg iron /d under alternate DFO / DFP-treatment (p (t-Test) $< 0,6$).

This result demonstrates that the combined application of DFO and DFP has the same efficiency as the standard DFO-monotherapy. Within this study, NTBI values under DFO-monotherapy showed a significant increase from baseline 5,7 to 6,7 $\mu\text{mol/l}$ after one year. This was caused most probably due to the time of blood sampling in the transfusion interval. At baseline blood sampling was carried out at different times of the transfusion interval and after one year the blood sampling was done at the end of the transfusion interval. A consequently enhanced ineffective erythropoiesis caused by those differences in time of blood sampling results significant higher NTBI values which relativizes those NTBI increase after one year.

The NTBI values showed a large scatter during these investigations. NTBI concentrations of the two observed patients within two transfusion intervals were reproducible low between transfusions due to inhibited ineffective erythropoiesis. As a result, NTBI has a strong potential of being an individuell monitoring parameter for the observation of effective chelation therapy due to erythroid activity within the transfusion intervals.

Outlook/Prospects:

In further works NTBI compounds were measured as a **directly chelatable iron (DCI)** by DFO and as a **labile plasma iron (LPI)**. LPI, that is chelatable by DFP as well as DFO, is **reactive oxidant species (ROS)**. The determination of these NTBI compounds will gain in importance, because LPI and DCI are early indicators for iron overload and ineffective chelation therapy (Esposito et al., 2003; Pootrakul et al., 2004).

Breuer et al. (2001) investigated DCI as a compound of NTBI for assessment of chelation therapy. An additional DFP application generated a intracellular iron transfer to higher affine ligands like apotransferrin and DFO. This result indicates an application of combined chelator therapy with both DFO and DFP.

6 Literaturverzeichnis

Al-Refaie FN, Wickens DG, Wonke B, Kontoghiorghes GJ, Hoffbrand AV: Serum non-transferrin-bound iron in beta-thalassaemia major patients treated with desferrioxamine and L1. *Br J Haematol* 82: 431-436, 1992 a

Al-Refaie FN, Wickens DG, Wonke B, Hoffbrand AV, Nortey P, Kontoghiorghes GJ: Efficiency and possible adverse effects of the oral iron chelator 1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one (L1) in thalassaemia major. *Blood* 80: 593-599, 1992 b

Anderson LJ, Wonke B, Prescott E, Holden S, Walker JM, Pennell DJ: Comparison of effects of oral deferiprone and subcutaneous desferrioxamine on myocardial iron concentrations and ventricular function in beta-thalassaemia. *Lancet* 360: 516-520, 2002

Anuwatanakulchai M, Pootrakul P, Thuvasethakul P, Wasi P: Non-transferrin plasma iron in β -thalassaemia / Hb E and haemoglobin H diseases. *Scand J Haematol* 32: 153-158, 1984

Araujo A, Kosaryan M, Mac Dowell A, Wickens D, Puri S, Wonke B, Hoffbrand AV: A novel delivery system for continuous desferrioxamine infusion in transfusional iron overload. *Br J Haematol* 93: 835-837, 1996

Barisani D, Cairo G, Ginelli E, Marozzi A, Conte D: Nitric Oxide Reduces Nontransferrin-Bound Iron Transport in HepG2 Cells. *Hepatology* 29: 464-470, 1999

Bates GW, Billups C, Saltman P. The Kinetics and Mechanism of Iron (III) Exchange between Chelates and Transferrin. I. The complexes of citrate and nitrilotriacetic acid. *J Biol Chem* 242: 2810-2815, 1967

Batey RG, Shamir S, Wilms J: Properties and hepatic metabolism of non-transferrin-bound iron. *Dig Dis Sci* 26: 1084-1088, 1981

Bianchi DW: Fetal cells in maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *Br J Haematol* 105: 574-583, 1999

Bickel H, Hall GE, Keller-Schierlin W: Stoffwechselprodukte von Actinomyceten, 27. Mitteilung über die Konstitution von Ferrioxamin B. *Helv chim acta* 43: 2129, 1960

Bradley SC, Gosriwitana I, Srichairatanakool S, Hider RC, Porter JB: Non-transferrin-bound iron induced by myeloablative chemotherapy. *Br J Haematol* 99: 337-343, 1997

Breuer W, Ronson A, Slotki IN, Abramov A, Hershko C, Cabantchik ZI: The assessment of serum non-transferrin bound iron (NTBI) in chelation therapy and iron supplementation. *Blood* 95: 2975-82, 2000

Breuer W, Emers MJJ, Pootrakul P, Abramov A, Hershko C, Cabantchik ZI: Desferrioxamine-chelatable iron, a component of serum non-transferrin-bound iron, used for assessing chelation therapy. *Blood* 97: 792-8, 2001

Brissot P, Bolder U, Schteingart CD, Arnaud J, Hofmann AF: Intestinal absorption and enterohepatic cycling of biliary iron originating from plasma non-transferrin-bound iron in rats. *Hepatology* 25: 1457-1461, 1997

Brittenham GM, Danish EH, Harris JW: Assessment of bone marrow and body iron stores: old techniques and new technologies. *Semin Hematol* 18: 194-218, 1981

Brittenham GM, Farrell DE, Harris JW, Feldmann ES, Danish EH, Muir WA, Tripp JH, Bellon EM: Magnetic susceptibility measurement of human iron stores. *N Eng J Med* 307: 1671-1675, 1982

Brittenham GM, Cohen AR, McLaren CE, Martin MB, Griffith PM, Nienhuis AW, Young NS, Allen CJ, Farrell DE, Harris JW: Hepatic iron stores and Plasma Ferritin Concentration in Patients with sickle Cell Anemia and Thalassemia major. *Am J Hematol* 42: 81-85, 1993

Cappellini MD, Duca L, Tavazzi D, Marelli S, Fargion S, Zatelli S, Cerino M, Graziadei G, Fiorelli G: Non-Transferrin-Bound Plasma Iron, iron overload and ineffective erythropoiesis in thalassemia major and intermedia. *Blood* 92 suppl. 1, abstract #3138, 1998

Cappellini MD, Cighetti G, Duca L, Tavazzi D, Nava I, Sala S, Bortone L, Fiorelli G: Non-Transferrin-Bound Iron and antioxidant capacity in β -thalassemia major and β -thalassemia intermedia. *Proc 11th Int Conf Oral Chel, Catania* p 107, 2001

Cappellini MD, Duca L, Tavazzi D, Graziadei G, Marelli S, Nava I, Fiorelli G: Non-Transferrin-Bound Iron: role of ineffective erythropoiesis and iron overload in severe β -thalassemia. *Proc 11th Int Conf Oral Chel, Catania* p 109, 2001

Cazzola M, De Stefano P, Ponchio L, Locatelli F, Beguin Y, Dessi` C, Barella S, Cao A, Galanello R: Relationship between transfusion regimen and suppression of erythropoiesis in β -thalassaemia major. *Br J Haematol* 89: 473-478, 1995

