

Aus der Kinderklinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. K. Ullrich

**Behandlung der Frühgeborenenanämie mit rh-Erythropoietin
und hochdosierter Eisensubstitution unter klinischer Prüfung der
Entstehung von toxischem, freiem Eisen im Plasma**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Daniela Kürzel

aus Flensburg

Hamburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 24.10.2006

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. H. H. Hellwege

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. P. Nielsen

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. C. Wagener

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1. Abkürzungen.....	4
2. Einleitung	6
2.1. <i>Die Anämie bei Frühgeborenen</i>	<i>6</i>
2.2. <i>Ursachen der Frühgeborenenanämie.....</i>	<i>6</i>
2.3. <i>Symptome und Folgen der Anämie</i>	<i>7</i>
2.4. <i>Therapieansätze.....</i>	<i>7</i>
2.5. <i>Erythropoietin.....</i>	<i>8</i>
2.5.1. <i>Historisches</i>	<i>8</i>
2.5.2. <i>Physiologie von Erythropoietin</i>	<i>9</i>
2.5.2.1. <i>Ort der Entstehung.....</i>	<i>9</i>
2.5.2.2. <i>Wirkung von Erythropoietin.....</i>	<i>10</i>
2.5.2.3. <i>Regelkreis der Erythropoese.....</i>	<i>11</i>
2.5.2.4. <i>Verabreichungsformen</i>	<i>11</i>
2.5.2.5. <i>Elimination von Erythropoietin</i>	<i>12</i>
2.6. <i>Die klinische Anwendung von rh-Erythropoietin</i>	<i>12</i>
2.7. <i>Nebenwirkungen der rh-EPO-Therapie</i>	<i>13</i>
2.8. <i>Supplementierungen unter rh-EPO-Therapie</i>	<i>14</i>
2.9. <i>Eisensubstitution.....</i>	<i>14</i>
2.9.1. <i>Physiologie des Eisenstoffwechsels</i>	<i>14</i>
2.9.2. <i>Dosierung unter Therapie mit rh-EPO</i>	<i>15</i>
2.9.3. <i>Verabreichungsform</i>	<i>16</i>
2.9.4. <i>Nebenwirkungen.....</i>	<i>17</i>
2.10. <i>Oxidantien und Antioxidantien.....</i>	<i>18</i>
2.10.1. <i>Toxische Sauerstoffmetabolite</i>	<i>18</i>
2.10.2. <i>Non-Transferrin-Bound-Iron (NTBI).....</i>	<i>19</i>
2.10.3. <i>Rolle von Malondialdehyd und Cholesterin.....</i>	<i>20</i>
2.10.4. <i>Totale antioxidative Kapazität und Radikalresistenz</i>	<i>20</i>
2.11. <i>Zinkprotoporphyrin</i>	<i>21</i>
2.12. <i>Fragestellung.....</i>	<i>22</i>
3. Patienten	23
3.1. <i>Patientenkollektiv</i>	<i>23</i>
3.1.1. <i>Einschlusskriterien</i>	<i>23</i>
3.1.2. <i>Patientendaten.....</i>	<i>24</i>
3.1.3. <i>Dosierung und Darreichungsform von rh-Erythropoietin</i>	<i>26</i>
3.1.4. <i>Supplementierungen</i>	<i>26</i>
4. Material und Methoden	27

4.1. Blutuntersuchungen.....	27
4.2. Bestimmungsmethoden	28
4.2.1. Probenaufbereitung.....	28
4.2.1.1. Material.....	28
4.2.1.2. Methode	28
4.2.2. ABAP-Hämolysetest – Mikromethode.....	31
4.2.2.1. Material.....	31
4.2.2.2. Methode	31
4.2.3. TRAP-Messung	35
4.2.3.1. Material.....	35
4.2.3.2. Methode	35
4.2.4. Bestimmung von Malondialdehyd	39
4.2.4.1. Material.....	39
4.2.4.2. Methode	39
4.2.5. Enzymatische Cholesterinbestimmung	43
4.2.5.1. Material.....	43
4.2.5.2. Methode	43
4.2.6. Photometrische Messung der Zinkprotoporphyrinkonzentration im Plasma	45
4.2.6.1. Material.....	45
4.2.6.2. Methode	45
4.4. Datenverarbeitung und Statistik.....	47
5. Ergebnisse.....	48
5.1. Ansprechen auf rh-Erythropoietin.....	48
5.1.1. Definition vom Therapieerfolg – bzw. Versagen	48
5.1.2. Vergleich demographischer Daten	48
5.1.3. Hb-Verlauf.....	49
5.1.4. Hb bei Therapiebeginn und bei Entlassung.....	51
5.1.5. Hb-Verlauf im Vergleich mit früherer EPO-Studie	53
5.1.6. Retikulozyten.....	54
5.1.7. Erythropoietinspiegel im Blut	56
5.1.8. Verträglichkeit des rh-Epo.....	56
5.2. Eisenstoffwechsel.....	56
5.2.1. Verlauf des Serumeisens unter Therapie	56
5.2.2. Eisensubstitution unter Therapie	58
5.2.3. Verträglichkeit von prophylaktischer Eisensubstitution.....	58
5.2.4. Ferritin	59
5.2.5. Zinkprotoporphyrin	60
5.3. Wachstumsanalyse.....	62
5.3.1. Gewichtszunahme pro Tag	62
5.4. Serumchemie.....	63
5.4.1. Bilirubin.....	63
5.4.2. Leukozyten	64
5.4.3. Thrombozyten.....	65
5.5. Auftreten von oxidativem Stress	67
5.5.1. TRAP	67

5.5.2. Malondialdehyd	67
5.5.3. Cholesterin.....	68
5.5.4. Radikalresistenz.....	69
5.5.5. Non-Transferrin-Bound-Iron (NTBI).....	70
5.6. <i>Transfusionen während der Therapie</i>	72
5.7. <i>Infektionen während der Therapie</i>	73
5.8. <i>Zusammenhänge zwischen Therapieversagen und Verlaufsparemtern</i>	74
6. Diskussion.....	75
7. Zusammenfassung	89
8. Literaturverzeichnis	90
9. Danksagung	98
10. Lebenslauf	99

1. Abkürzungen

ABAP	2,2-Azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride
ATP	Adenosintriphosphat
BHT	2,6-di-tert-butyl-p-cresol
C	Celcius
CPAP	continous positive airway pressure
CRP	C-reaktives Protein
dest	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTPA	Diethylenetriaminepentaaceticacid
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EPO	Erythropoietin
Fe ^{2+/3+}	zweiwertiges/dreiwertiges Eisen
Fgb	Frühgeborene
g	Gramm
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hb	Hämoglobin
HIV	engl.: human immunodeficiency virus
HPLC	engl.: High-Performance Liquid Chromatography
IE	internationale Einheit
kg	Kilogramm
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinucleotid-(phosphat)
nm	Nanometer
NTBI	engl: non-transferrin-bound-iron
O ₂	Sauerstoff
OH	Hydroxylgruppe
p	statistischer Fehler

PBS	Phosphate buffered saline
pO ₂	Sauerstoffpartialstoff
rh	rekombinant human
sec	Sekunde
SH	Sulhydrylgruppe
SIDS	engl.: sudden infant death syndrom
SSW	Schwangerschaftswoche
Std	Stunde
TEP	1,1,3,3-Tetraethoxypropane
TRAP	engl.: total-radical-trapping-antioxidant-parameter
U/kg	Units pro Kilogramm
U/l	Units pro Liter
U/min	Umdrehung pro Minute
UKE	Universitäts-Krankenhaus-Eppendorf
ZPP	Zinkprotoporphyrin
μl	Mikroliter

2. Einleitung

2.1. Die Anämie bei Frühgeborenen

Zum Zeitpunkt der Geburt unterliegt der Foet einer Reihe von Umstellungsvorgängen in der Erythropoese.

Reife Neugeborene entwickeln in Adaptation an das extrauterine Leben in den ersten zwei bis drei Lebensmonaten einen „physiologischen Tiefpunkt“ ihrer Hämoglobinkonzentration im Blut. Zwischen dem vierten und sechsten Lebensmonat scheinen die perinatalen Adaptationsvorgänge überwunden zu sein. Es lassen sich steigende Erythropoietinspiegel mit daraufhin wieder zunehmenden Hämoglobinkonzentrationen nachweisen (41).

Frühgeborene zeigen einen Hämoglobin- und Hämatokritkonzentrationsabfall unmittelbar nach der Geburt. Bei ihnen geschieht dieser Abfall schneller und in größerem Ausmaß (75). Hierbei korreliert das Ausmaß der Anämie mit dem Grad der Frühreife (10). Anämische Frühgeborene zeigen im Vergleich zu Erwachsenen in Abhängigkeit vom Grad der Anämie signifikant niedrigere Erythropoietinwerte (67).

Es handelt sich bei dieser Anämieform um eine normozytäre, normochrome Anämie. Hierbei finden sich geringe Retikulozytenzahlen und ein Hämatokrit zwischen 20 – 30%.

Die Frühgeborenenanämie ist gekennzeichnet durch eine geminderte erythropoetische Knochenmarkaktivität, refraktäres Verhalten gegenüber Eisen-, Folsäure- und Vitamin E-Ersatz und geringen endogenen EPO-Konzentrationen.

Es mangelt den Frühgeborenen jedoch nicht an Vorläuferzellen der roten Reihe. Diese sind in der Regel hoch empfindlich gegenüber exogen verabreichtem EPO.

2.2. Ursachen der Frühgeborenenanämie

Zu den Ursachen der Frühgeborenenanämie zählen Maier und Obladen 1995 sowohl hämorrhagische als auch hyporegenerative Faktoren (50).

Während in den ersten Lebenswochen die hämorrhagische Komponente durch perinatale Blutungen und diagnostisch bedingte Blutentnahmen im Vordergrund zu stehen scheint, dominieren die weiteren Lebenswochen eine reduzierte Retikulozytenzahl und niedrige Erythropoietin-Spiegel im Serum (83).

Faktoren, die zur Frühgeborenenanämie beitragen, sind die signifikanten Veränderungen der arteriellen Sauerstoffspannung bei Umstellung von plazentarer auf pulmonale Oxygenierung, ein verzögerter Wechsel des Sauerstoffsensors und des Erythropoietin-Syntheseortes von der Leber zur Niere sowie ein vermindertes Ansprechen der Erythropoietin-Produktion auf hypoxische Stimuli. Anzuführen wären außerdem ein niedriger Ausgangshämatokrit, ein beschleunigter Abbau fetaler Erythrozyten sowie Hämodilution durch rasches Wachstum mit einer Zunahme des Kreislaufvolumens (50).

2.3. Symptome und Folgen der Anämie

Aufgrund der oben aufgeführten Ursachen, die zur Frühgeborenenanämie führen, kann es zur Entwicklung einer chronischen Hypoxie und der Ausbildung einer metabolischen Azidose kommen. Als Folge der Sauerstoffunterversorgung können eine mesenteriale Hypoperfusion sowie eine Aggravierung einer bronchopulmonalen Dysplasie oder eines persistierenden Ductus arteriosus resultieren (50).

Die Kinder leiden häufig unter Gedeihstörungen, Apnoephasen sowie unter Brady- oder Tachykardien.

2.4. Therapieansätze

Zur Behandlung der Frühgeborenenanämie werden Erythrozytentransfusionen eingesetzt.

Laut Strauss erhält ein beatmetes Kind unter 1000 g in den ersten Lebenswochen jeden 2. bis 3. Tag eine Transfusion (92). Insgesamt benötigen 70-80% der Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1000 g eine oder mehrere Transfusionen (86).

Indikation für eine Transfusion sind entweder kumulative diagnostische Blutverluste von 5-10% des geschätzten Blutvolumens, das Auftreten von Anämiesymptomen oder das Absinken des Hämatokrit. Die Definitionen von Anämiesymptomen und transfusionspflichtigem Hämatokrit sind jedoch uneinheitlich und werden von Lebensalter und Atemfunktion abhängig gemacht (49).

Da die Anämie nie vollständig durch Bluttransfusionen korrigiert wird, können die Symptome einer Anämie nur teilweise beseitigt werden. Polytransfusionen beinhalten zudem die Gefahr

der Entstehung einer Häm siderose. Da noch immer die Gefahr von virusinduzierten Hepatiden und anderen Infektionen, inklusive HIV, besteht, sind Transfusionen außerdem mit einem hohen Risiko vergesellschaftet.

Auch die Sensibilisierung gegen Histokompatibilitätsantigene stellt eine unerwünschte Nebenwirkung dar.

Eine besondere Rolle spielt auch die Unterdrückung der endogenen Erythropoietin-Produktion.

Mit der Herstellung großer Mengen humanen rekombinanten Erythropoietins konnte eine effiziente Behandlung der Frühgeborenenanämie gefunden werden.

Eine Metaanalyse von acht randomisierten kontrollierten Studien zeigt trotz unterschiedlicher Studiendesigns und der unterschiedlichen rhEPO-Dosis, dass 18% weniger Kinder transfundiert werden mussten (50). Auch eine Metaanalyse von Vamvakas und Strauss zeigte eine Reduktion von Bluttransfusionen unter rhEPO-Therapie in 4 hochqualitativen Studien (96).

2.5. Erythropoietin

2.5.1. Historisches

1863 entdeckte der französische Chirurg Joudanet (39), dass bei Patienten aus dem mexikanischen Hochland eine höhere Blutviskosität bestand als bei Patienten aus Frankreich. Er stellte dies als eine Anpassungsstörung an das Höhenklima dar.

1906 vermuteten Carnot und Deflandre (15), dass eine humorale Substanz, die sie als „Hämo poetin“ bezeichneten, die Erythropoese beeinflusst. Der Begriff Erythropoietin wurde erst später von Bonsdorf und Jalavisto (9) geprägt.

1950 belegte Reismann das Vorhandensein eines humoralen Faktors zur Regulation der Erythropoese (77). Er hatte entdeckt, dass bei parabiotischen Ratten nur eine hypoxisch werden musste, um bei beiden zu einer Erhöhung des Hämatokrits und der Retikulozytenzahl zu führen.

1957 gelang es Jacobson und Goldwasser (37) in Versuchen mit anephrischen Tieren nachzuweisen, dass Erythropoietin in der Niere gebildet und durch Hypoxie stimuliert wird.

1977 wurde Erythropoietin erstmals aus dem Urin von Patienten mit aplastischer Anämie isoliert (57).

1979 konnte ein Radioimmunoassay für EPO entwickelt werden (28).

1984 erbrachte Eschbach den endgültigen Beweis der Bedeutung von Erythropoietin, als er die Anämie eines urämischen Schafes mit erythropoietinreichem Plasma korrigierte (22).

1985 gelang es Jacobs und Lin unabhängig voneinander, den genetischen Code von menschlichem Erythropoietin zu entschlüsseln, das Erythropoietin-Gen zu klonen und damit den Weg zur gentechnischen Herstellung zu öffnen (36, 48).

1990 führten Halperin und andere die erste Pilotstudie zur Behandlung der Frühgeborenenanämie mit rh-EPO durch (34).

2.5.2. Physiologie von Erythropoietin

2.5.2.1. Ort der Entstehung

Der Hauptbildungsort für Erythropoietin liegt in der Fetalzeit und beim Neugeborenen in der Leber. Hier wird während der Fetalzeit über einen Sauerstoffsensor in Abhängigkeit vom placentaren Sauerstoffpartialdruck die Erythropoietinsynthese reguliert (67).

Zum Zeitpunkt der Geburt wechseln Sauerstoffsensor und Erythropoietin-Syntheseort von der Leber zur Niere (101). Es ist bislang noch unklar, welche Faktoren den Wechsel bedingen.

Lacombe et al. identifizierten peritubuläre Fibroblasten in der adulten Niere als Hauptsyntheseort für Erythropoietin (46). Neben der Niere werden geringe Mengen an Erythropoietin in der Leber, der Milz und in Makrophagen produziert, die allerdings erst bei einem Ausfall der Nierenfunktion bedeutsam werden (23).

2.5.2.2. Wirkung von Erythropoietin

Der Erythrozytenpool unterliegt, bei einer Lebenszeit von 120 Tagen, einer ständigen Neubildung. Erythropoietin bewirkt sowohl in der Leber als auch ab der zweiten Hälfte der Schwangerschaft im Knochenmark die Stimulation der Erythropoese.

Ausgangszelle für die Proliferation und Differenzierung der einzelnen Blutzelllinien ist die pluripotente Stammzelle. Zuerst teilt sie sich in lymphoide Vorläuferzellen und in CFU-S (Colony Forming Unit-Spleen). Aus der CFU-Zelle (Progenitorzelle) entsteht entweder die Megakaryozytenreihe, die weiße oder die rote Blutzellreihe. Gesteuert werden diese einzelnen Differenzierungsschritte von Zytokinen (16).

Erythropoietin nimmt in der roten Zellreihe die Funktion eines Steuermoleküls ein. Die wesentliche Wirkung besteht hierbei in der Vergrößerung des Pools der erythroiden Progenitorzellen. Die CFU-S differenziert in der roten Zellreihe über die BFU-E (Burst Forming Units-Erythroid) oder die CFU-E (Colony Forming Units-Erythroid) zu Erythroblasten und Retikulozyten und schließlich zum Erythrozyten.