Cazzola M, Borgna-Pignatti C, Locatelli F, Ponchio L, Beguin Y, De Stefano P: A moderate transfusion regimen may reduce iron loading in β -thalassemia major without producing excessive expansion of erythropoiesis. *Transfus* 37: 135-140, 1997

Cazzola M, Beguin Y, Bergamaschi G, Guarnone R, Cerani P, Barella S, Cao A, Galanello R: Soluble transferrin receptor as a potential determinant of iron loading in congenital anaemias due to ineffective erythropoiesis. *Br J Haematol* 106: 752-755, 1999

Chapman RWG, Hussain MAM, Gorman A: Effect of ascorbic acid deficiency on serum ferritin concentration in patients with β -Thalassemia major and iron overload. *J Clin Pathol* 307: 487-491, 1982

Cohen A, Galanello R, Piga A, Vullo C, Tricta F: A multi-center safety trial of the oral iron chelator deferiprone. *Ann NY Acad Sci* 850: 223-226, 1998

Dresow B: Non-Transferrin Bound Iron (NTBI) in Plasma or Serum. UKE-AMB-29, 1998

Dürken M, Nielsen P, Knobel S, Finckh B, Herrnring C, Dresow B, Kohlschütter B, Stockschröder M, Krüger WH, Kohlschütter A, Zander R: Non-transferrin-bound iron in serum of patients receiving bone marrow transplants. *Free Radical Biology & Medicine* 22: 1159-1163, 1997

Esposito BP, Breuer W, Sirankapracha P, Pootrakul P, Hershko C, Cabantchik ZI. Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation. *Blood* 102: 2670-2677, 2003

Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A: A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 13: 399-408, 1996

Fischer R: Liver iron susceptometry. In: Andrä W, Nowak H (eds) *Magnetism in Medicine - A Handbook*. WILEY-VCH, Berlin, pp 286-301, 1998 a

Fischer R, Engelhardt R: Liver (Spleen) Iron Susceptometry in Patients with the Hamburg SQUID Biomagnetometer Facility. UKE-AMB 25, 1998 b

Fischer R, Thiemann CD, Engelhardt R, Nielsen P, Dürken M, Gabbe EE, Janka GE: The assessment of iron stores in children with transfusion siderosis by biomagnetic liver susceptometry. *Am J Hematol* 60: 289-299, 1999

Fischer R, Longo F, Nielsen P, Engelhardt R, Hider RC, Piga A: Monitoring long-term efficacy of iron chelation therapy by deferiprone and desferrioxamine in patients with β -thalassaemia major: application of SQUID biomagnetic liver susceptometry. *Br J Haematol* 121: 938-948, 2003

Gabutti V, Piga A, Fortina P, Miniero R, Nicola P: Correlation between Transfusion Requirement, Blood Volume and Haemoglobin Level in Homozygous β -Thalassemia. *Acta haemat* 64: 103-108, 1980

Gordeuk VR and Brittenham GM: Bleomycin-reactive iron in patients with acute non-lymphocytic leukemia. *Fed Eur Biochem Soc* 308: 4-6, 1992

Gosriwatana I, Loreal O, Lu S, Brissot P, Porter J, Hider RC: Quantification of Non-Transferrin-Bound Iron(NTBI) in the Presence of Unsaturated Transferrin. *Anal Biochem* 273: 212-220, 1999

Gutteridge JMC, Rowley DA, Griffiths E, Halliwell B: Low molecular weight iron complexes and oxygen radical reactions in idiopathic haemochromatosis. *Clin Sci* 68: 463, 1985

Gutteridge JMC, Halliwell B: Iron toxicity and oxygen radicals in LPO-Review. *Bailliere's Clin Haematol* 2: 195-256, 1989

Hershko C, Rachmilewitz EA: Non-transferrin plasma iron in patients with transfusional iron overload. In Crichton RR (ed): *Proteins of Iron Storage and Transport in Biochemistry and Medicine*. Amersham. The Netherlands, North Holland 427-432, 1975

Hershko C, Rachmilewitz EA: Iron chelation in thalassemia: mechanism of desferrioxamine action. *Israel J Med Sci* 14: 1111-1115, 1978 a

Hershko C, Graham G, Bates GW, Rachmilewitz EA: Non-Specific Serum Iron in Thalassemia: An Abnormal Serum Iron Fraction of Potential Toxicity. *Br J Haematol* 40: 255-263, 1978 b

Hider RC, Kontoghiorghes G, Silver J: UK Patent G 2118176, 1982

Hoffbrand AV: Oral Iron Chelation. *Semin Haematol* 33: 1-8, 1996

Jacobs F, Monod J: Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 3: 318-358, 1961

Kooperationsvertrag mit dem Ospedale S.Anna / O.I.R.M., Centro Microcitemie, Torino Prof. A. Piga, 1998

Kooperationsvertrag mit dem Ospedale Regionale, Centro Microcitemie, Cagliari, Prof. R. Galanello, 1998

Kooperationsvertrag mit dem Ospedale Regionale, Centro Microcitemie, Athen, Prof. A. Kattamis, 1998

Kontoghiorghes GJ, Aldouri MA, Hoffbrand AV: Effective chelation of iron in β -Thalassemia with the oral iron chelator 1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one. Br J Med 295: 1509-1512, 1987

Ladis V: NTBI-monitoring after transfusion-report. 8th Int Conf on Thalassemia and the Hemoglobinopathies, Athens, 2001

Lehmann WH, Heinrich HC: Ferrioxamine and Its Hexadentate Iron-Chelating Metabolites in Human Post-Desferal Urine Studied by High-Performance Liquid Chromatography and Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry. Anal Biochem 184: 219-227, 1990

Livrea MA, Tesoriere L, Pintaudi AM, Calabrese A, Maggio A, Freisleben H-J, D'Arpa D, D'Anna R, Bongiorno A: Oxidative stress and antioxidant status in β -thalassaemia major: Iron overload and depletion of lipid-soluble antioxidants. Blood 88: 3608-3614, 1996

Lucarelli G, Galimberti M, Polchi P, Angelucci E, Baronciani D, Durazzi SM, Giardini C, Agostinelli F, Donati M, Giorgi C: A new approach to bone marrow transplantation in thalassemia. Ann NY Acad Sci 612: 394-7, 1990

Lucarelli G, Angelucci E, Giardini C, Baronciani D, Galimberti M, Polchi P, Bartolucci M, Muretto P, Albertini F: Fate of iron stores in thalassemia after bone marrow transplantation. Lancet 342: 1388-91, 1993

Lucarelli G, Giardini C, Baronciani D: Bone Marrow Transplantation in Thalassemia. Semin Haematol 32, 4: 297-303, 1995

Luzzatto L: Genetics of red cells and susceptibility to malaria. Blood 54: 961-976, 1979

Modell B, Berdoukas V: The Clinical Approach to Thalassemia. London: Grune & Stratton p5, p203, p240, 1984

Modell B, Khan M, Darlison M: Survival in beta thalassaemia major in the UK: data from the UK Thalassaemia Register. *Lancet* 355: 2051-52, 2000