Die BFU-E Zellen werden durch Erythropoietin zur Proliferation angeregt. Des Weiteren werden die empfindlicheren CFU-E Zellen zu weiteren Differenzierungsprozessen stimuliert (38, 88). CFU-E Zellen gelten als der primäre Angriffspunkt von Erythropoietin. Untersuchungen von Krantz sprechen für einen spezifischen Rezeptor auf diesen Zellen (43).

Eine Studie von Goldwasser konnte zeigen, dass sowohl Erythroblasten als auch Retikulozyten bezüglich ihrer Reifung und Differenzierung nicht erythropoietinabhängig sind. Es bestehen jedoch auch hier gewisse stimulierende Einflüsse, wie z.B. auf die Hämoglobinisierung (30).

In der Fetalzeit werden Erythrozyten mit fetalem Hämoglobin und hoher Sauerstoffaffinität gebildet. Postpartal wird statt des fetalen Hämoglobins zunehmend das adulte Hämoglobin mit niedrigerer Sauerstoffaffinität gebildet.

Diese aufeinander abgestimmten Umstellungsvorgänge scheinen genetisch determiniert zu sein und mehr vom postkonzeptionellen als vom postnatalen Alter abzuhängen (24, 90).

Gemeinsam ist der fetalen und adulten Erythropoese ihre Sauerstoffabhängigkeit.

Eine Wirkung des Erythropoietins nach Applikation lässt sich nach ca. 2-3 Tagen an einem Retikulozytenanstieg und nach ungefähr einer Woche an einem Hämatokrit- bzw. Hämoglobinanstieg beobachten (20).

Obwohl Erythropoietin der entscheidende Faktor in der Kaskade der Erythropoese ist, benötigt er für seine Wirkung die Anwesenheit anderer Wachstumsfaktoren wie Interleukin-3 bzw. Co-Faktoren wie Eisen, Folsäure und Vitamin B12.

2.5.2.3. Regelkreis der Erythropoese

Die Erythropoese unterliegt einem komplexen Regelkreis, der durch negative Rückkopplung gesteuert wird. Auf eine registrierte Abweichung vom Sollwert erfolgt eine Antwort, die die Differenz zwischen Messwert und Sollwert verkleinert und damit das System stabilisiert (45). Der stärkste Stimulus für den Sensor der Erythropoietinsynthese ist die Hypoxie. Der Plasmaspiegel des Hormons kann von Normalwerten um 5-20 U/l bei schwerer Anämie oder Hypoxie auf 1000 U/l oder mehr ansteigen. In der Niere werden im venösen Schenkel der Mikrozirkulation sauerstoffsensitive Zellen vermutet, die Differenzen zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf registrieren und an die Synthesezellen weitervermitteln. Der Sauerstoffgehalt des Blutes wird sowohl von der O₂-tragenden Kapazität als auch vom Sauerstoffpartialdruck bestimmt. Des Weiteren hängt der pO₂ von der O₂-Affinität und vom Ausmaß des Blutflusses ab (70).

2.5.2.4. Verabreichungsformen

Rh-EPO lässt sich subkutan, intravenös und intraperitoneal applizieren. Hierbei stellten sich jedoch in zahlreichen Untersuchungen an Erwachsenen erhebliche pharmakokinetische Unterschiede dar (40, 44, 54, 60, 81). So lässt sich bei subkutaner Gabe von rh-EPO, verglichen mit der intravenösen Verabreichung, eine verminderte Resorption und ein zeitlich verzögertes Erreichen der maximalen Serumkonzentration feststellen. Nach subkutaner Gabe von EPO zeigen die Plasmaspiegel nur einen langsamen Anstieg der Erythropoietinkonzentration und erreichen ihr Maximum nach 12-24 Stunden.

Bei subkutaner Gabe liegen die Serumspiegel nach 24 Stunden jedoch höher als bei intravenöser Gabe und bei mehrfacher Applikation findet eine Kumulation mit anschließender Pla-

teaubildung statt (13, 40). Der Konzentrationsabfall verläuft sehr protrahiert, da der Elimination die ständige Mobilisierung aus dem subkutanen Depot entgegengesetzt wird (7).

Im Vergleich zur intravenösen Applikation scheint bei der subkutanen Gabe eine um 50% erniedrigte Erhaltungsdosis erforderlich zu sein (8).

Die wenigen verfügbaren pharmakokinetischen Untersuchungen an Frühgeborenen zeigten nach subkutaner Injektion eine variable Resorption, jedoch eine mit 42% recht hohe Bioverfügbarkeit (11).

2.5.2.5. Elimination von Erythropoietin

Rh-Epo wird durch hepatische Metabolisierung (18), durch Aufnahme in das Knochenmark (89) und in sehr geringen Maßen durch renale Ausscheidung entfernt.

Die Plasmahalbwertszeit für rh-Erythropoietin scheint nach mehrfacher intravenöser Anwendung abzufallen. In einer Untersuchung von Egrie betrug die mittlere Halbwertszeit zu Beginn der Therapie 9,3 Stunden und nach sieben Applikationen nur noch 6,2 Stunden (19).

2.6. Die klinische Anwendung von rh-Erythropoietin

1986 wurden erstmals Dialysepatienten mit rh-Epo behandelt. Bei nahezu allen Patienten konnte die renale Anämie korrigiert werden.

Seit 1990 wurden weltweit Frühgeborene im Rahmen kontrollierter Studien mit rh-Erythropoietin behandelt. Die Studien unterschieden sich erheblich hinsichtlich Population, rh-EPO-Dosis, Dosisintervall, Applikation, Behandlungsdauer, Behandlungsbeginn, Eisen- und Folsäuresubstitutionen sowie Transfusionsindikationen.

Die Pilotstudie zur Behandlung der Frühgeborenenanämie wurde am 21. Lebenstag begonnen und orientierte sich mit Dosen von 75 – 300 IU/kg/Woche an der Behandlung der renalen Anämie (34). Hierbei ließ sich ein leichter Hämatokritanstieg verzeichnen.

Die erste Plazebo-kontrollierte Studie mit intravenös applizierten EPO-Dosen von 400 U/kg/Woche über sechs Wochen führte in der Erythropoietingruppe zu höheren Retikulozytenzahlen und einer geringeren Transfusionsmenge (83).

Mit der Schlussfolgerung einer zu geringen EPO-Dosierung wurden die folgenden Studien mit höher dosiertem Erythropoietin zur Verhinderung der Anämie der Frühgeborenen durchgeführt (86). Carnielli et al. behandelten die Frühgeborenen mit 1200 U/kg/Woche in 3 Einzeldosen, kombiniert mit einer einmaligen Eisengabe von 20 mg/kg/Woche. Hierunter kam es zu einem signifikanten Retikulozytenanstieg und weniger Transfusionen (14).

Um den Transfusionsbedarf zu verringern, waren Dosen von 300-1200 IE/kg/Woche erforderlich (3, 55, 87).

Verantwortlich für die im Vergleich zu Erwachsenen bis zu 10-fach höhere Dosis scheint die besondere Pharmakokinetik bei Frühgeborenen zu sein: Bei fetalen Lämmern ist das Verteilungsvolumen für Erythropoietin größer und die Elimination schneller als bei erwachsenen Artgenossen (99).

Ohls et al. zeigten 1995, dass ein Beginn der rh-EPO-Therapie bei sehr kleinen Frühgeborenen (750-1500 g Geburtsgewicht) innerhalb der ersten zwei Lebenswochen zu weniger Transfusionen und einer insgesamt kostengünstigeren Therapie führt (66).

Die besten Therapieerfolge erzielten bislang männliche Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht von 1200 g oder mehr und einem Anfangshämatokrit von 48% und mehr (49).

Bisher am wenigsten von der rh-EPO-Therapie profitierten sehr kleine (<1250 g und < 31 SSW) und sehr kranke Frühgeborene (76).

2.7. Nebenwirkungen der rh-EPO-Therapie

In keiner der bislang durchgeführten Studien bei Frühgeborenen traten Nebenwirkungen auf, die eindeutig auf den Einsatz von rh-Erythropoietin zurückzuführen waren. Insbesondere wurden keine arteriellen Hypertonien oder Thrombosen, wie bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz, beobachtet.

Vereinzelt wurde ein flüchtiges Erythem oder eine transiente Induration der Injektionsstellen beschrieben. Emmerson et al. berichteten von zwei SIDS-Fällen bei insgesamt 16 Patienten und brachen daraufhin die Studie ab (21). Meyer et al. berichteten von einem SIDS-Fall bei insgesamt 40 Patienten (55).

In der 1. europäischen Multicenterstudie wurde kein SIDS-Fall bekannt. In der 2. europäischen Multicenterstudie wurden unter 241 Frühgeborenen drei Kinder mit SIDS registriert.

Ein Kind war sechs Wochen mit Erythropoietin behandelt worden, das zweite hatte eine einmalige Dosis erhalten und ein weiteres Kind stammte aus der Kontrollgruppe.

2.8. Supplementierungen unter rh-EPO-Therapie

Unter der Therapie mit rekombinant hergestelltem Erythropoietin werden zusätzlich Eisen, Vitamin E sowie Proteine gegeben.

Ohne ausreichend aufgefüllte Eisenspeicher ist die Behandlung mit rh-EPO nicht wirksam, da sich die Eisenspeicher schnell leeren (Einzelheiten siehe unten).

Da unter einer Supplementierungstherapie mit Eisen das Risiko einer Oxidation der mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Zellmembran besteht, sollte Vitamin E als antioxidierende Substanz verabreicht werden.

Wie Eisen sind Proteine eine wichtige Voraussetzung für eine effiziente Erythropoese. Brown et al. zeigten in einer Studie, dass eine erhöhte Proteinzufuhr zwischen 3,1 und 3,5 g/kg/Tag unter rh-EPO zu einer signifikant höheren Retikulozytenzahl führt. Des Weiteren ließ sich eine verbesserte tägliche Gewichtszunahme bei einer Proteinzufuhr von 3,5 g/kg/Tag feststellen (12).

2.9. Eisensubstitution

2.9.1. Physiologie des Eisenstoffwechsels

Die Eisenresorption des Organismus ist wegen der physikochemischen und physiologischen Eigenschaften der Eisen-Ionen limitiert.

In der Mucosa des oberen Dünndarms existiert ein Transportsystem für Eisen, das die Resorption an den Bedarf anpasst. Eisen wird im Duodenum und oberen Jejunum hauptsächlich als Fe^{2+} resorbiert. Da Nahrungseisen jedoch überwiegend in der dreiwertigen Form vorliegt, muss es, zunächst, z.B. durch Ascorbinsäure, reduziert werden. Im Normalfall werden ca. 10% des Nahrungseisens pro Tag aufgenommen. Im Eisenmangel kann die Bioverfügbarkeit des Eisens jedoch bedarfsgerecht eingestellt werden und die Resorptionsquote auf 50% und mehr gesteigert werden.

Vor dem Übertritt des Eisens aus der Mukosazelle ins Plasma werden die Fe^{2+} -Ionen zu Fe^{3+} -Ionen oxidiert. Im Portalblut wird es dann vom Plasma-Transferrin gebunden und an die Stellen des Bedarfs weitergeleitet. Normalerweise wird die Bindungskapazität des Transferrins nur zu 30% ausgenutzt. Bei voller Sättigung kann das gesamte Plasma-Transferrin maximal 12 mg Eisen aufnehmen.

Wegen der sehr beschränkten Eisenresorptionskapazität kann der durchschnittliche Eisenbedarf nur durch äußerst ökonomische Wiederverwertung von Funktionseisen gedeckt werden. Die Speicherung geschieht in Form von Ferritin. Prinzipiell ist jede Zelle befähigt, ein Überangebot an Eisen durch Synthese von Ferritin aufzunehmen. Die Serumferritinkonzentration spiegelt den Füllungszustand der Gesamtkörpereisenspeicher korrekt wider.

Ungefähr 70% des Gesamtkörpereisens sind im Hämoglobin der Erythrozyten gebunden.

Am Ende der Lebenszeit werden Erythrozyten durch Makrophagen des Retikuloendothelialen Systems (RES) phagozytiert. Nach Oxidation des Hb-Eisens und Dissoziation des Met-Hb in Hämin und Globin, wird das Eisen aus Hämin freigesetzt. Es bildet die Hauptquelle für das Plasmaeisen und für den Eisenbedarf in den Hb-bildenden Zellen.

2.9.2. Dosierung unter Therapie mit rh-EPO

Trotz einer großen Zahl an klinischen Studien ist die Substitution des Eisens unter rh-Erythropoietintherapie ein Problem.

Frühgeborene haben bei Geburt nur geringe Eisenspeicher. Eine suffiziente Erythropoese ist jedoch nur bei ausreichender Verfügung von Eisen möglich. Unter Erythropoietingabe konnte man beobachten, dass es zu einem Abfall der Ferritinkonzentration im Serum kommt. Es wurde Eisen für die gesteigerte Erythropoese mobilisiert, die Speicher aber nur ungenügend wieder aufgefüllt (21, 34, 49, 55, 87).

Ziel ist es, sowohl den Eisenmangel als auch eine Überdosierung zu vermeiden.

Maier et al. unterstreichen die Wichtigkeit einer möglichst hohen Eisensubstitutionsdosis bei Frühgeborenen (51). Somit würde die Erythropoese gesteigert und die Transfusionsbedürftigkeit gesenkt. Eine zu geringe Eisenzufuhr hingegen kann die Wirksamkeit von rh-EPO kassieren.

Eine Überdosierung an Eisen kann zu einer Blockade von Carrier-Enzymen führen, sowie oxidativen Streß induzieren (52).

Frühere Studien stellten die Hypothese auf, dass das Vorhandensein von hypochromen Erythrozyten ein frühes Zeichen eines Eisenmangels darstellt.

Meyer et al. zeigten 1996, dass es sowohl bei oraler Eisengabe von 12 mg/kg/Tag als auch bei intravenöser Gabe von 6 mg/kg/Tag neben einer zu gleichen Maßen gesteigerten Erythropoese auch zu einem Anstieg der hypochromen Erythrozyten kam. Der Anstieg unter oraler Supplementierung war jedoch signifikant höher als unter intravenöser Eisengabe (56).

Eine Studie von Bechensteen et al. zeigte, dass es unter einer Therapie mit 150-300 IE/kg/Woche rh-Erythropoietin und einer oralen Eisenzufuhr von 18-36 mg täglich ebenfalls zu einer Zunahme an hypochromen Erythrozyten bei sinkenden Ferritinwerten kam (4).

Auch Bader et al. kamen in ihrer Untersuchung zu dem Schluss, dass die doppelte Menge an oral zugeführtem Eisen nicht zu einer wesentlichen Steigerung der Erythropoese führt. Hierbei wurden den Frühgeborenen entweder 8 oder 16 mg/kg/Tag verabreicht (2).

2.9.3. Verabreichungsform

Aufgrund möglicher Nebenwirkungen nach intravenöser Eisensubstitution verabreichte man in zahlreichen Studien den Frühgeborenen zunächst Eisen oral, obwohl die Resorption unsicher ist und dessen hohe Osmolarität zu intestinalen Problemen führen kann.

Eine wichtige Rolle bei der Eisenabsorption im Dünndarm und der Eisenmobilisierung in der Leber spielt die Xanthinoxidase. Sie oxidiert das als Fe^{2+} absorbierte Eisen im Dünndarm zu Fe^{3+} , um die spezifische Bindung an Transferrin und somit den Transport zu den entsprechenden Zielzellen zu ermöglichen. Oxidationsmittel bei diesen Reaktionen ist der molekulare Sauerstoff, der zu H_2O_2 reduziert wird (72). Vento et al. spekulieren, dass dieser Mechanismus für die auftretenden entzündlichen Nebenwirkungen von hohen Dosen enteral zugeführten Eisen verantwortlich zu machen ist (97).

Meyer et al. hingegen deklarieren eine intravenöse Eisensubstitution als die effizientere Variante, um diese intestinalen Unsicherheiten und eventuelle abdominelle Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen und Durchfall zu umgehen. Es konnte gezeigt werden, dass die intravenöse Eisengabe von 6 mg/kg/Tag sicher und bei Frühgeborenen ohne enterale Nahrungszufuhr und mit geringen Eisenspeichern indiziert ist. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass die Erythropoese nicht von der Art der Supplementierung abhängt (56).

2.9.4. Nebenwirkungen

Die Unverträglichkeit oraler Eisengaben beinhaltet Sodbrennen, Übelkeit, Blähungen, Verstopfung oder Durchfälle.

Bei der intravenösen Gabe kann es zu Unverträglichkeitsreaktionen unmittelbar während oder nach der Gabe kommen. Beschrieben wurden Sofortreaktionen wie Krankheitsgefühl, Fieber, akute Lymphadenopathie, Gelenkbeschwerden und urtikarielle Ausschläge.

Wird bei einer Überdosierung des Eisens die Bindungskapazität des Plasmatransferrins überschritten, können freie Eisenionen (= Non-Transferrin-Bound-Iron) ihre toxische Wirkung entfalten, indem sie Sauerstoffradikale bilden. Diese sind langfristig in der Lage, eine toxische Leberschädigung, eine Kardiomyopathie sowie Diabetes mellitus zu induzieren (25).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit von Granulozyten und Monozyten zur Phagozytose von Bakterien und deren intrazelluläre Abtötung beeinträchtigt werden kann (74).

Eisenüberladung führt ebenso zu einer vermehrten Oxidation von Lipoproteinen und stellt so einen Risikofaktor für die Atherosklerose dar.

2.10. Oxidantien und Antioxidantien

2.10.1. Toxische Sauerstoffmetabolite

Wenn Immunkomplexe, Zymosan-Komplement-Komplexe oder andere lösliche oder partikuläre Entzündungsreize auf Leukozyten einwirken, antworten diese mit einem spontanen Anstieg des O_2 -Verbrauches und des Glucoseumsatzes. Der in die Zelle aufgenommene Sauerstoff wird zur Produktion von Superoxidanionen (O_2^-) verbraucht. Diese Reaktion wird durch eine membranintegrierte NAD(P)H-Oxidase katalysiert. Das gebildete Anionradikal ist so instabil, dass es spontan zum größten Teil unter Bildung von H_2O_2 dismutiert. Nachfolgend entstehen durch spontane Reaktionen oder Katalyse noch andere reduzierte Abkömmlinge des Sauerstoffs. Die Bildung dieser extrem zytotoxischen Hydroxylradikale wird durch Fe^{3+} -gesättigtes Lactoferrin stark beschleunigt.

Die Angriffspunkte der reaktiven Sauerstoffmetaboliten sind oxidierbare Molekülstrukturen, wie beispielsweise Alkohol- und Aldehydgruppen, SH-Gruppen, Aminogruppen und Lipide. Es ist verständlich, dass die Sauerstoffmetaboliten, je nach Freisetzungsort, unterschiedliche Wirkung hervorrufen können. Auf der einen Seite zeigen sie eine entzündungshemmende und unter Umständen lebensrettende Funktion, indem sie durch einen oxidativen Angriff auf Mikroorganismen eine effektive Infektionsabwehr ausüben. Andererseits haben die Sauerstoffmetaboliten aber auch toxische Wirkungen auf körpereigene Gewebe mit schwerwiegenden Folgen:

1. H_2O_2 führt zu einem ATP-Verlust sowie zu Schädigungen der DNA-Struktur.
2. Zerstörung von Membrantransportsystemen
3. Es kann zu einer tumorauslösenden Wirkung durch Zelltransformation und Aktivierung von Onkogenen kommen.

Man wies nach, dass freie Sauerstoffradikale ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von periventrikulärer Leukomalazie, Retinopathie, nekrotisierender Enterokolitis und der bronchopulmonalen Dysplasie spielen. Frühgeborene mit ihrem unreifen antioxidativem Verteidigungssystem haben ein hohes Risiko, diese Erkrankungen zu entwickeln (52, 94).

2.10.2. Non-Transferrin-Bound-Iron (NTBI)

Eisen ist in der Lage, Elektronen zu binden oder abzugeben. Diese Eigenschaft wird physiologischerweise von Cytochromen und sauerstoffbindenden Molekülen genutzt. Im gesunden Zustand ist freies Eisen nicht nachweisbar.

Ist bei einer Eisenüberdosierung die Plasma-Transferrin-Bindungskapazität überschritten, entsteht nicht gebundenes, freies Eisen (NTBI). Die toxischen Effekte einer Eisenüberladung und damit das Vorliegen freier Eisenionen ergeben sich dabei vor allem aus der Bildung von Sauerstoffradikalen (53) und der damit verbundenen Lipidperoxidation und Enzymdeaktivierungen.

Kommt es im Körper zur Entstehung von Superoxidanionen (O_2^-), und treffen diese auf freie Eisenionen, so entstehen im Sinne der Haber-Weiss-Reaktion starke Oxidationsmittel, wie die reaktionsfreudigen Hydroxylradikale (OH^\bullet). Diese Hydroxylradikale können alle Klassen biologischer Makromoleküle attackieren.

Haber-Weiss-Reaktion:



Wie Gutteridge et al. beschrieben haben, ist die Kapazität von Transferrin und Coeruloplasmin, freies Plasmaeisen zu binden und somit das Auftreten von Hydroxyl-Radikalen zu verhindern, bei Neugeborenen im Vergleich zu Erwachsenen nur sehr gering. Neonaten weisen wesentlich niedrigere Konzentrationen dieser Transportproteine auf. Außerdem kann die nicht vollständig ausreichende Bindungsmöglichkeit in strukturellen und funktionellen Unterschieden begründet liegen (33). Schon kurz nach der Geburt konnte bei Frühgeborenen im Vergleich zu reifgeborenen Kindern ein größerer Anstieg oxidativer Marker bei gleichzeitigem größerem Abfall antioxidativer Schutzmechanismen festgestellt werden (78).

Freies Eisen ist jedoch bei Neugeborenen im ersten Lebensmonat häufig zu finden. Schemmel et al. zeigten in einer Gruppe reifer und unreifer kranker Neugeborenen in 2/3 der Fälle toxisches freies Eisen im Blut (82).

2.10.3. Rolle von Malondialdehyd und Cholesterin

Freies Eisen katalysiert unter anderem die Peroxidation von Lipiden, so dass reaktive Aldehyde, wie das Malondialdehyd, entstehen. Eine kovalente Bindung solcher Lipidaldehyde mit Proteinen kann zu einem zellulären Ungleichgewicht führen.

Der relevante Marker, um Lipidperoxidation in biologischen Systemen nachzuweisen, ist Malondialdehyd (27).

Cholesterin ist ein schnell zu bestimmendes Lipoid und kommt im gesamten menschlichen Organismus frei und in Form von Cholesterinestern vor. Es stellt die Vorstufe der Gallensäuren und der Steroidhormone dar und ist ein wesentlicher Bestandteil des Core der Zellmembran sowie der Myelinscheiden. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass Cholesterin eine wichtige Rolle bei der Förderung eisenabhängiger oxidativer Zerstörung spielt (69). Natoli et al. wiesen nach, dass ein direkter Zusammenhang zwischen einer Hypercholesterinämie und einem erhöhten Leukozyten-vermittelten Auftreten von Hydroxyl-Radikalen besteht (58).

2.10.4. Totale antioxidative Kapazität und Radikalresistenz

Die wichtigsten biologischen Antioxidantien sind Vitamin C, Vitamin E, Harnsäure, Glutathionperoxidase, Katalase, Superoxid-Dismutase, Transferrin und Coeruloplasmin. Auch Bilirubin ist ein potenter Antioxidant im Plasma.

Antioxidantien, die die Rate der Neuproduktion von Radikalen verhindern, nennt man präventive Antioxidantien, wie beispielsweise die Superoxiddismutase und Transferrin.

Antioxidantien, die Radikale binden und dadurch die Kettenreaktion der Oxidation reduzieren, nennt man sekundäre oder kettenbrechende Antioxidantien, wie beispielsweise Vitamin E und C.

Die Bedeutung der einzelnen Antioxidantien in Bezug auf die totale antioxidative Kapazität ist noch unklar. Nichts desto trotz kooperieren sie miteinander. Die totale antioxidative Kapazität ist abhängig von ihrer synergistischen Aktion.

TRAP ist eine Methode, um die totale Kapazität der kettenbrechenden Antioxidantien nachzuweisen (98).

Eine weitere Methode, die antioxidative Kapazität gegen oxidativen Stress auf zellulärer Ebene nachzuweisen, ist die Radikalresistenz. Auf diese Weise kann die Abwehrkapazität von Erythrozyten gegen freie Radikale gemessen werden (6).

2.11. Zinkprotoporphyrin

Der ausreichenden Eisensubstitution kommt besonders während der Erythropoietintherapie große Bedeutung zu. Eine verminderte Eisenverfügbarkeit bei der Hämsynthese führt ersatzweise zu einem vermehrten Einbau von Zink in das Porphyringerüst. Dies ist als vermehrtes Zink-Protoporphyrin in den Erythrozyten messbar.

Zinkprotoporphyrin ist zur Erkennung eines Eisendefizits sowohl bei Normalkollektiv als auch bei Hämodialysepatienten als sensitiver und spezifischer Parameter beschrieben worden (29). Mit Hilfe des Zinkprotoporphyrins kann eine rasche, zuverlässige und preiswerte Einschätzung der Endstrecke des Eisenstoffwechsels erfolgen.

2.12. Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Therapie der Frühgeborenenanämie mit rh-Erythropoietin im UKE untersucht.

Die Frühgeborenen erhielten nach abgeschlossener Intensivbehandlung kontinuierlich Erythropoietin. Therapiebegleitend wurde Eisen in einer Dosierung substituiert, die der 3 – 4 fachen Menge der normalen Prophylaxedosis entspricht.

Hieraus ergaben sich folgende Fragestellungen:

- a) Wie ausgeprägt wird die Erythropoese nach Einleitung der Therapie gesteigert?
- b) Reicht eine Dosis von 6—8 mg/kg/Tag Eisensubstitution für die gesteigerte Erythropoese aus? Treten Nebenwirkungen unter der Behandlung auf?
- c) Kommt es unter der massiven Eisensubstitution zu vermehrtem Auftreten von „freiem Eisen“? Ist eine Steigerung der Eisendosis denkbar?
- d) Es gibt Kinder, bei denen es trotz Therapie zu einem Abfall der Hämoglobinkonzentration unter 8 mg/dl kommt, oder die aufgrund ihrer Klinik eine oder mehrere Bluttransfusionen benötigen.
Mögliche Gründe für dieses Therapieversagen sollen geprüft werden.

3. Patienten

3.1. Patientenkollektiv

Die Ergebnisse dieser Arbeit beruhen auf der Untersuchung von verschiedenen Laborparametern und Daten von insgesamt 83 Frühgeborenen, die in den Jahren 2/1999 bis 3/2001 in der Kinderklinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf aufgenommen wurden. Untersucht wurden Frühgeborene, die zwischen der 24. und 33. SSW und/oder mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g zur Welt kamen.

Postnatal kamen die Frühgeborenen zunächst auf die Intensivstation. Nach Abschluss der intensivmedizinischen Behandlung und ausreichender Stabilisierung ihres Gesundheitszustandes wurden die Kinder bis zu ihrer Entlassung auf die Neugeborenenstation verlegt.

Die Behandlung mit rh-Erythropoietin wurde üblicherweise auf der Intensivstation begonnen und bis zur Entlassung fortgesetzt. Dabei wurde ein Kind nur entlassen, wenn die Hämoglobinkonzentration nach Abfall auf den niedrigsten Wert wieder kontinuierlich anstieg.

Der jeweilige Beobachtungszeitraum der Frühgeborenen betrug zwischen 2 und 14 Wochen. Er richtete sich nach dem Gesundheitszustand und damit verbundener medizinischer Intervention sowie der Entwicklung der Kinder.

3.1.1. Einschlusskriterien

Um an der Behandlung der Frühgeborenenanämie mit rh-Erythropoietin und der anschließenden Untersuchung teilnehmen zu können, musste die Intensivbehandlung der Kinder abgeschlossen sein. Das bedeutet, dass die Frühgeborenen zum Zeitpunkt des Therapiebeginns keine maschinelle Beatmung mehr benötigten. Kein Ausschlusskriterium war hingegen die Verbesserung der alveolären Ventilation mittels CPAP-Atmung.

Des Weiteren durften die Frühgeborenen zu Beginn der Therapie keiner schweren Infektion unterliegen. Dies bedeutet, dass sie weder eine klinische Verschlechterung des Allgemeinzustandes, noch eine Erhöhung der Entzündungsparameter im Blut aufweisen durften, die eine antibiotische Therapie zur Folge gehabt hätten.

Eine große Diagnostik, die häufige Blutentnahmen erfordert, soll zu diesem Zeitpunkt abgeschlossen sein, um eine Therapie mit EPO nicht durch häufige diagnostische Blutentnahmen zu konterkarieren.

Die Umstellung der Ernährung sollte von parenteral auf oral begonnen haben und von den Kindern gut vertragen werden.

3.1.2. Patientendaten

Aus den stationären Krankenakten der Frühgeborenen wurden Grunddaten, wie Geburtsdatum, Geburtsgewicht, Geschlecht, Vorliegen einer Infektion mit der Notwendigkeit einer antibiotischen Therapie sowie Gewicht zu Beginn der Therapie als auch wöchentlich im Verlauf entnommen (siehe Tabelle 1).

Patient	Geschlecht	Schwangerschaftsdauer	Geburtsgewicht	Alter bei Studienbeginn	Infektion
	w = weibl.; m = männl.	Wochen	Gramm	Tage	ja=1; nein=0
1	m	32	735	11	0
2	w	27	960	21	0
3	w	32	1260	18	0
4	w	30	1140	13	0
5	w	26	800	30	1
6	m	25	695	58	0
7	w	27	995	29	1
8	w	27	500	23	1
9	m	38	570	81	0
10	w	32	1590	20	0
11	w	30	1290	11	0
12	m	28	850	29	1
13	m	30	1480	13	0
14	m	32	1130	21	0
15	m	29	1075	25	0
16	w	32	1300	20	0
17	w	30	1190	10	0
18	m	29	1175	17	0
19	w	27	990	33	0
20	w	31	1165	20	0
21	w	28	1200	22	0
22	w	32	1415	10	0
23	w	32	1260	11	0
24	w	29	1430	11	0
25	w	32	1320	33	0
26	m	29	1620	8	0
27	m	29	1475	25	0
28	m	31	1705	13	1
29	w	29	1020	33	0
30	m	30	1475	16	0
31	m	32	1500	14	0
32	m	27	905	30	0
33	w	26	775	30	0
34	m	31	1390	32	0
35	m	32	1170	27	0
36	w	29	1290	34	0
37	w	33	995	28	0
38	m	32	1570	15	0
39	m	28	745	59	0
40	m	28	615	70	0
41	w	27	1130	19	0

Patient	Geschlecht	Schwangerschaftsdauer	Geburtsgewicht	Alter bei Studienbeginn	Infektion
	w = weibl.; m = männl.	Wochen	Gramm	Tage	ja= 1; nein= 0
42	m	32	1885	39	0
43	m	31	1060	30	0
44	m	33	1425	13	0
45	w	31	1515	7	1
46	w	31	1240	7	0
47	w	37	1330	50	0
48	m	26	720	42	0
49	w	28	1015	18	0
50	m	28	1150	31	1
51	w	25	885	93	1
52	w	32	445	50	0
53	m	30	2300	36	0
54	m	27	950	41	0
55	m	28	1300	10	1
56	w	28	1060	33	1
57	m	33	870	25	0
58	w	25	685	51	1
59	w	27	955	33	1
60	m	28	995	16	1
61	w	28	780	9	1
62	m	28	1200	10	1
63	m	26	890	38	1
64	w	37	1445	12	1
65	m	25	830	48	1
66	m	29	1590	25	0
67	m	31	1065	11	1
68	m	27	1150	6	1
69	w	31	1200	8	0
70	m	27	1235	21	0
71	m	24	700	61	0
72	w	27	830	13	1
73	m	27	715	44	0
74	w	27	1045	7	1
75	m	24	640	94	0
76	w	28	985	34	1
77	m	24	700	37	1
78	m	24	710	56	0
79	w	32	1570	10	0
80	m	28	1305	21	1
81	w	32	630	37	0
82	m	29	575	14	1
83	w	24	615	64	0
Anzahl		n=83	n=83	n=83	
Mittelwert		29,1	1097,4	28,3	
Standardabw.		3,0	345,2	19,3	
Median		29	1075	25	
Minimum		24	445	6	
Maximum		38	2300	94	

Tab. 1 enthält die Daten der 83 mit rh-Erythropoietin behandelten Frühgeborenen. Die Patienten werden aus datenschutztechnischen Gründen mit Nummern versehen.

Aufgelistet sind für jeden Patienten das Geschlecht, die Schwangerschaftswoche bei Geburt, das Geburtsgewicht und das Alter der Kinder zu Beginn der Behandlung. Ebenfalls in der Tabelle enthalten ist, ob die Kinder im Verlauf der Therapie an einer antibiotikpflichtigen Infektion litten.

3.1.3. Dosierung und Darreichungsform von rh-Erythropoietin

Die Behandlung der Frühgeborenenanämie wurde mit Recormon[®] der Firma Boehringer Mannheim durchgeführt.

Die Ampullen wurden bis zu ihrer Verwendung bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt und vor der Verabreichung mit der Hand aufgewärmt.

Alle Frühgeborenen erhielten 1000 E/kg/Woche Erythropoietin. Verabreicht wurden die Einheiten in drei Einzeldosen. Vereinbart wurde, dass die Gabe jeweils am Montag, Mittwoch und Freitag um 11.00 Uhr stattfinden sollte.

Solange ein Patient einen intravenösen Zugang besaß, wurde das rh-Erythropoietin parenteral gegeben. Anschließend wurde die gleiche Dosis subkutan gespritzt.

3.1.4. Supplementierungen

Während der Behandlung mit rh-Erythropoietin wurden alle Frühgeborenen mit Eisen substituiert.

Verwendet wurden hierfür Ferro sanol[®] Tropfen. Ein Tropfen enthält 1,5 mg zweiwertiges Eisen.

Begonnen wurde die Substitution zunächst mit 2 mg/kg/Tag per os.

Bei guter Verträglichkeit erfolgt eine zweitägige Steigerung der Dosis auf bis zu 6 mg/kg/Tag.