Moos T, Morgan EH: Evidence for Low Molecular Weight, Non-Transferrin-Bound Iron in Rat Brain and Cerebrospinal Fluid. *J Neurosci research* 54: 486-494, 1998

Nielsen P, Fischer R, Engelhardt R, Tondüry P, Gabbe EE, Janka GE: Liver iron stores in patients with secondary haemosiderosis under iron chelation therapy with deferoxamine or deferiprone. *Br J Haematol* 91: 827-833, 1995

Nielsen P, Fischer R, Engelhardt R, Dresow B, Gabbe EE: Neue Möglichkeiten in der Diagnose der hereditären Hämochromatose. *DÄ* 46: 2059-2065, 1998 a

Nielsen P, Carpinteiro S, Fischer R, Cabeda JM, Porto G, Gabba EE: Prevalence of the C282Y and H63D mutations in the HFE gene in patients with hereditary haemochromatosis and in control subjects from Northern Germany. *Br J Haematol* 103: 842-845, 1998 b

Nielsen P: Untersuchungen und experimentelle Modelle zur Diagnostik, Pathophysiologie und Therapie von Eisenstoffwechselstörungen. *Habil, Universität Hamburg*, 1999

Nielsen P, Fischer R, Engelhardt R, Düllmann J: Diagnosis of Hereditary Haemochromatosis using Non-Invasive Methods. *Transfus Med Hemother* 30: 27-36, 2003

Nienhuis AW, Delea C, Aamodt R, Bartter F, French Anderson WF: Evaluation of desferrioxamine and asorbic acid for the treatment of chronic iron overload. *Birth Defects Orig Artic Ser* 12: 177-85, 1976

Olivieri NF, Nathan DG, MacMillan JH, Wayne AD, Martin M, McGee A, Koren G, Liu PP, Cohen AR: Survival of medically treated patients with homozygous β thalassemia. *N Engl J Med* 331: 574, 1994

Olivieri NF, Brittenham GM, Matsui D, Berkovitch M, Blendis LM, Cameron RG, McClelland RA, Liu PP, Templeton DM, Koren G: Iron-chelation therapy with oral deferiprone in patients with thalassemia major. *N Engl J Med* 332: 918, 1995

Olivieri NF, Brittenham GM: Iron-Chelating Therapy and the Treatment of Thalassemia, *Blood* 89: 739-761, 1997

Olivieri NF, Brittenham GM, McLaren CE, Templeton DM, Cameron RG, McClelland RA, Burt AD and Fleming KA: Long-term Safety and Effectiveness of Iron-Chelation Therapy with Deferiprone for Thalassemia Major. *N Engl J Med* 339: 417-23, 1998

Persons DA, Hargrove PW, Allay ER, Hanawa H, Nienhuis AW: The degree of phenotypic correction of murine beta-thalassemia intermedia following lentiviral-mediated transfer of a human gamma-globin gene is influenced by chromosomal position effects and vector copy number. *Blood* 101: 2175-83, 2003

Pippard MJ, Callender ST, Weatherall DJ: Intensive iron chelation therapy with desferrioxamine in iron-loading anaemias. *Clin Sci and Mol Medicine* 54: 99-106, 1978

Pippard MJ, Callender ST, Warner CT, Weatherall DJ: Iron absorption and loading in β -Thalassemia intermedia. *Lancet* 2: 819, 1979

Pippard MJ, Callender ST, Finch CA: Ferrioxamine excretion in iron-loaded man. *Blood* 60: 288-294, 1982

Pootrakul P, Breuer W, Sametband M, Sirankapracha P, Hershko C, Cabantchik ZI: Labile plasma iron (LPI) as an indicator of chelatable plasma redox activity in iron-overload β -thalassemia / HbE patients treated with an oral chelator. *Blood* 104: 1504-1510, 2004

Porter JB, Abeysinghe RD, Marshall L, Hider RC, Singh S: Kinetics of removal and reappearance of non-transferrin-bound iron with deferoxamine therapy. *Blood* 88: 705-713, 1996

Propper RD, Cooper B, Rufo RR, Nienhuis AW, French Anderson W, Franklin Bunn H, Rosenthal A Nathan DG: Continuous subcutaneous administration of Desferrioxamine in patients with iron overload. *N Engl J Medicine* 297: 418-423, 1977

Rachmilewitz EA: The role of intracellular hemoglobin precipitation, low MCHC and iron overload on red blood cell membrane peroxidation in thalassaemia. *Birth Defects Orig Artic Ser* 12: 123-33, 1976

Reller K, Dresow B, Collell M, Fischer R, Engelhardt R, Nielsen P, Dürken M, Politis C, Piga A: Iron Overload and Antioxidant Status in Patients with β -Thalassemia Major. *Ann NY Acad Sci* 850: 463-465, 1998

Reller K: Antioxidantienstatus bei Patienten mit β -Thalassämie. *Med Diss, Universität Hamburg*, 2000

Rivella S, May C, Chadburn A, Riviere I, Sadelain M: A novel murine model of Cooley anemia and its rescue by lentiviral-mediated human beta-globin gene transfer. *Blood* 101: 2932-9, 2003

Roeser HP, Halliday JW, Sizemore DEA: Serum ferritin in ascorbic acid deficiency. *Br J Haematol* 45: 457, 1980

Sauntharajah Y, Hillery CA, Lavelle D, Molokie R, Dorn L, Bressler L, Gavazona S, Chen YH, Hoffman R, De Simone J: Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on fetal hemoglobin levels, red cell adhesion and hematopoietic differentiation in patients with sickle cell disease. *Blood* 102: 3865-70, 2003

Schümann K, Moret R, Kunzle H, Kuhn LC: Iron regulatory protein as an endogenous sensor of iron in rat intestinal mucosa: Possible implications for the regulation of iron absorption. *Eur J Biochem* 260: 362-372, 1999

Skikne BS, Flowers CH, Cook JD: Serum transferrin receptor: A quantitative measure of tissue iron deficiency. *Blood* 75: 1870-1876, 1990

Singh S, Hider RC, Porter JB: A direct method for Quantification of non-transferrin-bound iron. *Anal Biochem* 186: 320-323, 1990

Studienprotokoll LA08-9701 der Firma APOTEX, Canada.