Bei Kindern, die trotz oben genannter Zieldosis von 6 mg/kg/Tag bei den wöchentlichen Laborkontrollen Serumeisenwerte unter 12 mg/dl zeigten, wurde die Eisendosis auf bis zu 8 mg/kg/Tag gesteigert.

Zusätzlich zur Eisensubstitution erfolgte die Gabe von Vitamin E der Firma Alcura.

Hierbei enthält ein Tropfen 12 mg Vitamin E. Zieldosis für alle Patienten waren 25 mg/Tag.

Somit erhielten die Kinder täglich 2 Tropfen.

Die tägliche Proteinzufuhr lag zwischen 3,1 – 3,5 g/kg/Tag.

Bluttransfusionen sollen nur nach Rücksprache gegeben werden. Bei Notwendigkeit einer Transfusion wird die Eisengabe für 14 Tage ausgesetzt.

4. Material und Methoden

4.1. Blutuntersuchungen

Während die Frühgeborenen das rh-Erythropoietin erhielten, wurde nach festem Schema bei ihnen Blut entnommen.

Die erste für diese Untersuchung relevante Blutentnahme erfolgt dabei vor der ersten Gabe des rh-Erythropoietin.

Abgenommen wurde ein Serumröhrchen für die Bestimmung von CRP, Serumeisen und Bilirubin am Hitachi 901 im Zentrallabor der Universitätsklinik Eppendorf (Prof. Wagener).

Ebenfalls ins Zentrallabor geschickt, wurde ein EDTA-Röhrchen, aus dem am MAX-B der Hämatokrit, die Hämoglobinkonzentration, die Leukozyten- und Thrombozytenzahlen sowie die Retikulozyten bestimmt wurden.

Auch die Bestimmung von Ferritin aus einem Serumröhrchen wurde mittels eines Elisass (Enzym Immuno-Ferritin der Firma Boehringer) im Labor von Prof. Wagener durchgeführt.

Außerdem wurde EDTA-Blut für die Bestimmung der Zinkprotoporphyrin- und Erythropoietin-Konzentration benötigt. Die Untersuchung des Blutes auf diese Parameter erfolgte im nephrologischen Labor der Kinderklinik (siehe hierzu 4.2. Bestimmungsmethoden).

Aus Heparinplasma wurde im Stoffwechsellabor der Kinderklinik der pro- und antioxidative Status bestimmt.

260 µl des heparinisierten Plasmas wurden zur Bestimmung des nicht-transferrin-gebundenen Eisens mittels Ultrafiltration und Atomabsorptionsspektrometrie in der Abteilung für medizinische Biochemie im UKE benutzt.

Diese „große Blutentnahme“ wurde in vierwöchentlichen Abständen durchgeführt.

Um zwischen diesen Entnahmen eine Kontrolle über die Entwicklung einer Anämie oder einen Abfall des Serumeisenspiegels zu haben, wurden wöchentlich die Parameter Hämoglobin, Hämatokrit, Leukozyten, Thrombozyten, Retikulozyten, Bilirubin, CRP und Serumeisen untersucht.

4.2. Bestimmungsmethoden

4.2.1. Probenaufbereitung

4.2.1.1. Material

- Zentrifuge Universal K2S Firma Hettich, Tuttlingen, Deutschland
- Eppendorf-Reaktionsgefäße Firma Eppendorf Vertrieb, Hamburg,
Deutschland
- Schüttler, Reax 2000 Firma Heidolph, Kelheim, Deutschland

- Natriumchlorid 0,9% Firma B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Deutschland
- Argon Firma Linde, Höllriegelskreuth,
Deutschland

4.2.1.2. Methode

Wie unter „4.1. Blutuntersuchungen“ beschrieben, wurden vierwöchentlich von jedem Frühgeborenen je einmal EDTA- und Heparinblut im Stoffwechsellabor bzw. im nephrologischen Labor der Kinderklinik verarbeitet.

Durchführung: (siehe auch Diagramm 1 und 2)

Beide Röhrchen (EDTA- und Heparinblut) werden zunächst 5 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation werden 130 µl und 50 µl des EDTA-Blutes in jeweils eine Eppendorfküvette überführt. Die Probe mit 130 µl Plasma wird anschließend mit Argon aufgefüllt und bis zur Messung der TRAP bei – 80 °C eingefroren. Die zweite Probe für den Erythropoietin-Elisa wird bei – 20 °C tiefgefroren.

Das Erythrozytensediment des EDTA-Röhrchens wird zur Bestimmung des Zinkprotoporphyrin benutzt.

Der Überstand des Heparinblutes wird in den in Diagramm 2 angegebenen Mengen in 3 Eppendorfküvetten überführt und mit Argon aufgefüllt. Die Proben für NTBI und Malondialdehyd werden anschließend bei – 80 °C, die Probe für Cholesterin bei – 20 °C eingefroren.

Zur Radikalresistenzbestimmung wird das restliche Plasma des Heparinblutes entfernt und die Erythrozyten mit 1 ml NaCl gewaschen. Bis zur Verarbeitung innerhalb von 24 h wird die Probe bei 4 °C gekühlt (Diagramm 1 + 2).

Flußdiagramm Probenaufberei-

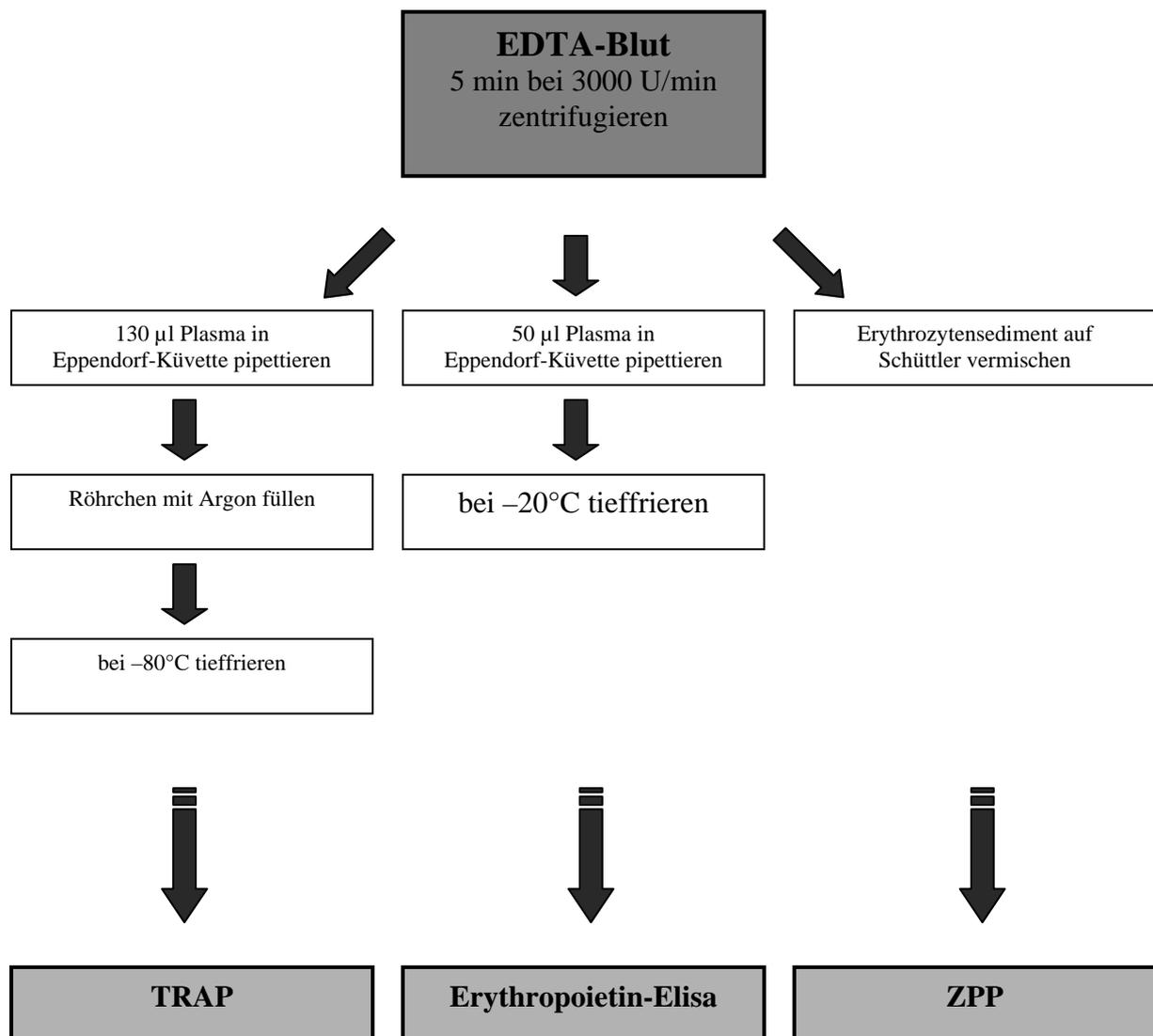


Diagramm 1: Flussdiagramm der Probenaufbereitung des EDTA-Blutes

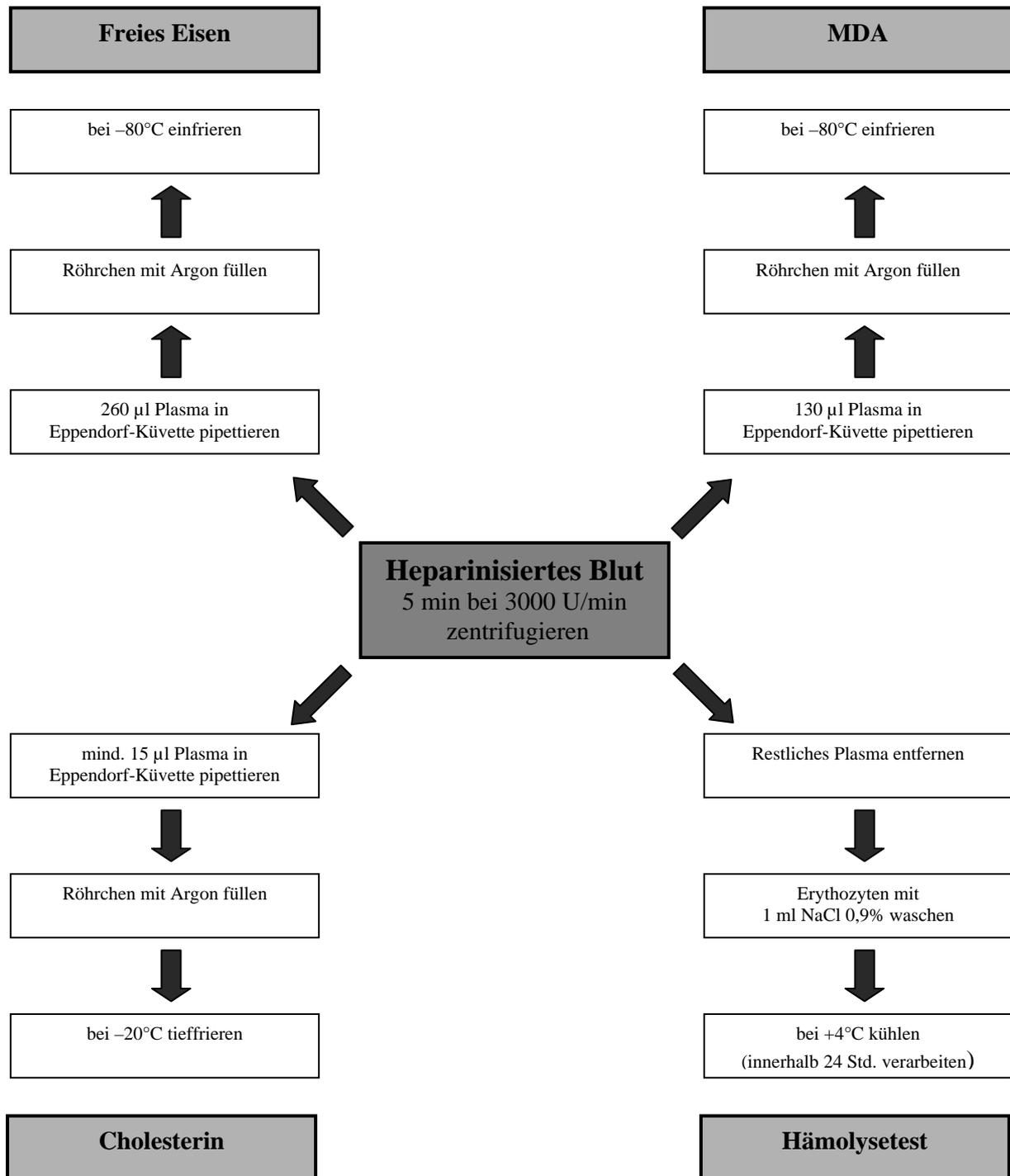


Diagramm 2: Flussdiagramm zur Probenaufbereitung des heparinisierten Blutes

4.2.2. ABAP-Hämolysetest – Mikromethode

4.2.2.1. Material

- Spektrophotometer
Pye Unicam SP 8-100 Eppendorf Gerätebau, Netheler + Hinz GmbH
Hamburg, Deutschland
- ½ Mikroeinmalküvetten Firma Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Zentrifuge
- Wasserbad Firma Gesellschaft für Labortechnik.m.b.H & Co,
Hannover-Vinnhorst, Deutschland
- Wasserstrahlpumpe Firma Brand, Trier, Deutschland
- Glasreagenzgläser 20 ml handgefertigt
- Kochsalzlösung 0,9%
- Phosphatpuffer PBS (Dulbeco) Biochrom KG, Berlin, Deutschland
ohne Ca, Mg
- destilliertes Wasser (Aqua dest.) Firma Baxter, Unterschleißheim,
Deutschland
- Triton X-100 Firma Serva ,Heidelberg, Deutschland
- ABAP , Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
(2,2-Azobis(2-amidinopropane)-
dihydrochloride)

4.2.2.2. Methode

Prinzip:

Der ABAP-Hämolysetest wird durchgeführt, um die Widerstandskapazität von Erythrozyten gegenüber freien Radikalen zu messen. Man verwendet hierfür Azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid (ABAP), einen wasserlöslichen, freien Radikalbildner. Gibt man ABAP zu Erythrozyten hinzu, kommt es im Laufe der Zeit zur kompletten Hämolyse der Erythrozyten.

Hierfür wird zunächst eine Erythrozytensuspension (0,5%) hergestellt, indem Erythrozyten mit PBS-Puffer vermischt werden. Anschließend werden zwei Ansätze A und B vorbereitet , indem zu gleichen Teilen Erythrozytensuspension und ABAP vermischt werden. Ein dritter

Ansatz C dient als Negativ-Kontrolle und enthält die Erythrozytensuspension und zu gleichen Teilen PBS-Puffer. Alle drei werden bei 37 °C inkubiert. Nach festgelegten Zeitintervallen werden geringe Mengen der Reaktionsansätze entnommen. Zu der zu messenden Probe im Ansatz A und zu der Negativ-Kontrolle wird erneut PBS-Puffer zugefügt. Zu dem Ansatz B wird Triton X gegeben. Hierbei handelt es sich um eines der am häufigsten verwendeten nicht-ionisierenden Detergenzien, um Membranproteine aus Membranproteinkomplexen zu solubilisieren. Ansatz B dient somit als Wert der totalen Hämolyse.

Nachdem alle Ansätze zentrifugiert wurden, wird die Hämolyse photometrisch bestimmt, indem die Absorption des Überstandes bei 540 nm gemessen wird. Die prozentuale Hämolyse wird anschließend anhand der photometrischen Ergebnisse berechnet. Trägt man die prozentuale Hämolyse gegen die Zeit graphisch auf, resultiert ein sigmoidales Verteilungsmuster. Die Zeit, in der 50% der Erythrozyten hämolysiert sind, wird hierbei als Parameter für die Widerstandskapazität von Erythrozyten gegenüber oxidativem Stress genommen (6).

Durchführung: (siehe auch Diagramm 3)

Vor dem Versuch werden eine 74 mM ABAP-Lösung sowie eine 0,1-%ige TRITON X-100 Lösung hergestellt.

Hierzu werden für eine 74 mM ABAP-Lösung 201 mg ABAP in 10 ml PBS aufgelöst.

Um die TRITON-Lösung herzustellen, wird 1 ml 100%-iges TRITON X mit 9 ml Aqua dest. zu einer 10-%igen Lösung verdünnt. In einem zweiten Schritt wird 1 ml 10-%iges TRITON X mit 99 ml Aqua dest. zu einer 0,1-%igen Lösung verdünnt.

Nach dem Waschen der Erythrozyten aus dem heparinisierten Röhrchen mit mindestens 1 ml NaCl 0,9% wird die Probe erneut 5 Min. bei 3000 U/min zentrifugiert und der Überstand mittels einer Wasserstrahlpumpe entfernt.

Um eine 0,5%-ige Erythrozytensuspension herzustellen, werden nun 15 µl des Erythrozytensedimentes mit 2985 µl PBS versetzt und durch leichtes Schütteln gut gemischt.

Der Reaktionsansatz wird nun in drei rundbodigen Glas-Reagenzgläsern (A,B,C) hergestellt.

Hierzu werden in den Ansätzen A und B jeweils 1200 µl der 0,5-%igen Erythrozytensuspension mit 1200 µl ABAP (74 mM) zusammengeführt und durch leichtes Schütteln gemischt.

Der Ansatz C besteht aus 400 µl der 0,5-%igen Erythrozytensuspension und 400 µl NaCl/PBS-Gemisch.

Die Reaktionsansätze werden nun in einem 37 °C vorgewärmten Wasserbad unter leichtem horizontalem Schütteln bei offenen Reagenzgläsern inkubiert.

Nach 60,90 und 120 Minuten werden aus den Ansätzen A und B nach gutem Durchmischen durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette 350 µl der Probe direkt in eine, wie unten beschrieben, vorbereitete Mikroeinmalküvette pipettiert.

Hierbei wird die Mikroeinmalküvette für den Ansatz A mit 350 µl NaCl/PBS-Gemisch und die Mikroeinmalküvette für den Ansatz B mit 350 µl 0,1-%iger TRITON X-100 gefüllt.

Aus dem Ansatz C werden nach 60 sowie 120 min jeweils 350 µl Probe nach gleichem Vorgehen entnommen und in eine mit 350 µl NaCl/PBS-Gemisch gefüllte Mikroeinmalküvette pipettiert.

Die Küvetten werden anschließend 5 Min. bei 3000 U/min zentrifugiert.

Bevor die Ansätze photometrisch bei einer Extinktion von 546 nm gemessen werden, wird ein Nullabgleich mit NaCl/PBS-Gemisch durchgeführt.

Nach Beenden aller Messungen wird der Hämolysewert anhand folgender Formel berechnet:

$$\frac{E_A - E_C}{E_B - E_C} \times 100 = \text{Hämolyse in \%}$$

E = Extinktion

A = Ansatz A = Probenwert

B = Ansatz B = Wert der totalen Hämolyse

C = Ansatz C = Negativkontrollwert

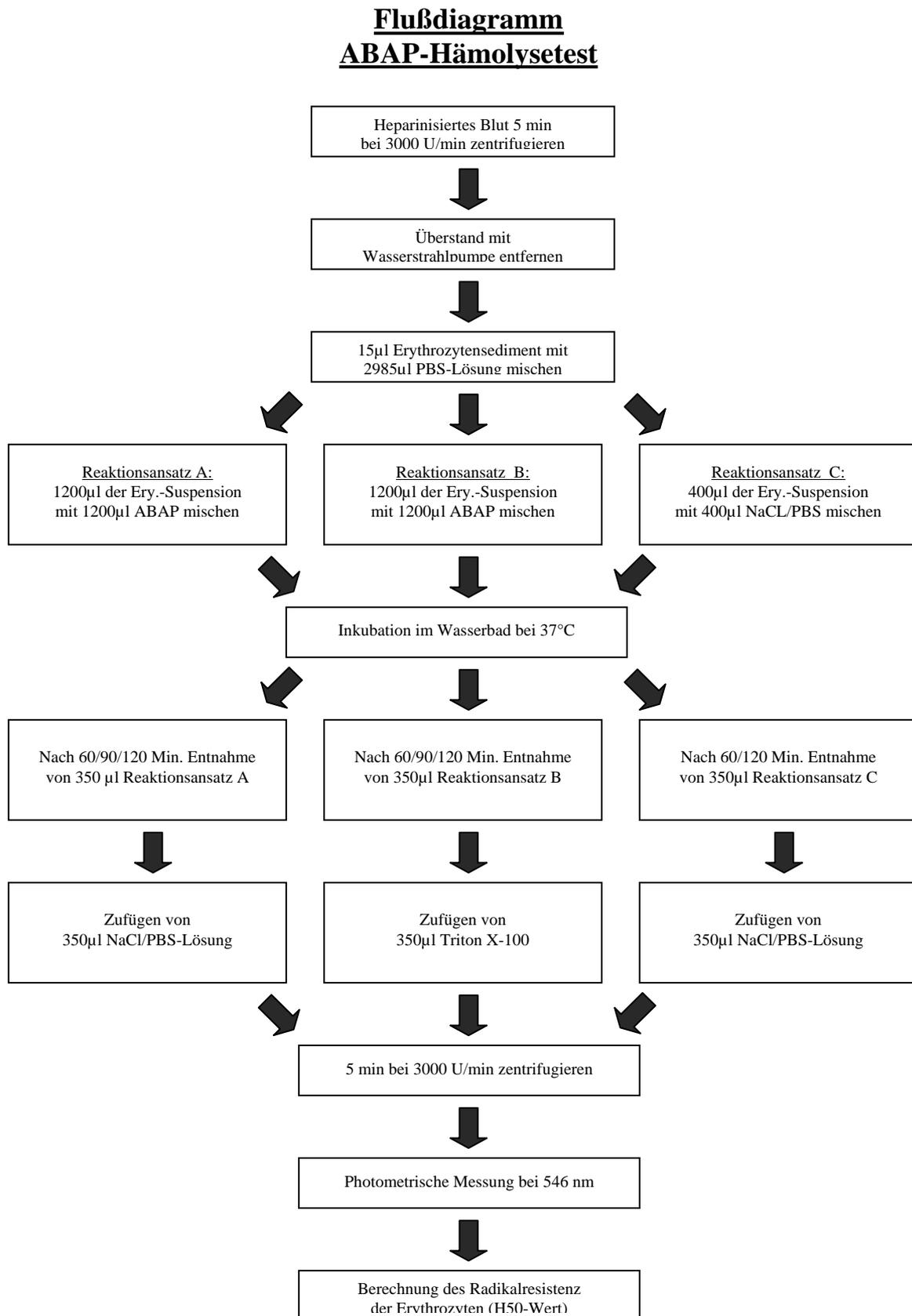


Diagramm 3: Flussdiagramm zur Durchführung des ABAP-Hämolysetests

4.2.3. TRAP-Messung

4.2.3.1. Material

- Two-Channel Biological Oxygen Monitor YSI 5300 PJ Kipp & Zonen Deutschland GmbH, Solingen, Deutschland
- Schüttler Typ REAX 2000 Firma Heidolph, Kelheim, Deutschland
- Tischzentrifuge neoLab, Laborspezialprodukte Heidelberg, Deutschland
- Wasserbad Dr. B. Schlag, Berg.-Gladbach
- Schreiber L 6512 Linseis Messgeräte GmbH, Selb Deutschland
- Spritze Firma SGE GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Linolsäure Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- ABAP (2,2'-Azobis(2amidinopropan)-dihydrochlorid) Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
- TROLOX (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetra-methyl-chroman-2-carboxylsäure) Firma Fluka, Fluka BioChemica, Deisenhofen, Deutschland
- PBS-Dulbeco w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} Biochrom KG, Berlin, Deutschland

4.2.3.2. Methode

Prinzip:

Dieser Test dient der quantitativen Bestimmung der Antioxidantien im Plasma.

ABAP ist ein wasserlöslicher thermolabiler freier Radikalbildner. Die freigesetzten Radikale induzieren die Peroxidation der dem Plasma zugefügten Linolsäure. Gemessen wird der dabei entstehende Sauerstoffverbrauch mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode, die vor dem Versuch auf 100% Sauerstoff kalibriert wird. Zunächst wird die Peroxidation durch die sich im Plasma

befindlichen Antioxidantien verhindert (= Induktionsphase). Die Dauer der Induktionsphase ist ein Index für die totale Radikalfängerkapazität des Plasmas.

Nach Verbrauch der Antioxidantien schreitet der Peroxidations-Prozess jedoch unter Sauerstoffverbrauch schnell voran (Propagationsphase).

Sind 50% des Sauerstoffs im Reaktionsmedium verbraucht, wird ein wasserlösliches Vitamin E-Analogon (TROLOX) zugefügt. Dieses wiederum führt zu einer zweiten Induktionsphase.

Durchführung: (siehe auch Diagramm 4)

Vor dem Versuch wird 387 mM ABAP hergestellt, indem 0,525 g ABAP in 5 ml PBS aufgelöst und bei -20°C eingefroren wird.

Des Weiteren werden 10 mg TROLOX in 100 ml PBS angesetzt. Diese 0,4 mM TROLOX-Lösung wird ebenfalls bei -20°C tiefgefroren.

Zu Beginn werden mit Magnetrührern versehene Glasküvetten in ein YSI-Wasserbad eingesetzt und mit Gummiringen fest zum Wasserbad hin verschlossen.

Das Wasserbad wird auf eine konstante Temperatur von 37°C erwärmt.

In die Glasküvetten werden je 3 ml PBS-Lösung gefüllt und darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen unter dem Magneten befinden.

Nach Einsetzen der Elektroden in die Glasküvetten und Einschalten des Magnetrührers, wird eine konstante O_2 -Konzentration abgewartet und anschließend ein Elektrodentest (mindestens 1x pro Messtag) durchgeführt.

Elektrodentest:

- a) Gerät auf „Air“ schalten und auf 90% O_2 -Konzentration einstellen
- b) Gerät auf „Test“ umschalten und kontrollieren, ob der Wert in 2-3 min eine O_2 -Konzentration von 87% übersteigt.
Bleibt der Wert unter 87%, muss die Elektrode neu bezogen werden.

Bevor der Schreiber eingeschaltet wird, muss das Messgerät in „Test“-Position auf 100% gebracht werden.

Nun werden 5,2 μl Linolsäure und 130 μl Probe in einem Eppendorf-Hütchen 40 Sec auf einem Schüttler gemischt, bis ein milchig trübes Gemisch entsteht.

Für kurze Zeit wird der Magnetrührer ausgeschaltet und die Elektroden aus den Küvetten gezogen.

Pro Probe werden zwei Glasküvetten mit jeweils 50 µl Probe-Linolsäure-Lösung beschickt und die Pipettenspitze durch Ansaugen gespült.

Anschließend werden die Elektroden wieder eingesetzt und die Elektroden erneut auf 100% nachjustiert.

Nach Anbringen eines Lichtschutzes werden den Reaktionszellen je 30 µl der ABAP-Lösung zugefügt.

Bei einer O₂-Konzentration von 50% werden in die Reaktionszellen je 25 µl der 0,4 mM TROLOX-Lösung mittels einer Spritze zugefügt.

Bei einer Sauerstoffkonzentration von 0% ist der Versuch beendet.

Ausgewertet wird die Messung durch eine graphische Bestimmung der Induktionszeiten $T_{(\text{Plasma})}$ und $T_{(\text{TROLOX})}$ und anschließender Berechnung der TRAP anhand folgender Formel:

$$\text{TRAP}(\mu\text{mol/l}) = 412,16 \mu \text{ mol/l} \times T_{\text{Plasma}} / T_{\text{TROLOX}}$$

Flußdiagramm Bestimmung der TRAP

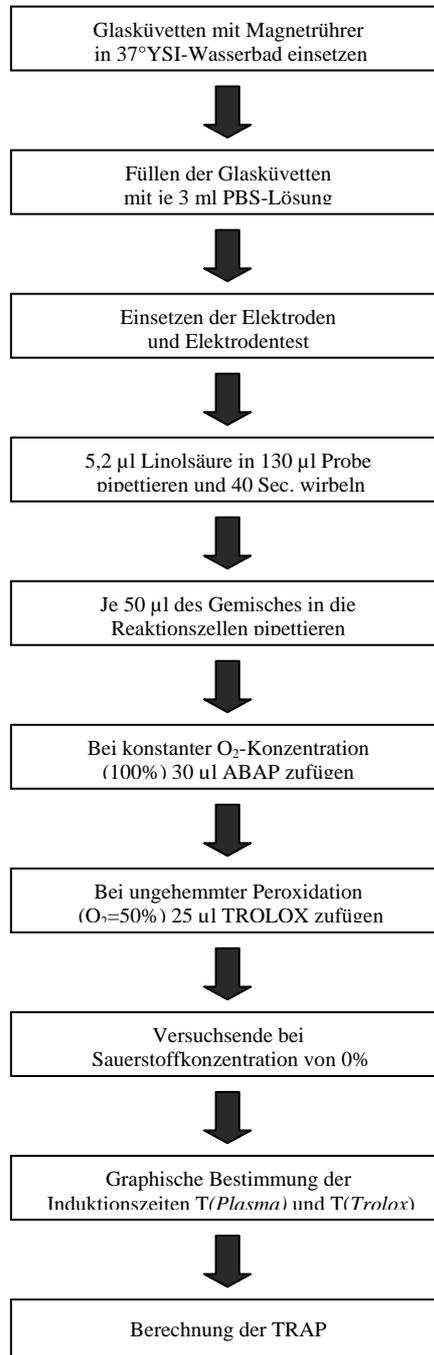


Diagramm 4: Flussdiagramm zur Bestimmung der TRAP

Der sensitivste und spezifischste Nachweis gelingt anhand des Thiobarbitursäure-Tests mit HPLC- und Fluoreszenzdetektion.

Das im Plasma vorhandene Malondialdehyd wird unter Hitzeeinwirkung bei einem pH-Wert von 3,5 mit Thiobarbiturat gekoppelt. Anschließend wird dieser Komplex in Butanol extrahiert.

Der Extrakt wird nun über die HPLC aufgetrennt und mittels eines Fluoreszenzdetektors bei einer Extinktion von 515 nm und einer Emission von 553 nm gemessen.

Da sämtliche Glasgeräte leicht durch Spülmittelreste mit Aldehyden kontaminiert sein könnten, wird ausschließlich mit Einwegplastikmaterial gearbeitet.

Durchführung: (siehe auch Diagramm 5)

Pufferherstellung:

In ein graduiertes 50 ml Nunc Röhrchen werden zunächst 45 ml HPLC-Wasser und dann 5 ml Eisessig gegeben. Anschließend werden 427 mg Natriumacetat und 20 mg DTPA zugefügt.

Zu dieser Pufferlösung gibt man nun 100 mg Thiobarbitursäure und lässt den Puffer auf dem Roller mischen.

Herstellung der Standardreihe:

1,23 ml TEP werden mit 98,7 ml Methanol in einer 100 ml Glasflasche gemischt und diese mit einem grauen Stopfen verkapselt. Hierbei handelt es sich um die Stammstandardlösung, die bei -20°C bis zu 8 Wochen aufbewahrt werden kann.

Aus der Stammlösung wird nun durch Verdünnung mit Wasser eine Standardreihe von acht Lösungen hergestellt.

Lösung 1:	514,0 $\mu\text{mol/l}$ TEP/Methanol	1:100
Lösung 2:	51,4 $\mu\text{mol/l}$ TEP/Methanol	1: 10
Lösung 3:	5,14 $\mu\text{mol/l}$ TEP/Methanol	1: 10
Lösung 4:	2,57 $\mu\text{mol/l}$ TEP/Methanol	1: 1
Lösung 5:	1,29 $\mu\text{mol/l}$ TEP/Methanol	1: 1
Lösung 6:	0,64 $\mu\text{mol/l}$ TEP/Methanol	1: 1
Lösung 7:	0,32 $\mu\text{mol/l}$ TEP/Methanol	1: 1
Lösung 8:	0,16 $\mu\text{mol/l}$ TEP/Methanol	1: 1

Der Eichbereich wird jeweils den zu messenden Proben angepasst.

Herstellung der BHT-Lösung:

500 mg BHT werden in einem Plastikspitzröhrchen in 5 ml Ethanol aufgelöst (10%-ige Lösung).

Weiteres Vorgehen:

In Eppendorfgläsern werden je 10 µl des zu messenden Plasmas, ein Blindwert (Wasser) und die Standardreihe vorgelegt.

Mit der Multipette gibt man zu allen Proben 200 µl des Puffers und 10 µl BHT-Lösung.

Die Proben werden verschlossen, kurz maschinell durchmischt und für 45 Min. bei 95°C im Eppendorfthermostat inkubiert. Anschließend werden die Proben entnommen, abgekühlt und kurz zentrifugiert.

Nun werden zu den Proben je 200 µl n-Butanol gegeben.

Erneut werden die Proben verschlossen und für ca. 15 Sec. maschinell durchmischt.

Nachdem die Ansätze für 5 Min. bei 3000 U/min zentrifugiert wurden, kann der Butanolüberstand abpipettiert und bei -20°C aufbewahrt werden.

Die Messung der Malondialdehyd-Konzentration mit Hilfe der HPLC-Pumpe mit Fluoreszenzdetektion wird gestartet, indem die Förderungsgeschwindigkeit auf 1,5 ml/min eingestellt und je 30 µl der Butanolphase injiziert werden.

Der Peak für den Malondialdehyd-TBA-Komplex erscheint nach einer Retentionszeit von ungefähr einer Minute.

Berechnung:

Die Malondialdehyd-Konzentration in den Plasmaproben wird mit Hilfe der Standardreihe berechnet.

Gesunde Erwachsene haben Konzentrationen von etwa 0,5 µmol/l im Plasma.