Tancabelic J, Sheth S, Paik M, Piomelli S: Serum Transferrin Receptor as a Marker of Erythropoiesis Suppression in Patients on Chronic Transfusion. *Am J Hematol* 60: 121-125, 1999

Tricta F, Spino M: Iron chelation with oral deferiprone in patients with thalassemia. *N Engl J Med* 339: 1710-1714. , 1998

Villeneuve JP, Bilodeau M, Lepage R, Côté J, Lefebvre M: Variability in hepatic iron concentration measurement from needle-biopsy specimens. *J Hepatol* 25: 172-177, 1996

Wang WC, Ahmed N, Hanna M: Non-transferrin-bound iron in long-term transfusion in children with congenital anemias. *J Pediatr* 108: 522-557, 1986

Weatherall DJ, Clegg JB: *The Thalassemia Syndromes* (4rd edn). Blackwell Science p 137, pp 192-194, pp 484-507, 2001

Witt O, Mönkemeyer S, Rönndahl G, Erdlenbruch B, Reinhardt D, Kanbach K, Pekrun A: Induction of fetal hemoglobin expression by the histone deacetylase inhibitor apicidin. *Blood* 101: 2001-2007, 2003

Zurlo MG, De Stefano P, Borgna-Pignatti C, Palma A, Piga A, Melevendi C, Di Gregorio F, Burattini MG, Terzoli S: Survival and causes of death in Thalassaemia major. *Lancet* 1: 27-29 1989

7 Anhang

A I Patientendaten der Patientengruppe für die Messung der NTBI-Kinetik als Funktion der Erythropoese während eines Transfusionsintervalls

Patienten Nr.	Alter [Jahre]	Geschlecht	Größe [cm]	Gewicht [kg]	Diagnose
1	22,1	f	161	46,2	β-Th_m
2	9,7	f	131	27,4	β-Th_int
3	22,8	f	151	48,9	β-Th_m
4	23,6	f	155	54,5	β-Th_m
5	13,7	m	146	31,5	β-Th_m
6	15,6	f	141	38,8	β-Th_int
7	19,6	m	157	61,2	β-Th_m
8	12,5	f	136	36,5	β-Th_int
9	28,0	m	167	61	β-Th_m
10	23,4	f	157	58	β-Th_m
11	21,8	f	145	50,5	sic_βTh
12	24,5	m	176	68,8	β-Th_m
13	27,6	m	176	61,2	β-Th_m
14	23,1	m	161	49,2	β-Th_m
15	25,2	f	150	53	β-Th_m

A II: Patientendaten und Entzündungsparameter der NTBI-Kinetik

DFO – Desferrioxamine, DFP – Deferiprone, HCV – Hepatitis C, ALT – Alaninaminotransferase, BSG – Blutkörperchengeschwindigkeit, time (Blutentnahmezeitpunkt: **0** - vor der Transfusion, **1** – 7 ± 2 Tage, **2** – 14 ± 2 Tage, **3** – 21 ± 2 Tage, **4** – 28 ± 2 Tage nach der Transfusion), k.A. keine Angabe.

Patienten Nr.	DFO [mg/kg/d]	DFP [mg/kg/d]	HCV	ALT [IU/l]	BSG [mm]			
					0	1	2	3_4
1	34,1	0,0	pos.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
2	42,5	0,0	neg.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
3	46,0	0,0	neg.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.

Patienten Nr.	DFO [mg/kg/d]	DFP [mg/kg/d]	HCV	ALT [IU/l]	BSG [mm]			
					0	1	2	3_4
4	39,3	0,0	neg.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
5	59,0	0,0	neg.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
6	53,0	0,0	neg.	24	47	k.A.	15	52
7	40,0	0,0	neg.	20	30	k.A.	12	18
8	45,0	0,0	neg.	16	23	k.A.	21	18
9	46,0	0,0	pos.	105	67	k.A.	66	47
10	41,0	0,0	neg.	19	8	k.A.	10	8
11	63,0	0,0	neg.	37	35	k.A.	31	34
12	49,0	0,0	pos.	113	61	54	k.A.	57
13	0,0	78,0	pos.	86	45	k.A.	40	42
14	42,0	0,0	pos.	160	47	k.A.	43	44
15	48,0	0,0	pos.	91	66	k.A.	64	82

A III: Blutwerte (Serumeisen, Transferrinsättigung) der Patienten der NTBI-Kinetik

Pat. Nr. - Patientenummer, time (Blutentnahmezeitpunkt: 0 – vor der Transfusion, 1 – 7 ± 2 Tage, 2 – 14 ± 2 Tage, 3 – 21 ± 2 Tage, 4 – 28 ± 2 Tage nach der Transfusion), SI - Serumeisen, Tfs - Transferrinsättigung)

Pat. Nr.	time [d]					SI [µg/dl]					Tfs [%]				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
1	0	6	14	21	28	273	222	235	251	230	93	94	90	97	96
1'	0	7	14	21		230	226	172	232		87	97	100	97	
2	0	7	14	22		188	100	136	260		100	42	57	97	
2'	0	7	14	22	27	182	216	275	204	227	91	75	100	83	93
3	0	7	14	21	28	241	255	253	236	237	98	97	91	93	107
4	0	8	14	21		246	228	219	235		96	97	100	88	
5	0	8	14	18		218	212	250	209		102	101	95	61	
6	0		12	21		192		187	132		61		64	49	
7	0		10	21		250		303	265		63		72	69	
8	0		12	21		175		251	219		105		107	87	
9	0		15	21		300		231	245		79		67	77	
10	0		13	21		258		250	261		78		66	62	
11	0		12	21		274		225	180		104		82	102	

Pat. Nr.	time [d]					SI [µg/dl]					Tfs [%]				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
12	0	7		22		187	308		206		100	116		105	
13	0		12	21		266		150	222		101		92	99	
14	0		12	21		289		188	184		97		96	92	
15	0		14		26	288		251		315	70		68		71

A IV: Blutwerte (NTBI, Ferritin) der Patienten der NTBI-Kinetik

Ferritin, NTBI – Nicht-Transferrin gebundenes Eisen

Pat. Nr.	Ferritin [µg/l]					NTBI [µmol/l]				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
1	1649	2163	1740	1760	1542	4,43	3,79	3,16	5,43	5,11
1'	1756	2618	2052	1992		3,42	3,07	2,12	4,02	
2	1554	1493	1698	1681		2,67	0,06	0,65	3,36	
2'	4723	2286	2561	2372	1774	5,66	3,38	5,21	5,51	8,65
3	1338	2258	1806	1709	1694	5,04	4,35	4,24	4,34	5,47
4	1534	1622	1624	1554		4,52	4,33	4,62	4,59	
5	897	1519	1328	1248		4,87	3,88	6,38	5,44	
6	2865		2726	2645		4,0		5,0	0,5	
7	1579		2095	1785		3,2		3,9	6,0	
8	3075		3035	2960		1,6		4,0	4,7	
9	3247		2957	2918		3,0		3,2	5,2	
10	2380		1976	1836		4,8		6,5	8,5	
11	2284		1930	1817		1,5		4,9	4,7	
12	3506	2655	0	2488		6,9	7,0		26,1	
13	2710		3603	3256		5,9		12,0	6,9	
14	3564		4393	4010		6,0		6,3	7,2	
15	2820		2223		2618	6,1		5,1	4,4	