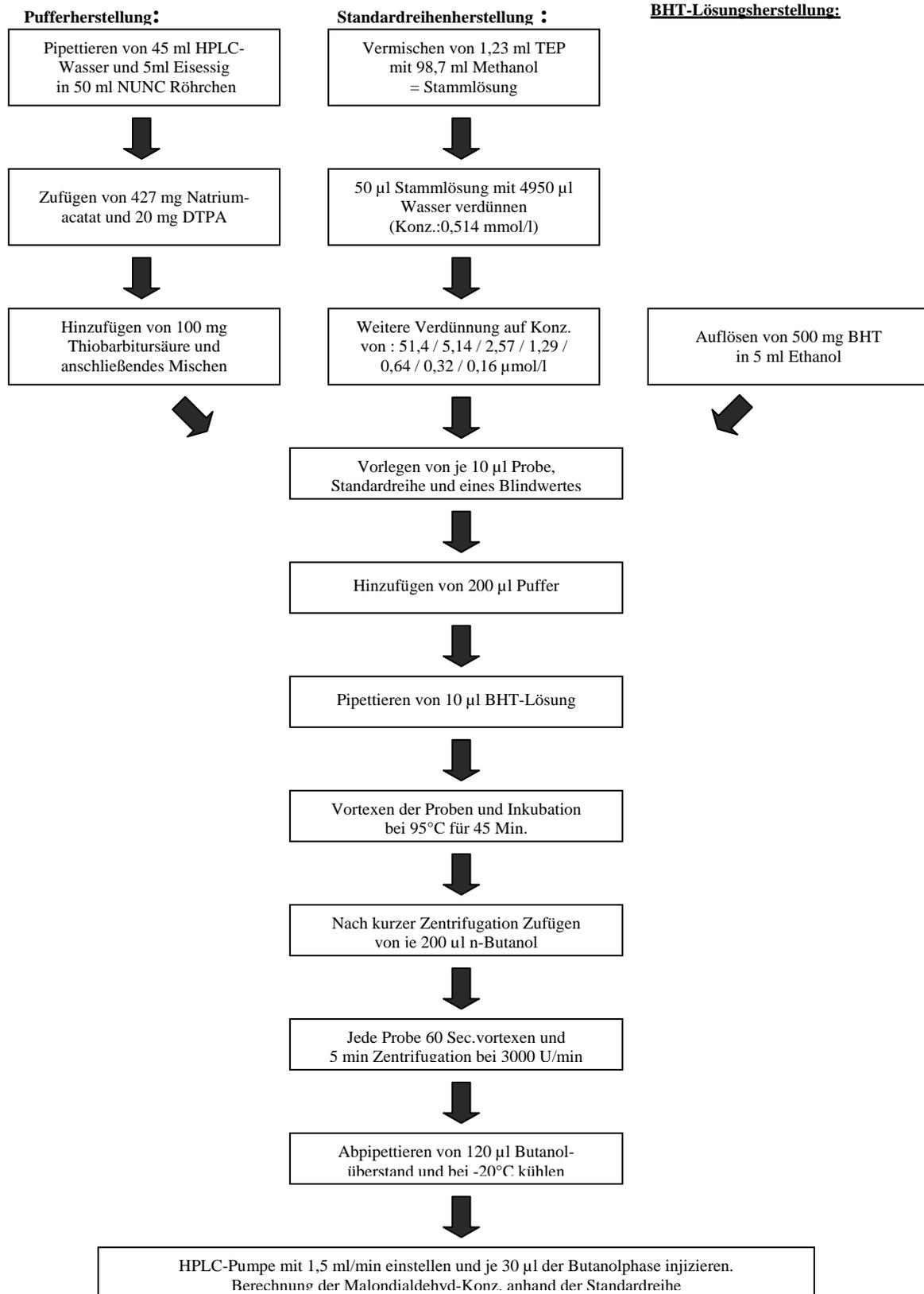


Diagramm 5: Flussdiagramm zur Bestimmung der Malondialdehydkonzentration im Plasma

4.2.5. Enzymatische Cholesterinbestimmung

4.2.5.1. Material

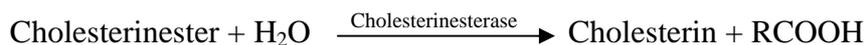
- Photometer Eppendorf Firma Eppendorf Gerätebau,
Netheler + Hinz GmbH Hamburg, Deutschland
- PIPES-Puffer Firma Roche, Deutschland
- Kalibratoren Firma Roche
- NaCl 0,9% Firma B. Braun Melsungen AG, Melsungen,
Deutschland

4.2.5.2. Methode

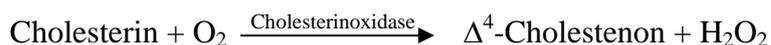
Prinzip:

Die Cholesterinkonzentration wird mit Hilfe eines enzymatischen in vitro Tests zur quantitativen Bestimmung in Humanplasma bestimmt.

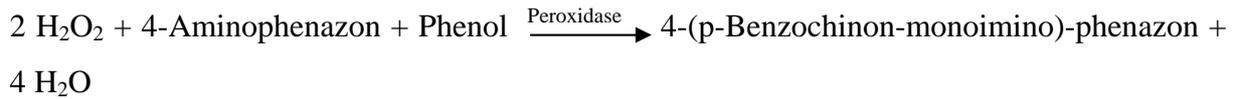
Die Cholesterinester im Plasma werden unter Einwirkung der Cholesterinesterase in freies Cholesterin und Fettsäuren gespalten.



Das Cholesterin wird von Sauerstoff unter Mitwirkung von Cholesterinoxidase zu Δ^4 -Cholestenon und Wasserstoffperoxid umgesetzt.



Das entstandene Wasserstoffperoxid bildet mit 4-Aminophenazon und Phenol unter katalytischer Wirkung der Peroxidase einen roten Farbstoff, dessen Farbintensität der Cholesterinkonzentration direkt proportional ist und photometrisch gemessen werden kann.



Durchführung: (siehe auch Diagramm 6)

Je 10 µl Probe wird zu 1 ml gebrauchsfertigen PIPES-Puffer pipettiert und so 10 Min. inkubiert.

Anschließend erfolgt die photometrische Messung am Eppendorf-Photometer bei einer Extinktion von 546 nm.

Flußdiagramm Cholesterin-Bestimmung

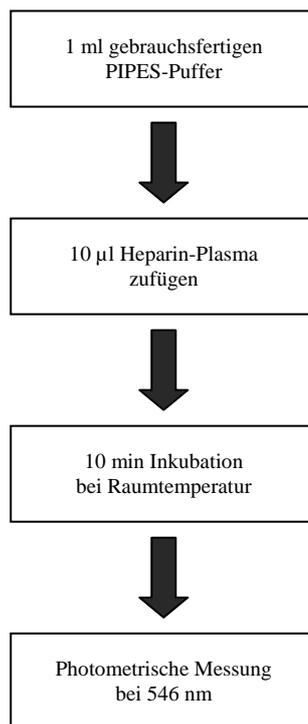


Diagramm 6: Flussdiagramm zur Cholesterinbestimmung

4.2.6. Photometrische Messung der Zinkprotoporphyrinkonzentration im Plasma

4.2.6.1. Material

- Hämatofluorometer Firma AVIV Biomedical, Wiesbaden, Deutschland
- Glasplättchen Firma AVIV
- Eichproben Firma AVIV
- Zentrifuge Firma Hettich, Tuttlingen, Deutschland
- Eppendorf-Reaktionsgefäße
- NaCl 0,9% B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland

4.2.6.2. Methode

Prinzip:

Die Methode, Zinkprotoporphyrin mithilfe eines Hämatofluorometers zu bestimmen, ist eine schnelle, einfache und weit verbreitete Methode. Hierbei wird das Verhältnis der Menge von Zinkprotoporphyrin-Fluoreszenz und der Menge von absorbiertem Licht durch oxygeniertes Hämoglobin bestimmt. Hierzu wird die Oberfläche eines mit Blut beschichteten Schiebeglas mit Licht der Wellenlänge 415 nm beleuchtet und die Fluoreszenzemission dann bei 596 nm gemessen.

Durchführung: (siehe Diagramm 7)

Erythrozytensediment aus EDTA-Blut wird auf einem Schüttler vorsichtig gemischt. Anschließend werden ca. 100 µl des Sedimentes entnommen und in eine mit 1200 µl isotoner NaCl-Lösung gefüllte Eppendorf-Küvette pipettiert.

Nach erneutem Mischen durch leichtes Schütteln erfolgt eine Zentrifugation für 5 Min. bei 5000 U/min. Anschließend wird der Überstand mit Hilfe einer Pipette entfernt, das Sediment erneut gut gemischt und 50 µl der Erythrozyten zum Messen auf ein Glasplättchen luftblasenfrei pipettiert.

Die Ergebnisse sind gemittelte Werte zweier Proben.

Zinkprotoporphyrinkonzentrationen $< 40 \mu\text{mol/mol}$ Häm schließen sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern einen Eisenmangel aus. Konzentrationen $> 80 \text{ mmol}$ Zinkprotoporphyrin/mol Häm beweisen, dass ein Eisenmangel oder eine Eisenverwertungsstörung vorliegt.

Flußdiagramm Zinkprotoporphyrinbestimmung

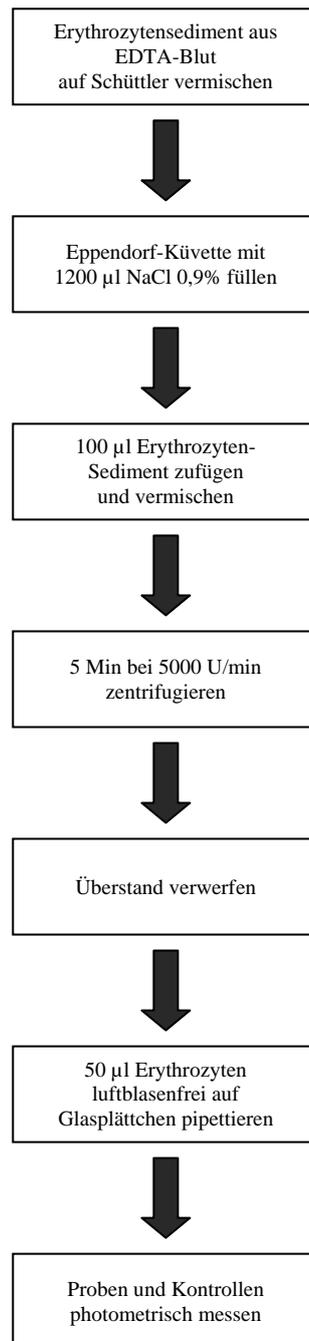


Diagramm 7: Flussdiagramm zur Bestimmung des Zinkprotoporphyrins

4.4. Datenverarbeitung und Statistik

Das Erstellen der Tabellen, Diagramme und statistischen Berechnungen wurden mit den Programmen Microsoft Excel, Sigma Plot und Sigma Stat durchgeführt.

Die jeweiligen Verläufe einzelner Laborparameter über die Therapiewochen wurden mit Hilfe von Sigma Plot als Box plots dargestellt. Hierbei enthält eine Box die Daten innerhalb der 25er und der 75er Perzentile. Die Linie in der Box markiert den Wert der 50er Perzentile. Die waagerechten Striche außerhalb der Box zeigen die 10er und 90er Perzentile an.

Mit dem Programm Sigma Stat erfolgte die statistische Auswertung mit dem Wilcoxon Signed Rank Test, dem Mann-Whithney-Rank-Sum-Test, dem Fisher's exacter test sowie der Spearman-Korrelation. Eine logistische Regression wurde anhand des Statistikprogramms SPSS durchgeführt.

Während der Wilcoxon Signed Rank Test Unterschiede im Verlauf eines Parameters innerhalb einer Gruppe anzeigt, prüft der Mann-Whithney-Rank-Sum-Test hingegen den Unterschied eines Parameters zum gleichen Zeitpunkt der Therapie zwischen Gruppen.

Als signifikanter Unterschied gilt $p < 0,05$.

Der Fisher's exakter Test wird anstelle des Vierfelder-Tests durchgeführt, da kleine Randsummen verwendet wurden. Man untersucht die Unabhängigkeit von zwei Alternativmerkmalen.

Der Korrelationskoeffizient nach Spearman ist ein Maß für die Stärke eines monotonen Zusammenhanges. Ein positives Vorzeichen symbolisiert einen gleichsinnigen Zusammenhang, ein negatives Vorzeichen einen gegensinnigen.

Eine Regressionsanalyse ist ein flexibles Verfahren, das häufig für Ursachen - und Wirkungsanalysen angewandt wird. Ihre Aufgabe besteht darin, die Art eines Zusammenhanges zwischen Merkmalen optimal zu beschreiben.

5. Ergebnisse

5.1. Ansprechen auf rh-Erythropoietin

5.1.1. Definition vom Therapieerfolg – bzw. Versagen

70-80% der Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1000 g erhalten Erythrozytenkonzentrate (86).

Durch die Behandlung mit rh-Erythropoietin wird die Erythropoese stimuliert und somit bei vielen Patienten der Bedarf an Transfusionen vermindert.

25 der insgesamt 83 Frühgeborenen benötigten auch unter hohen Dosierungen von rh-Erythropoietin Erythrozytenkonzentrate oder fielen mit der Hämoglobinkonzentration im Blut unter 8 g/dl.

Die Notwendigkeit der Durchführung einer Bluttransfusion und/oder ein Absinken der Hämoglobinkonzentration unter 8 g/dl unter Erythropoietin-Therapie wurden als Therapieversagen definiert. Im Folgenden werden alle Parameter auf mögliche Unterschiede zwischen den definierten Therapieversagern und den Nichttherapieversagern untersucht.

5.1.2. Vergleich demographischer Daten

Nach einer Einteilung aller 83 Frühgeborenen in Therapieversager und Nichttherapieversager stellte sich heraus, dass es Unterschiede beider Gruppen sowohl in Bezug auf das Geburtsgewicht als auch auf das Ausgangsgewicht zu Beginn der Therapie gibt.

Signifikant sind die Unterschiede des Geburtsgewichts mit einem Median von 890 g bei den Therapieversagern und 1182,5 g bei den Nichttherapieversagern ($p=0,003$).

Es zeigte sich ebenfalls eine Signifikanz bei den Ausgangsgewichten mit einem Median von 1105 g bei den Therapieversagern und 1335 g bei den Nichttherapieversagern ($p<0,001$).

Keinen Unterschied gab es bei der Schwangerschaftsdauer.

5.1.3. Hb-Verlauf

Betrachtet man zunächst den Verlauf der Hb-Konzentrationen aller 83 Frühgeborenen während der Epo-Therapie in Bezug auf den Ausgangswert, kommt es bis zur 2. Woche zu einem signifikanten Abfall ($p=0,030$) und zeigt im weiteren Verlauf keine nennenswerten Unterschiede zur Ausgangssituation.

Betrachtet man den Hb-Verlauf im Einzelnen, zeigt sich zunächst zwischen den Wochen 1 und 2 ein signifikanter Abfall der Konzentration ($p=0,015$), um anschließend zwischen den Wochen 2 bis 3 signifikant anzusteigen ($p=0,026$). Nach der ersten Woche erhält man im Schnitt eine Hb-Konzentration von 11,6 g/dl, nach zwei Wochen von 11,2 g/dl und nach drei Wochen von 11,8 g/dl.

Im weiteren Verlauf zwischen der Therapiewoche 3 und 4 zeigt sich ein erneuter signifikanter Hb-Abfall ($p=0,028$). Die Hb-Konzentration fällt hierbei von 11,8 g/dl auf 11,4 g/dl (Median) (Abb. 1).

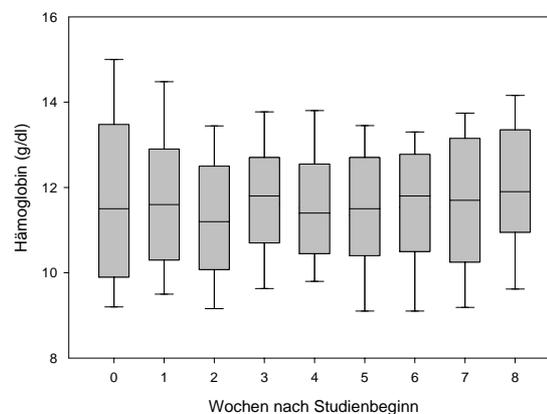


Abb. 1: Hb-Verlauf aller Frühgeborenen

Im Vergleich beider Gruppen zu Beginn der Therapie fällt eine signifikant höhere Hb-Konzentration der NTV (Median 12,2 g/dl) gegenüber der der TV (Median 10,1 g/dl) auf ($p < 0,001$). Die NTV starten somit unter wesentlich besseren Bedingungen (siehe Kap.5.1.4.). Auch nach 6 und 7 Therapiewochen liegen die NTV mit ihren Hb-Konzentrationen deutlich über denen der TV ($p = 0,005$ und $p = 0,004$) (Abb.2).

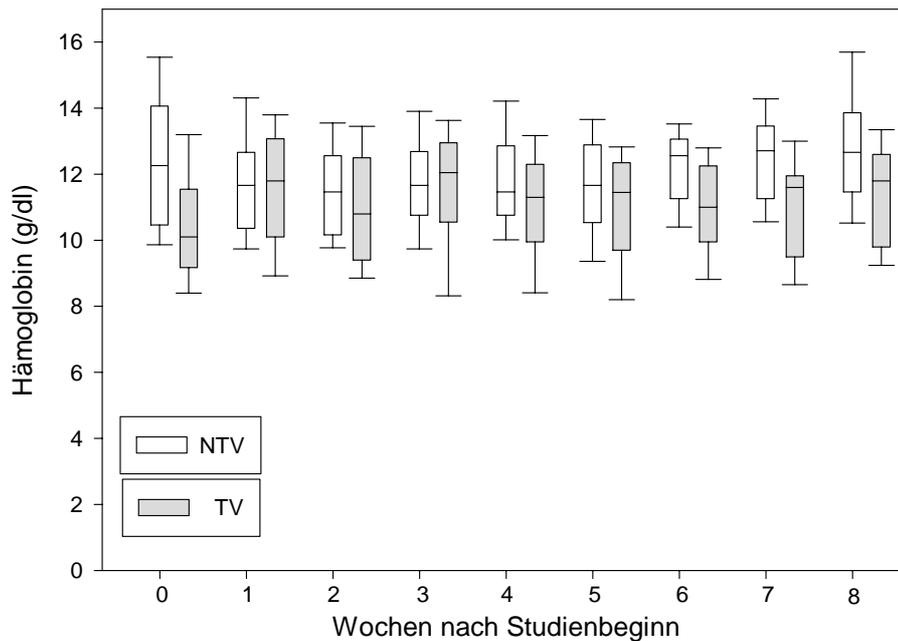


Abb.2: Hb-Konz. im Vergleich NTV und TV

Im Vergleich der Gruppen TV und NTV zeigt sich bei den TV in der ersten Therapiewoche ein signifikanter Hb-Anstieg von 10,1 g/dl auf 11,8 g/dl ($p = 0,021$), während es bei den NTV zunächst zu einem signifikanten Abfall von 12,2 g/dl auf 11,6 g/dl kommt ($p < 0,001$). Wie zu einem späteren Zeitpunkt noch gezeigt wird (Kap. 5.6.), erhalten 19 der 25 TV innerhalb der ersten beiden Therapiewochen Erythrozytenkonzentrate.

Ein erneuter signifikanter Abfall der Hb-Konzentration der TV findet sich zwischen den Wochen 3 und 4 ($p = 0,013$) (Abb. 2).

5.1.4. Hb bei Therapiebeginn und bei Entlassung

Die Abb. 3 zeigt die Hb-Konzentration im Vergleich der NTV und TV bei Therapiebeginn und bei Entlassung.

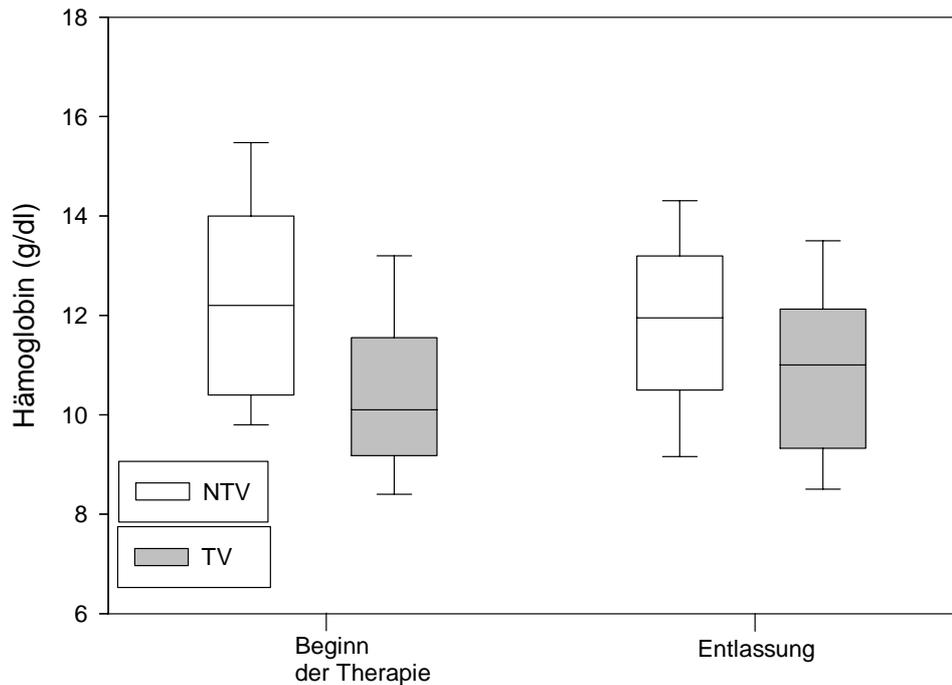


Abb.3: Hb-Konz. im Vergleich NTV/TV bei Therapiebeginn und bei Entlassung

Die Hämoglobinkonzentrationen vom Therapiebeginn bis zur Entlassung haben sich in beiden Gruppen nicht signifikant verändert.

Der Vergleich der Gruppen untereinander zeigt jedoch deutlich höhere Ausgangswerte bei den NTV ($p < 0,001$). Auch die Hb-Konzentration bei Entlassung liegt deutlich über der der TV ($p = 0,040$).

Die nachfolgende Tabelle 2 zeigt die Hb-Werte beider Gruppen bei Beginn und bei Entlassung.

	Nichttherapieversager			Therapieversager		
	Beginn	Entlassung	Diff.Hb Beginn/Entl.	Beginn	Entlassung	Diff. Hb Beginn/Entl.
	15,2	12,8	-2,4	9,4	12,0	2,6
	10,4	10,5	0,1	9,7	10,3	0,6
	14,1	13,6	-0,5	11,5	11,1	-0,4
	9,8	11,0	1,2	9,4	13,5	4,1
	9,4	13,2	3,8	10,2	13,9	3,7
	9,9	13,2	3,3	8,2	9,9	1,7
	14,2	12,0	-2,2	9,1	7,2	-1,9
	12,8	13,0	0,2	13,5	11,0	-2,5
	13,4	14,1	0,7	13,2	11,8	-1,4
	10,9	9,3	-1,6	8,7	8,1	-0,6
	14,2	12,7	-1,5	10,1	13,3	3,2
	13,5	11,9	-1,6	11,3	9,7	-1,6
	12,4	11,6	0,8	8,4	9,9	1,5
	13,2	13,1	-0,1	12,9	8,5	-4,4
	12,5	12,3	-0,2	13,9	12,5	-1,4
	10,4	10,3	-0,1	10,3	11,9	1,6
	11,7	10,8	-0,9	11,9	9,0	-2,9
	10,1	9,0	-1,1	9,0	9,1	0,1
	11,0	12,0	1,0	10,6	8,8	-1,8
	11,1	11,6	0,5	11,7	9,4	-2,3
	10,3	12,6	2,3	9,6	11,6	2,0
	16,3	14,7	-1,6	9,9	12,9	3,0
	16,1	13,9	-2,2	11,4	13,9	2,5
	15,0	12,7	-2,3	9,2	11,7	2,5
	12,1	12,5	0,4	7,7	10,7	3,0
	13,8	12,8	-1,0			
	11,9	10,7	-1,2			
	10,9	12,3	1,4			
	10,9	9,7	-1,2			
	12,0	10,3	-1,7			
	12,2	14,4	2,2			
	16,6	11,3	-5,3			
	10,2	13,2	3,0			
	9,4	10,8	1,4			
	10,7	9,8	-0,9			
	12,6	12,3	-0,3			
	13,1	10,2	-2,9			
	11,2	11,7	0,5			
	12,7	13,2	0,5			
	9,6	15,3	5,7			
	15,6	11,8	-3,8			
	11,9	10,7	-1,2			
	10,6	8,8	-1,8			
	9,6	10,4	0,8			
	14,2	10,8	-3,4			
	16,8	9,0	-7,8			
	16,2	8,7	-7,5			
	9,8	8,0	-1,8			
	10,2	11,7	1,5			
	14,0	9,1	-4,9			
	15,0	12,8	-2,2			
	10,6	13,3	2,7			
	9,9	10,4	0,5			
	13,9	15,6	1,7			
	12,4	16,5	4,1			
	13,9	13,5	-0,4			
	12,2	11,5	-0,7			
	14,4	14,4	0			
Mittelwert:	12,4	11,9	-0,482	10,4	10,9	0,436
Stabw.:	2,1	1,9	2,5	1,7	1,9	2,4
Median:	12,2	12,0	-0,35	10,1	11,0	0,6

5.1.5. Hb-Verlauf im Vergleich mit früherer EPO-Studie

In einer vorangegangenen Studie von F. Kowalzik in der Kinderklinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf unter der Leitung von Professor Hellwege wurde der Erfolg einer Prophylaxe der Frühgeborenenanämie mittels Vitamin B12 und Folsäure untersucht (42). Insgesamt wurden 75 Frühgeborene in die Studie aufgenommen und die Entwicklung ihres Hämoglobinwertes dargestellt. Die Kinder jener Studie erhielten kein Erythropoietin. Eisen wurde in Form der normalen Prophylaxe mit 2 mg/kg/Tag gegeben.

Studienbedingungen waren:

1. Es werden nur Frühgeborene < 34 SSW aufgenommen.
2. Das Geburtsgewicht muss unter 2500 g liegen.
3. Die Hämoglobinkonzentration sollte zu einem Zeitpunkt des stationären Aufenthaltes < 9 g/dl betragen.

Die Tabelle 3 zeigt die Entwicklung der Hb-Verläufe ohne und mit Substitution von Vitamin B12 und Folsäure.

g/dl	Keine Substitution		B12-Fol-Substitution	
	n = 42		n = 33	
	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Hb Geburt	15,62	2,65	16,68	2,04
Hb Verleg.	12,76	2,55	11,85	2,14
Hb Entl.	8,76	1,05	8,36	0,9

Tab 3. Hb-Verlauf mit und ohne Substitution

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen deutlich einen starken Abfall der Hb-Konzentration von der Geburt bis zur Entlassung. Dies betrifft sowohl die Gruppe, die keine, als auch die Gruppe, die eine Substitution mit Vitamin B12 und Folsäure erhalten hat.

Vergleicht man die Mittelwerte der Hb-Konzentration der Kinder der Studie von F. Kowalzik bei Entlassung (Mittelwert ohne Substitution: 8,76 g/dl und Mittelwert unter Substitution: 8,36 g/dl) mit dem Mittelwert der Hb-Konzentration der Kinder dieser Studie bei Entlassung (Mittelwert NTV: 11,9 g/dl und TV: 10,9 g/dl), so zeigt sich ein deutlicher Unterschied.

5.1.6. Retikulozyten

Die wöchentlich bestimmten Retikulozyten zeigen nach niedrigen Ausgangswerten um 2,35 % bereits nach einer Therapiewoche mit rh-Epo bei allen 83 Kindern einen signifikanten Anstieg auf 5,93 % ($p < 0,001$). Zwischen den Wochen 2 und 3 kommt es anschließend wieder zu einem signifikanten Abfall von 6,5 % auf 6,3 % ($p = 0,044$), wobei die Retikulozyten weiterhin deutlich über dem Ausgangswert liegen.

Bezogen auf den Ausgangswert steigen die Retikulozyten unter EPO-Therapie bis zur achten Woche sowohl bei allen Frühgeborenen als auch in den Untergruppen der TV und NTV signifikant an ($p < 0,001$).

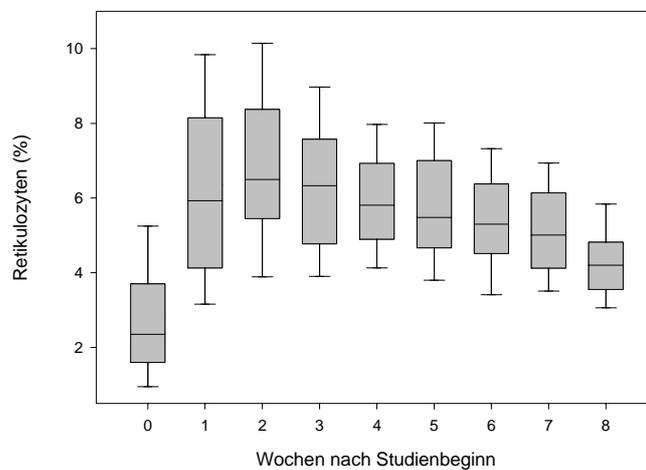


Abb.4. Retikulozytenzahlen aller 83 Fgb.

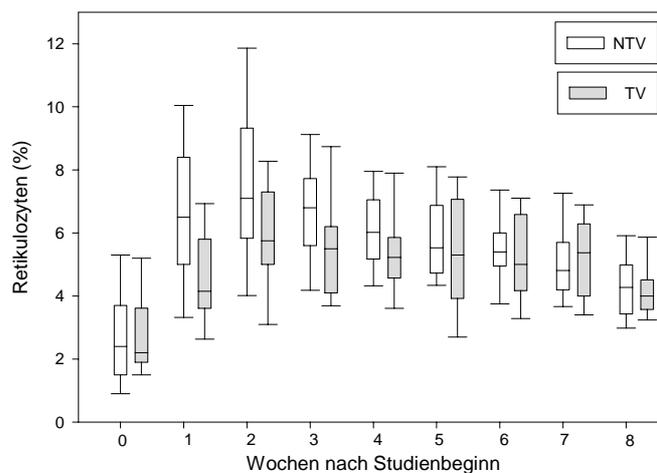


Abb.5 Retikulozytenzahlen im Vergleich NTV/TV

Betrachtet man die beiden Gruppen der NTV und TV getrennt, zeigt sich im Verlauf der Therapieversager kein statistisch signifikanter Retikulozytenanstieg. Bei den NTV kommt es jedoch innerhalb der ersten Woche zu einem deutlichen Anstieg ($p < 0,001$), der zwischen den Wochen 2 und 3 wieder signifikant rückläufig ist ($p = 0,005$). Auch zwischen den Wochen 5 und 6 kommt es zu einem weiteren signifikanten Abfall der Retikulozyten ($p = 0,044$).

Der direkte Vergleich beider Gruppen zeigt in den ersten drei Wochen signifikante Unterschiede. Die NTV haben einen deutlicheren Anstieg der Retikulozyten zu verzeichnen (Woche 1: $p = 0,015$; Woche 2: $p = 0,027$; Woche 3: $p = 0,029$).

Obwohl die Retikulozyten bei den TV nicht signifikant anzusteigen scheinen, kommt es zu einem signifikanten Hämoglobinanstieg in der ersten Therapiewoche.

Die NTV zeigen in der ersten Woche einen signifikanten Retikulozytenanstieg bei zunächst noch abfallender Hb-Konzentration. Bei ungefähr gleich bleibendem Hb-Wert fallen die Retikulozyten in dieser Gruppe in den Wochen zwei und drei sowie fünf und sechs ab.

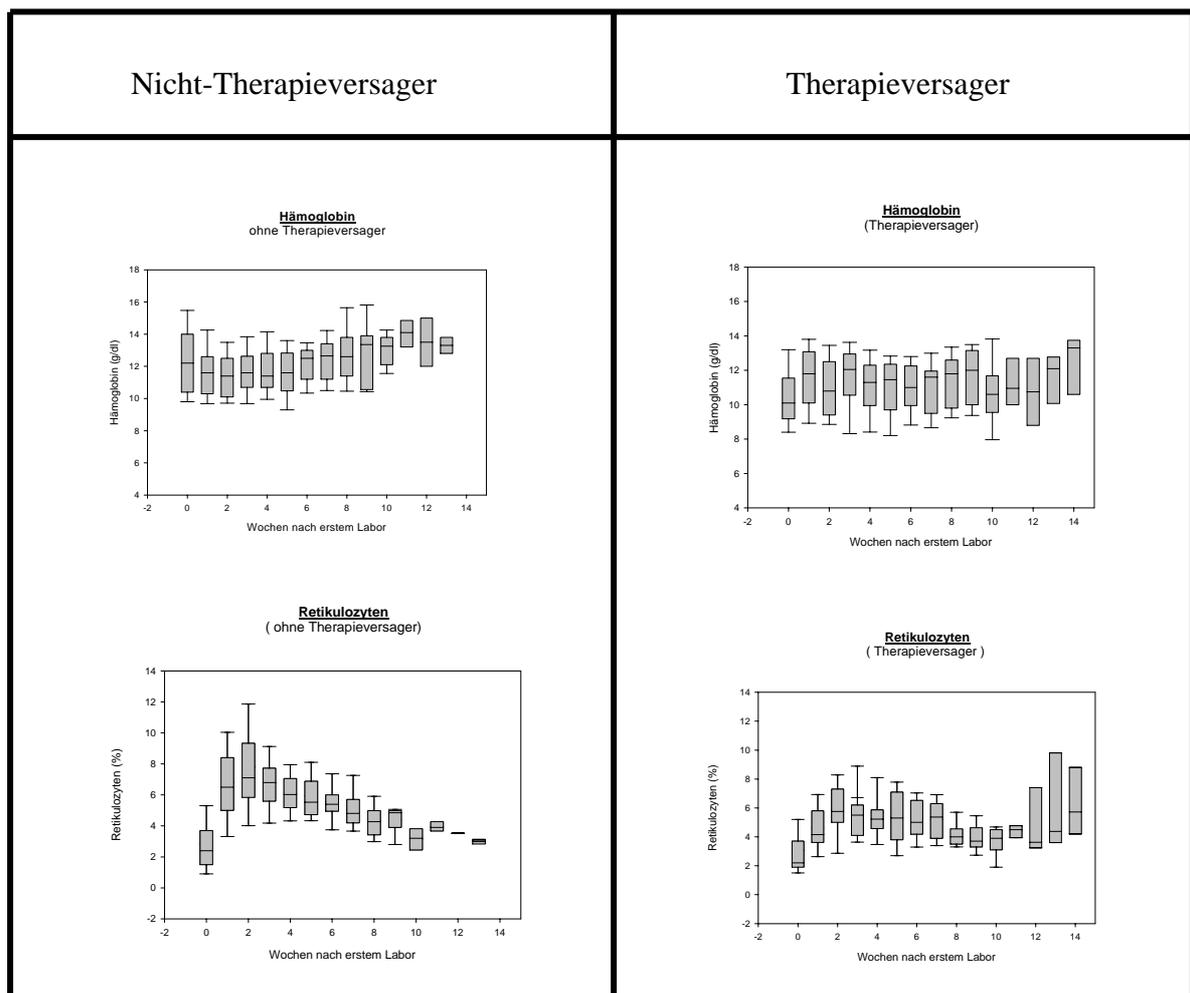


Abb 6. Retikulozyten- und Hämoglobinverlauf im Vergleich NTV/TV

5.1.7. Erythropoietinspiegel im Blut

Insgesamt lässt sich nach Beginn der rh-Erythropoietintherapie bei allen Frühgeborenen ein deutlicher Anstieg des Erythropoietinspiegels im Blut von im Median 6,5 mU/ml vor Beginn der Therapie auf 16,3 mU/ml vier Wochen später erkennen ($p < 0,001$).