A V: Blutwerte (Hämoglobin, sTfR, Retikuloz.) der Patienten der NTBI-Kinetik

Hb - Hämoglobin, sTfR - Serumtransferrinrezeptor, Retikulozyten

Pat. Nr.	Hb [g/dl]					sTfR [mg/l]					Retikulozyten [%o]			
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3_4
1	9,7	k.A.	k.A.	k.A.	9,2	6,6	6,2	5,3	5,5	5,7	13	k.A.	k.A.	2
1'	9,5	11,3	11,2	10		4,7	5,3	4,1	3,4		11	10		15
2	7,7	k.A.	k.A.	8,6		6,1	6,1	5,9	5,8		8	k.A.	k.A.	4
2'	7,3	9,4	8,5	7,1	7,1	7,1	6,2	5,0	5,3	7,5	4	6	4	6_7
3	9,5	k.A.	k.A.	k.A.	9,9	2,6	2,5	2,1	2,2	2,7	3	k.A.	k.A.	4
4	8,8	k.A.	k.A.	9,2		4,3	4,1	4,7	4,7		3	k.A.	k.A.	3
5	8,8	k.A.	k.A.	9,4		2,1	2,3	2,2	2,9		2	k.A.	k.A.	1
6	9,6		10,6	9,7		4,0		3,2	4,2		9		6	6
7	9,6		10,6	9		5,1		4,5	3,3		7		7	6
8	10,6		10,5	9,7		4,8		4,6	5,5		6		6	6
9	9,7		9,3	8,9		1,4		2,0	2,9		9		10	10
10	10,6		11,1	11		7,5		6,9	6,8		16		15	12
11	9,8		10,2	9,7		5,3		5,2	5,7		6		4	5
12	10,9	11,6		11		5,4	5,2		6,8		20	19		14
13	9,5		10	9,3		5,5		5,4	5,6		7		6	13
14	9,5		10,3	9,4		3,3		4,2	4,7		10		15	16
15	9,6		10,4		9,2	7,8		7,6		8,8	9		12	22

A VI: Leber- und Milzwerte der Patienten der NTBI-Kinetik

V_{Leber MW} - Lebervolumenmittelwert, V_{Milz MW} - Milzvolumenmittelwert, LIC – Lebereisenkonzentration, SIC – Milzeisenkonzentration

Patienten Nr.	V _{Leber MW} [ml]	V _{Milz MW} [ml]	LIC [µg Fe/g _{liv}]	SIC [µg Fe/g _{spl}]
1	1738	0	979	0
2	1180	520	1134	731
3	1370	0	995	0
4	1844	355	1418	
5	978	420	1489	1524
6	1776	492	3746	900
7	1424	378	1375	539

Patienten	$V_{\text{Leber MW}}$	$V_{\text{Milz MW}}$	LIC	SIC
Nr.	[ml]	[ml]	[$\mu\text{g Fe/g}_{\text{liv}}$]	[$\mu\text{g Fe/g}_{\text{spl}}$]
8	1244		2266	
9	1702	0	2311	0
10	1628	0	1592	0
11	2186	0	4394	0
12	3720	0	4513	0
13	1948	0	3251	0
14	1698	0	1761	0
15	1636	0	1954	0

A 1 Patientendaten der Vergleichsstudie: DFO-Monotherapie und DFO / DFP-Kombinationstherapie (Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht, Diagnose)

Patienten	Alter	Geschlecht	Größe		Gewicht		Diagnose
Nr.	[Jahre]		[cm]		[kg]		
			basal	nach 1 J	basal	nach 1 J	
501	25,1	f	152	152	50	50	β -Th_m
502	13,3	f	156	158	60	62	β -Th_int
503	25,3	f	162	162	53	54	β -Th_m
504	19,5	m	160	160	55	56	Lep_ β -Th
505	24,8	f	159	159	47	47	β -Th_m
506	27,4	f	160	160	68	73	β -Th_m
507	11,5	m	133	136	37	41	β -Th_m
508	13,1	m	147	169	47	50	β -Th_m
509	10,3	f	147	156	43	53	β -Th_m
510	10,2	f	130	152	41	44	β -Th_m
511	17,1	f	140	143	26	27	β -Th_m
512	11,1	f	147	158	34	45	β -Th_m
601	22,4	f	140	140	42	42	β -Th_m
602	21,8	f	153	153	60	68	β -Th_m
603	19,4	m	154	154	49	51	β -Th_m
604	19,4	m	151	151	49	52	β -Th_m
605	21,2	f	152	152	41	38	β -Th_m
606	21,9	m	175	175	58	57	β -Th_m
607	12,2	f	130	134	31	38	β -Th_m

Patienten Nr.	Alter [Jahre]	Geschlecht	Größe		Gewicht		Diagnose
			[cm]		[kg]		
			basal	nach 1 J	basal	nach 1 J	
608	20,2	m	144	145	42	44	β-Th_m
609	21,9	m	157	158	62	62	β-Th_m
610	28,0	m	166	166	73	70	β-Th_m
611	23,5	f	153	153	48	49	β-Th_m
612	25,5	f	151	153	73	72	β-Th_m
613	15,9	m	149	157	48	51	β-Th_m
614	15,1	f	154	154	53	56	β-Th_m
615	10,9	m	139	140	33	46	β-Th_m
616	16,1	m	165	165	50	54	β-Th_m
617	10,3	m	132	133	28	30	β-Th_m
618	11,5	m	139	139	33	39	β-Th_m
619	16,0	m	151	152	41	42	β-Th_m
620	20,5	f	147	147	44	47	β-Th_m
621	12,7	m	138	147	43	49	β-Th_m
622	16,2	f	143	143	35	36	β-Th_m
623	19,5	f	147	147	38	38	β-Th_m
624	18,4	m	168	168	50	52	β-Th_m
625	23,3	f	143	143	40	41	β-Th_m
626	12,1	m	130	138	29	33	β-Th_m
627	16,4	f	158	161	47	49	β-Th_m
628	34,0	m	170	170	59	59	β-Th_m
629	24,5	f	152	152	48	49	β-Th_m
630	15,5	f	141	141	44	40	β-Th_m
701	18,8	f	155	155	62	62	β-Th_m
702	18,4	m	166	166	66	67	β-Th_m
703	25,0	m	160	160	52	52	β-Th_m
704	21,8	f	164	164	44	44	β-Th_m
705	22,7	f	155	155	59	60	β-Th_m
706	24,5	m	176	176	72	69	β-Th_m
707	18,9	f	161	161	71	71	β-Th_m
708	32,9	f	156	155	54	53	β-Th_m
709	24,1	m	168	168	70	69	β-Th_m
710	18,8	m	147	147	62	56	β-Th_m
711	27,7	m	170	170	74	73	β-Th_m

Patienten Nr.	Alter [Jahre]	Geschlecht	Größe		Gewicht		Diagnose
			basal	nach 1 J	basal	nach 1 J	
			[cm]		[kg]		
712	22,9	m	163	163	57	56	β-Th_m
713	23,0	m	155	155	54	59	β-Th_m
714	25,1	f	156	156	46	46	β-Th_m
715	24,7	m	160	160	65	65	β-Th_m
716	21,6	m	167	167	60	60	β-Th_m
717	19,1	m	172	172	67	70	β-Th_m

A 2 Patientendaten der Vergleichsstudie: DFO-Monotherapie und DFO / DFP-Kombinationstherapie (DFO/DFP-Dosis, HCV Status, ALT)

DFO – Desferrioxamine, DFP – Deferiprone, HCV – Hepatitis C, ALT – Alaninaminotransferase zu Studienbeginn (basal) und nach 1 Jahr

Pat. Nr.	DFO		DFP	HCV	ALT	
	[mg/kg/d]		[mg/kg/d]		[U/l]	
	basal	nach 1 Jahr	nach 1 Jahr	basal	basal	nach 1 Jahr
501	29,7	28,6	0,0	pos.	12	14
502	18,0	23,0	0,0	neg.	17	20
503	31,2	10,6	53,6	pos.	18	37
504	17,1	10,2	53,6	pos.	24	11
505	0,0	30,4	0,0	pos.		
506	18,2	7,8	53,6	pos.	32	44
507	18,8	17,4	0,0	neg.	36	35
508	26,5	8,6	53,6	neg.	33	11
509	17,5	8,1	53,6	neg.	13	26
510	17,5	16,2	0,0	neg.	20	15
511	27,6	19,8	0,0	pos.	40	41
512	24,0	6,3	53,6	pos.	22	13
601	30,9	35,1	0,0	neg.	34	23
602	30,0	8,0	53,6	pos.	64	72
603	30,9	34,3	0,0	pos.	14	14
604	35,1	9,7	53,6	neg.	16	18
605	34,3	38,4	0,0	neg.	40	31
606	30,9	10,0	53,6	pos.	46	181
607	28,3	7,5	53,6	neg.	14	13

Pat. Nr.	DFO		DFP	HCV	ALT	
	[mg/kg/d]		[mg/kg/d]		[U/l]	
	basal	nach 1 Jahr	nach 1 Jahr	basal	basal	nach 1 Jahr
608	30,0	6,9	53,6	pos.	171	139
609	30,0	7,0	53,6	pos.	175	86
610	34,3	32,5	0,0	pos.	99	96
611	37,7	36,9	0,0	neg.	36	40
612	20,6	23,8	0,0	pos.	97	71
613	26,6	30,0	0,0	pos.	52	73
614	25,7	35,1	0,0	pos.	61	31
615	31,7	9,1	53,6	neg.	15	35
616	35,1	8,3	53,6	neg.	65	26
617	31,7	30,0	0,0	neg.	50	148
618	30,9	9,4	53,6	neg.	18	20
619	31,7	25,5	0,0	pos.	50	99
620	24,3	11,1	53,6	neg.	27	35
621	18,0	8,0	53,6	neg.	84	87
622	24,0	29,1	0,0	pos.	14	12
623	23,1	35,1	0,0	pos.	22	15
624	34,3	8,9	53,6	pos.	19	32
625	22,3	8,6	53,6	pos.	13	41
626	17,1	20,6	0,0	neg.	75	96
627	17,9	26,6	0,0	neg.	15	10
628	36,0	43,4	0,0	pos.	28	27
629	26,6	6,3	53,6	pos.	18	70
630	21,4	26,6	0,0	neg.	11	13
701	34,5	11,7	53,6	pos.	13	19
702	22,9	9,3	53,6	neg.	33	32
703	21,9	30,2	0,0	neg.	57	28
704	32,6	13,3	53,6	neg.	11	14
705	37,2	12,6	53,6	neg.	15	23
706	29,7	29,8	0,0	pos.	15	15
707	25,3	30,4	0,0	neg.	10	15
708	39,2	47,2	0,0	pos.	21	14
709	35,9	30,9	0,0	neg.	10	14
710	28,7	34,5	0,0	neg.	21	23
711	34,6	11,7	53,6	neg.	43	83

Pat. Nr.	DFO		DFP	HCV	ALT	
	[mg/kg/d]		[mg/kg/d]		[U/l]	
	basal	nach 1 Jahr	nach 1 Jahr	basal	basal	nach 1 Jahr
712	37,5	12,7	53,6	neg.	11	45
713	26,8	13,4	53,6	pos.	31	22
714	38,4	46,2	0,0	pos.	14	11
715	37,3	10,8	53,6	neg.	20	24
716	22,3	27,7	0,0	neg.	33	31
717	26,6	10,8	53,6	neg.	23	16

A 3 Blutwerte (NTBI, Serumeisen, Transferrinsättigung, Ferritin) der Patienten der Vergleichsstudie der DFO-Monotherapie und DFO / DFP-Kombinationstherapie

NTBI – Nicht-Transferrin gebundenes Eisen, SI – Serumeisen, Tfs – Transferrinsättigung, Ferritin zu Beginn der Studie (basal) und nach 1 Jahr

Pat. Nr.	NTBI		SI		Tfs		Ferritin	
	[µmol/l]		[µg/dl]		[%]		[µg/l]	
	basal	nach 1 J	basal	nach 1 J	basal	nach 1 J	basal	nach 1 J
501	5,31	6,05	237	183		90	1970	2220
502	4,18	12,34	212	200			2115	1923
503	3,03	10,44	174	210		68	1594	1142
504	5,10	12,37	235	287			2513	2449
505	4,70	20,42	250	311				
506	4,67	4,60	172	202			2639	1686
507	3,87	10,75	216	272			1837	2340
508	4,21		263				635	351
509	3,88	6,39	199	241	73		1481	1357
510	3,08	11,95	236		48		1571	1174
511	3,47	3,70		189			2163	2008
512	3,86	6,47	218	239			1183	1655
601	7,71	2,40	291	156	105	62	2840	1980
602	5,35	11,93	308	291	116	90	2560	2250
603	6,56	17,74	222	290	99	93	3020	2080
604	7,90	12,26	208	221	97	87	1460	1970
605	4,90	4,74	266	256	101	93	3200	2330
606	6,29	6,47	251	239	100	91	2880	3880

Pat. Nr.	NTBI		SI		Tfs		Ferritin	
	[µmol/l]		[µg/dl]		[%]		[µg/l]	
	basal	nach 1 J	basal	nach 1 J	basal	nach 1 J	basal	nach 1 J
607	5,80	5,19	223	140	100	74	2140	1460
608	7,39	4,07	206	162	105	87	2040	710
609	7,84	8,35	251	210	107	92	1490	660
610	3,96	14,52	187	281			1980	1570
611	5,67	8,22	270	178	98	91	2360	2760
612	5,96	6,77	274	216	104	94	3410	2850
613	1,53	6,40	138	154	85	91	1540	1520
614	5,49	4,71	224	199	99	98	2200	1970
615	7,09	3,96	225	160	82	92	2800	2480
616	3,24	8,26	194	216	95	92	2000	950
617	4,62	5,98	198	191	105	99	1860	2170
618	5,99	7,01	232	168	112	80	2460	1310
619	6,99	8,03	251	237	104	94	1290	1310
620	3,67	9,07	184	253	92	97	2520	3050
621	3,68	3,26	150	162	92	68	1450	1590
622	6,03	7,03	209	183	99	81	3300	2460
623	5,87	5,95	192	192	98	98	2860	1590
624	17,59	4,76	284	180	76	75	2380	3200
625	5,84	5,00	179	194	99	56	1220	970
626	4,42	5,21	180	221	102	91	1640	1140
627	5,49	8,15	235	195	106	83	1300	870
628	7,51	6,62	289	135	97	84	1400	1430
629	3,38	6,50	219	146	87	81	1110	1360
630	5,11	5,34	175	171	105	80	1415	1200
701	24,35	8,38	286	283	64	82	2913	2039
702	10,70	9,69	238	218	95	58	3492	2239
703	18,68	4,49	345	134	89	62	3164	3111
704	3,93	3,36	195	166	144	71	3907	2951
705	6,63	6,29	247	208	88	58	2597	2030
706	16,98	1,85		140		64	3480	1494
707	7,56	3,55	223	206	139	90	2674	2456
708	7,50	10,46	218	158	99	48	1672	1215
709	20,87	4,07	304	230	120	94	3484	3370
710	4,23	3,99	200	171	92	92	2406	1577

Pat. Nr.	NTBI		SI		Tfs		Ferritin	
	[μmol/l]		[μg/dl]		[%]		[μg/l]	
	basal	nach 1 J	basal	nach 1 J	basal	nach 1 J	basal	nach 1 J
711	24,38	2,72	310	153	73	60	2224	1804
712	8,74	5,66		233		89	1280	2438
713	14,06	12,50	304	238	79	63	2295	2883
714	10,50	17,78	159	127	50	41	1333	1475
715	4,36	28,45	122	225	73	67	1893	1718
716	6,40	8,66	209	170	72	78	2797	2299
717	14,39	8,13	326	214	88	71	1255	611

A 4 Leber- und Milzwerte der Patienten der Vergleichsstudie der DFO-Monotherapie und DFO / DFP-Kombinationstherapie

$V_{\text{Leber MW}}$ - Lebervolumenmittelwert, $V_{\text{Milz MW}}$ - Milzvolumen-mittelwert, LIC – Lebereisenkonzentration, SIC – Milzeisenkonzentration)

Pat. Nr.	$V_{\text{Leber MW}}$ [ml]	$V_{\text{Milz MW}}$ [ml]	LIC		SIC	
			[μg Fe/g _{liv}]		[μg Fe/g _{spl}]	
			basal	nach 1 Jahr	basal	nach 1 Jahr
501	1592	0	1858	1075	0	0
502	1851	504	1999	1502	1236	957
503	1285	0	2217	1225	0	0
504	1890	0	1125	1798	0	0
505	1306	0	1918	1778	0	0
506	2019	0	2584	2046	0	0
507	1148	402	2018	2090	2040	2081
508	1689	427,5	1595	1545	1163	1151
509	1519	284	953	1549	945	1152
510	1469	0	927	1208	0	0
511	1297	0	2708	3210	0	0
512	1157	232	1930	1392	1219	1111
601	1318	230	1335	680	1094	791
602	1379	184	1239	981	1063	958
603	1615	330	953	332	945	508
604	1378	291	893	1239	915	1063
605	1045	120	4016	2289	1036	1247

Pat. Nr.	V _{Leber MW} [ml]	V _{Milz MW} [ml]	LIC		SIC	
			[µg Fe/g _{liv}]		[µg Fe/g _{spl}]	
			basal	nach 1 Jahr	basal	nach 1 Jahr
606	2194	0	1859	2350	0	0
607	1020	221	749	1208	835	1052
608	1320	490	1376	659	135	133
609	1658	735	1469	1332	48	1093
610	1603	0	1092	1182	0	0
611	1447	123,5	1230	1381	1060	1108
612	2042	70,5	2358	1502	1249	1141
613	1323	392	1288	1217	1183	700
614	1509	243	1455	1160	1129	1034
615	1108	345	1384	1062	1109	994
616	1613	440	2785	2022	1238	1229
617	1016	228,5	1111	1125	1015	1020
618	1038	455,5	1076	1651	1000	1174
619	1332	313	1100	1313	267	1087
620	1245	138,5	1896	1571	1215	1157
621	1417	268	2483	3616	1249	1126
622	981	160	1942	1001	1221	968
623	1163	214	1426	1578	1121	1159
624	2049	345	1656	2570	1306	684
625	1253	173	694	500	800	660
626	1213	192	1568	1360	1157	1102
627	1423	0	1240	812	0	0
628	1227	0	940	943	0	0
629	1361	143	748	1388	834	1110
630	916	204	1250	1074	1067	1000
701	1109	246	1481	1089	1136	1006
702	1624	304	2030	1510	1230	1143
703	1365	71,5	1611	1532	1166	1148
704	1189	317,5	3210	2694	1195	1244
705	1710	242	689	669	797	784
706	1590	515	1769	1343	2098	1918
707	1460	314	905	1664	921	1177
708	1851	355	1855	1132	1209	1023
709	1337	423,5	1041	713	985	813

Pat. Nr.	V _{Leber MW} [ml]	V _{Milz MW} [ml]	LIC		SIC	
			[µg Fe/g _{liv}]		[µg Fe/g _{spl}]	
			basal	nach 1 Jahr	basal	nach 1 Jahr
710	1438	208	2221	1803	1244	1202
711	1384	404,5	1344	1004	1097	969
712	1643	624,5	1584	1543	1160	1151
713	1721	0	3504	1982	0	0
714	1545	443	1888	1119	1214	1018
715	1876	623	930	1656	934	1175
716	1595	512	1323	1152	1091	1031
717	1529	436,5	1873	1392	1212	1111

A 5 Eisenbilanz (TBIS, spec. TBIS, Transfundiertes Eisen, TBIE) der Patienten der Vergleichsstudie der DFO-Monotherapie und DFO / DFP-Kombinationstherapie

TBIS – Total body iron store = Gesamtkörper-Speichereisen, spec. TBIS – specific Total body iron store = spezifisches Gesamtkörper-Speichereisen, Fe_{trsf} - transfundiertes Eisen, TBIE – Total body iron elimination rate = Gesamtkörper-Speichereisen-Eliminationsrate)

Pat. Nr.	TBIS		spec TBIS		Fe _{trsf}		TBIE12		kel 12 [%/d]
	U [mg Fe]		[mg Fe/kg] >120		[mg/d]		[mg/d]		
	basal	nach 1 J			basal	nach 1 J	DFO	DFO/ DFP	
501	3697	2139	72	44	22,0	21,8	25		1,0
502	5404	4078	90	66	24,6	22,6	25,4		0,6
503	3561	1968	70	35	20,4	21,6		24,9	1,1
504	2658	4248	46	80	24,4	24,9		21,4	0,6
505	3131	2903	62	65	0,0	21,3	21,8		0,7
506	6521	5164	82	81	20,8	21,8		25,1	0,4
507	3921	4045	103	102	19,6	19,6	19,4		0,5
508	3989	3877	86	73	22,4	14,6		14,8	0,4
509	2145	3350	44	69	18,9	25,3		22,6	0,7
510	1702	2218	32	62	13,2	16,1	14,8		0,7
511	4390	5204	171	191	12,8	16,4	14,8		0,3
512	3145	2335	84	54	17,4	22,1		23,9	1,0
601	2513	1347	61	31	19,6	19,6	22,5		1,5
602	2380	1911	42	25	26,1	23,0		24,1	1,2
603	2314	880	49	16	19,4	21,8	25,3		2,5

Pat. Nr.	TBIS		spec TBIS		Fe _{trsf}		TBIE12		kel 12 [%/d]
	U [mg Fe]		[mg Fe/kg] >120		[mg/d]		[mg/d]		
	basal	nach 1 J			basal	nach 1 J	DFO	DFO/ DFP	
604	1871	2521	35	50	17,8	20,7		19,2	0,8
605	5401	3177	130	85	18,5	18,0	23,5		0,6
606	5098	6445	79	124	22,2	22,9		19,6	0,3
607	1186	1831	34	52	12,0	14,7		13,1	0,8
608	2353	1169	58	26	19,2	19,9		22,8	1,7
609	3089	3765	45	61	23,7	21,9		20,2	0,6
610	2188	2368	32	31	17,8	18,5	18,1		0,8
611	2388	2669	52	51	18,7	19,7	19		0,7
612	6129	3934	82	55	23,8	20,7	26,1		0,6
613	2710	2356	60	44	21,1	23,0	23,9		1,0
614	3087	2502	59	42	21,3	19,9	21,3		0,8
615	2395	1900	61	46	13,7	14,7		15,9	0,8
616	6296	4753	124	88	22,2	20,1		23,8	0,5
617	1701	1720	57	58	12,9	13,5	13,5		0,8
618	1966	2811	58	69	15,8	18,6		16,5	0,6
619	1936	2612	44	64	18,5	20,0	18,3		0,8
620	3161	2645	70	57	17,2	15,4		16,7	0,6
621	4817	6782	95	159	25,1	25,9		21,1	0,3
622	2626	1421	72	40	16,1	16,6	19,5		1,2
623	2373	2604	71	57	16,7	16,7	16,1		0,6
624	4805	6877	98	132	25,1	22,6		17,6	0,3
625	1260	926	30	23	19,1	20,2		21,0	2,2
626	2655	2327	89	69	14,2	14,4	15,2		0,6
627	2206	1444	43	32	16,2	17,6	19,5		1,2
628	1442	1446	28	21	21,8	17,0	17		1,2
629	1422	2560	29	52	20,1	19,5		16,7	0,7
630	1703	1485	38	36	17,3	18,5	19		1,2
701	2402	1819	39	28	26,1	26,1		27,5	1,4
702	4588	3500	67	53	29,0	25,8		28,4	0,7
703	2853	2717	58	49	26,1	23,7	24,1		0,9
704	5245	4498	111	111	26,1	16,1		18,0	0,4
705	1714	1667	30	16	26,1	23,5		23,6	1,4
706	4866	3904	63	50	29,0	29,2	31,6		0,8

Pat. Nr.	TBIS		spec TBIS		Fe _{trsf}		TBIE12		kel 12 [%/d]
	U [mg Fe]		[mg Fe/kg] >120		[mg/d]		[mg/d]		
	basal	nach 1 J			basal	nach 1 J	DFO	DFO/ DFP	
707	2013	3499	26	51	26,1	27,6	23,7		0,8
708	4829	3073	93	54	23,2	20,5	24,8		0,7
709	2261	1622	32	22	29,0	32,0	33,5		2,0
710	4316	3553	67	64	29,0	24,2	26,2		0,7
711	2880	2227	37	30	34,8	28,2		29,8	1,3
712	4159	4067	70	71	31,9	29,0		29,3	0,7
713	7538	4264	123	81	26,1	20,6		29,1	0,5
714	4318	2725	92	57	29,0	17,8	22		0,7
715	2908	4799	42	74	34,8	38,6		33,7	0,8
716	3336	2957	57	45	29,0	25,7	26,7		0,9
717	4241	3267	61	46	31,9	28,9		31,5	0,9

8 Danksagung

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Roland Fischer für die durchgängige außerordentliche Unterstützung mit engagierten Diskussionen und Ideen als auch seinem Durchhaltevermögen bedanken.

Bei einer sehr guten Arbeitsatmosphäre konnte ich bei Problemen stets mit der Hilfe aller Mitarbeiter des Instituts der medizinischen Biochemie rechnen, was ich sehr geschätzt habe. In die kleinen Tricks der NTBI Messung an der AAS führte mich Frau Rosemarie Kongi geduldig ein und half mir die labortechnischen Hürden zu nehmen. Auch Herr Dr. Rainer Engelhardt, Herr Dr. Peter Nielsen und Frau Susanne Hoppe standen mir bei Fragen bereitwillig jeder Zeit zur Seite.

Für die Unterstützung und Zusammenarbeit in der Kinderhämatologischen Ambulanz möchte ich mich bei allen Patienten sowie bei Frau Prof. Janka und Herrn Dr. Matthias Dürken bedanken.

Especially I like to thank Prof. R. C. Hider (King's College London) for introduction in the methods of quantification of Non-Transferrin Bound Iron (NTBI) in the presence of unsaturated transferrin.

I like to thank all patients and the people in the hospitals of Cagliari, Catania, Torino and Athens, who had taken part in the studies. Special thanks to Prof. A. Piga (Ospedale Infantile Regina Margherita, Torino), Prof. R. Galanello (Ospedale Regionale Microcitemie, Cagliari) and Dr. A. Kattamis ("Aghia Sophia" Children's Hospital, Athen). Especially I would like to thank Drs. C. Magnano, V. Caruso (Ospedale Garibaldi, Catania) for cooperation and support presenting NTBI kinetics on the 11 th ICOC in Catania.

9 Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Ulrike Lund
Adresse: Alt-Moabit 19, 10559 Berlin
e-mail: u.lund @ gmx.de
Geburtsdatum und –ort: 03.06.1975 in Rostock

Schulausbildung

1982 - 1986 Grundschule in Rostock
1987 - 1995 Gymnasium in Henstedt-Ulzburg und Kaltenkirchen

Studium

1995 - 1996 Medizinstudium (HU Berlin)
1996 - 1997 Zahnmedizinstudium (Universität Hamburg)
1997 - 2002 Medizinstudium (Universität Hamburg)
09/1998 Physikum
03/2000 1. Staatsexamen
09/2001 2. Staatsexamen
10/2001 - 10/2002 Praktisches Jahr:
Chirurgie (AK Barmbek Hamburg), Innere Medizin
(Kantonsspital Münsterlingen, Schweiz), Pädiatrie (Somerset
Hospital, Kapstadt, Südafrika; UKE Hamburg)
10/2002 3. Staatsexamen

Beruflicher Werdegang:

01/2003 – 07/2004 Ärztin im Praktikum in der Neurologie,
Vivantes Klinikum im Friedrichshain, Berlin
08/2004 Approbation als Ärztin
10/2004 - 05/2005 Assistenzärztin in der Anästhesie;
Humaine Klinikum Bad Saarow
seit 06/2005 Assistenzärztin in der Inneren;
Humaine Klinikum Bad Saarow