Im weiteren Verlauf lassen sich keine Veränderungen mehr feststellen.

Betrachtet man die Gruppen getrennt voneinander, ergibt sich bei beiden der gleiche Verlauf. Innerhalb der ersten vier Wochen zeigen sowohl die NTV ($p < 0,001$) als auch die TV ($p = 0,001$) einen signifikanten Anstieg ihrer Erythropoietinspiegel im Blut.

Bezüglich des Anstiegs gibt es keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

5.1.8. Verträglichkeit des rh-Epo

Unter der Therapie mit rh-Erythropoietin konnten keine nennenswerten Nebenwirkungen beobachtet werden. Sowohl die intravenöse Gabe als auch die subkutane Applikation des Medikamentes wurde gut vertragen.

5.2. Eisenstoffwechsel

5.2.1. Verlauf des Serumeisens unter Therapie

Das Serumeisen zeigt unter der rh-Epobehandlung mit gleichzeitiger Eisensubstitution in der ersten Woche zunächst einen signifikanten Abfall ($p = 0,001$) von 13,05 $\mu\text{mol/l}$ auf 11,3 $\mu\text{mol/l}$. Anschließend gibt es keine nennenswerten Veränderungen mehr (Abb.7).

Betrachtet man nur die NTV, zeigen diese innerhalb der ersten Woche einen vergleichbar signifikanten Abfall der Serumeisenkonzentration ($p = 0,009$).

Bei den TV hingegen findet sich zwischen den Wochen 4 und 5 ein signifikanter Anstieg ($p = 0,024$) von 9,6 $\mu\text{mol/l}$ auf 13,3 $\mu\text{mol/l}$.

Im direkten Vergleich der Gruppen gibt es außer in der siebten Therapiewoche keine signifikanten Unterschiede ($p= 0,046$). Hier liegt die Serumeisenkonzentration der NTV bei $12,4 \mu\text{mol/l}$ und die der TV bei $10,7 \mu\text{mol/l}$ (Abb. 8).

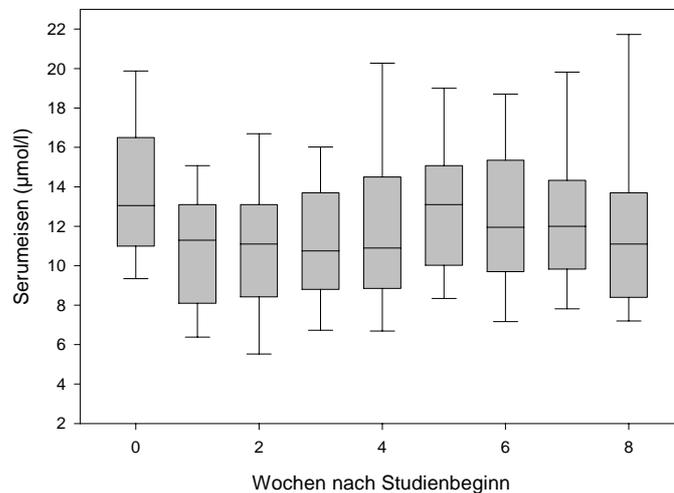


Abb.7: Serumeisen 83 Kinder

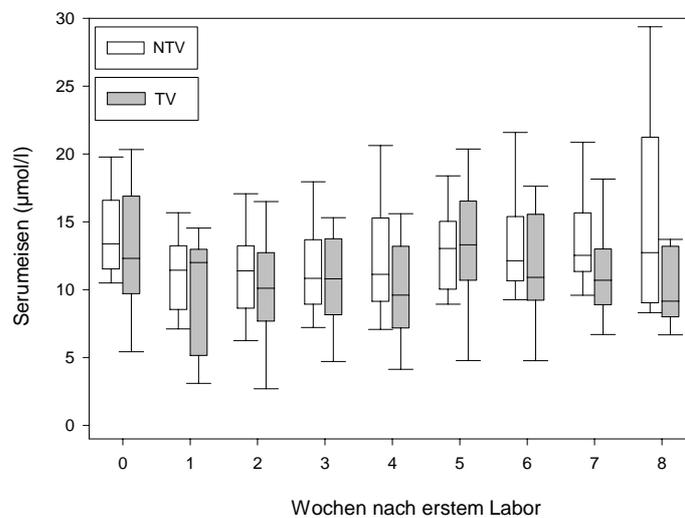


Abb. 8: Serumeisen im Vergleich NTV/TV

Bezieht man die Serumeisenwerte aller 83 Kinder im Verlauf jedoch auf den Ausgangswert, lässt sich in den ersten 4 Wochen ein signifikanter Abfall verzeichnen (Woche 0/2: $p<0,001$; Woche 0/4: $p=0,017$).

Bei den TV im einzelnen lässt sich kein signifikanter Abfall finden.

Bei den NTV zeigt sich ein signifikanter Abfall vom Ausgangswert des Serumeisens bis zur zweiten Woche ($p= 0,002$) (Abb. 8).

5.2.2. Eisensubstitution unter Therapie

Die Eisensubstitution unter rh-Epothherapie soll anfangs 2 mg/kg/Tag betragen und bei guter Verträglichkeit im Verlauf auf bis zu 6 mg/kg/Tag gesteigert werden.

Der Vergleich beider Gruppen zeigt jedoch deutliche Unterschiede in Bezug auf eine regelmäßige Dosissteigerung (Abb. 9).

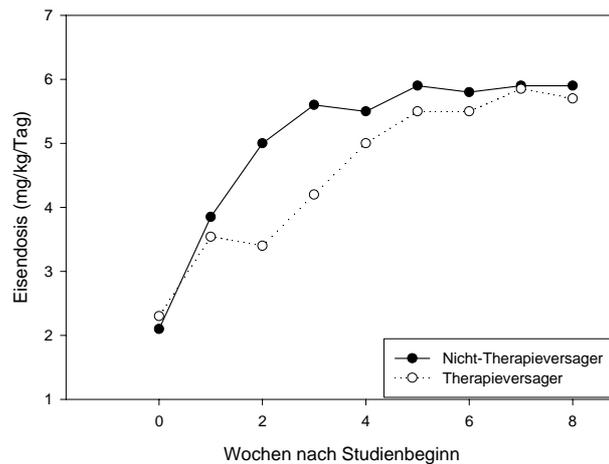


Abb.9: Eisensubstitution: Darstellung der Mediane von NTV/TV

Bei den NTV konnte die Eisensubstitution signifikant ($p < 0,001$) gesteigert werden. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der TV, bei denen in den ersten drei Wochen die Eisensubstitutionsdosis nicht gesteigert werden konnte. Als Ursache erscheint hier die Gabe von Erythrozytenkonzentraten innerhalb der ersten beiden Wochen. Konsekutiv erhalten die Frühgeborenen in den folgenden zwei Wochen keine Eisensubstitution.

Erst zwischen den Wochen 4 und 5 kommt es bei den TV zu einer deutlichen Steigerung der Eisengabe ($p = 0,022$).

5.2.3. Verträglichkeit von prophylaktischer Eisensubstitution

Alle Patienten erhielten eine Eisensubstitution. Die orale Gabe wurde sehr gut toleriert. Es traten keinerlei Nebenwirkungen oder allergische Reaktionen auf.

5.2.4. Ferritin

Das Serumferritin verändert sich schnell unter rh-Epo-Behandlung.

Die vierwöchentliche Untersuchung zeigt, dass im Mittel bei allen 83 Kindern die Ferritinkonzentrationen signifikant abfallen. Innerhalb der ersten vier Wochen fällt die Konzentration von 219 $\mu\text{g/l}$ auf 78,4 $\mu\text{g/l}$ ($p < 0,001$). Nach weiteren vier Wochen liegen die Konzentrationen im Median bei 66,4 $\mu\text{g/l}$ ($p = 0,006$).

Auch eine Betrachtung beider Gruppen im Verlauf bestätigt den Abfall, wobei es zwischen den Gruppen keinen Unterschied gibt (Abb. 10 und 11).

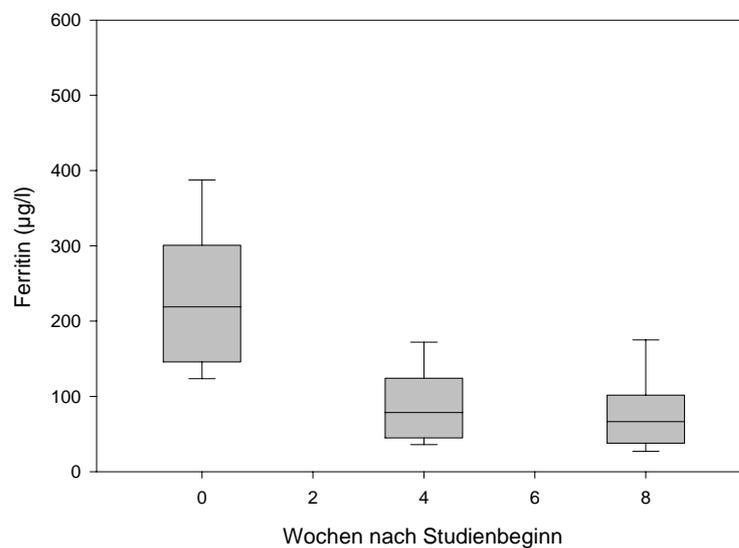


Abb.10: Ferritinkonzentration aller 83 Frühgeborenen

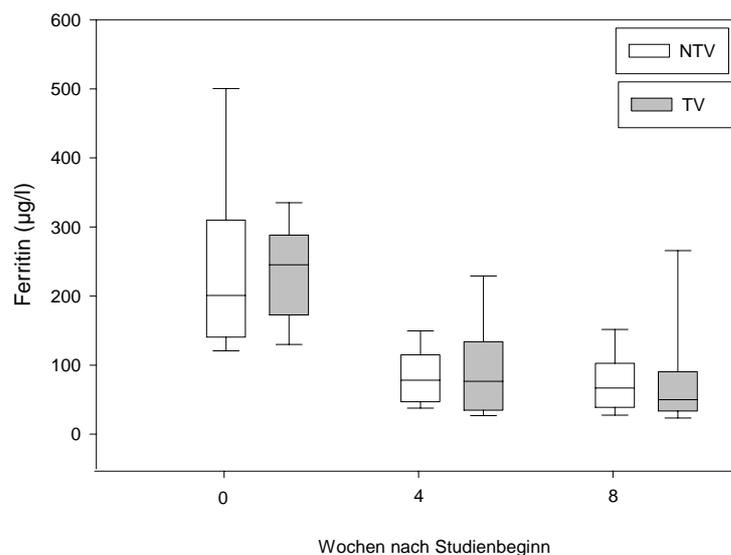


Abb. 11: Ferritinkonzentration im Vergleich NTV/TV

5.2.5. Zinkprotoporphyrin

Es kommt im gesamten Verlauf der Therapie zu einem signifikanten Anstieg der Zinkprotoporphyrinkonzentrationen von 87,5 $\mu\text{mol}/\text{Mol}$ Häm zu Beginn auf 242,5 $\mu\text{mol}/\text{Mol}$ Häm nach 4 Wochen (Abb.12). Aber auch von Woche 4 zu Woche 8 ist der Konzentrationsanstieg signifikant ($p < 0,001$).

Dieser Anstieg findet sich sowohl bei den NTV als auch bei den TV ($p < 0,001$).

Zwischen beiden Gruppen gibt es diesbezüglich zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied (Abb.13).

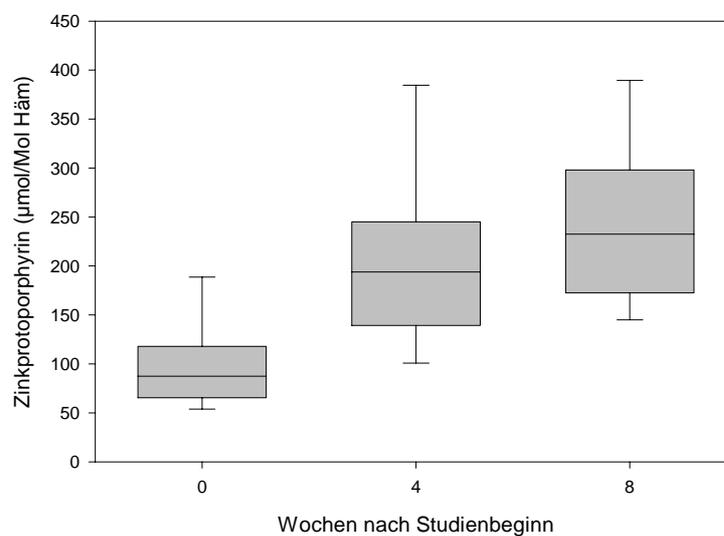


Abb.12: Zinkprotoporphyrin aller 83 Frühgeborenen

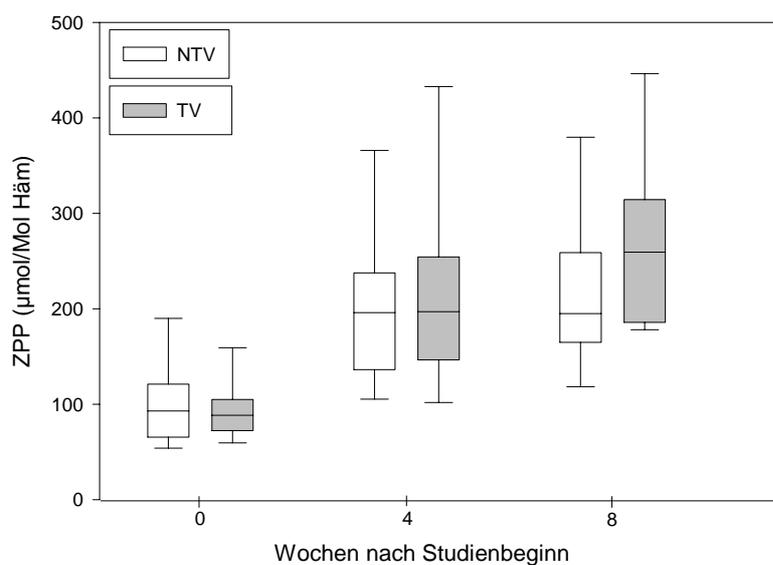


Abb.13: Zinkprotoporphyrin im Vergleich NTV/TV

Betrachtet man den Verlauf der Ferritinkonzentration (Abb. 10) und der ZPP-Konzentration (Abb. 12) über acht Wochen, erkennt man eine gegensinnige Beziehung. Mit Hilfe einer Spearman Rank Order Correlation kann ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Verlauf der Ferritinwerte und dem Verlauf der Zinkprotoporphyrinkonzentrationen überprüft werden. Hierbei wird jeweils der Zusammenhang beider Parameter zum gleichen Zeitpunkt bestimmt.

Es zeigt sich, dass es vor Beginn der Therapie mit rh-Epo einen signifikanten, gegensinnigen monotonen Zusammenhang beider Parameter gibt.

	ZPP 0	
Ferritin 0	-0.607	Korrelationskoeffizient
	0.000	P-Wert
	68	Anzahl der Getesteten

Auch vier Wochen nach Therapiebeginn zeigt sich ein signifikant gegensinniger Zusammenhang beider Werte. Während die Zinkprotoporphyrinkonzentrationen unter Therapie ansteigen, fallen die Ferritinwerte ab.

	ZPP 4	
Ferritin 4	-0.432	Korrelationskoeffizient
	0.000	P-Wert
	66	Anzahl der Getesteten

Nach 8 Wochen gibt es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen beiden Parametern.

	ZPP 8	
Ferritin 8	0.174	Korrelationskoeffizient
	0.542	P-Wert
	14	Anzahl der Getesteten

5.3. Wachstumsanalyse

5.3.1. Gewichtszunahme pro Tag

In der folgenden Graphik (Abb.14) ist die Gewichtszunahme der Kinder unter rh-Epo-Therapie dargestellt.

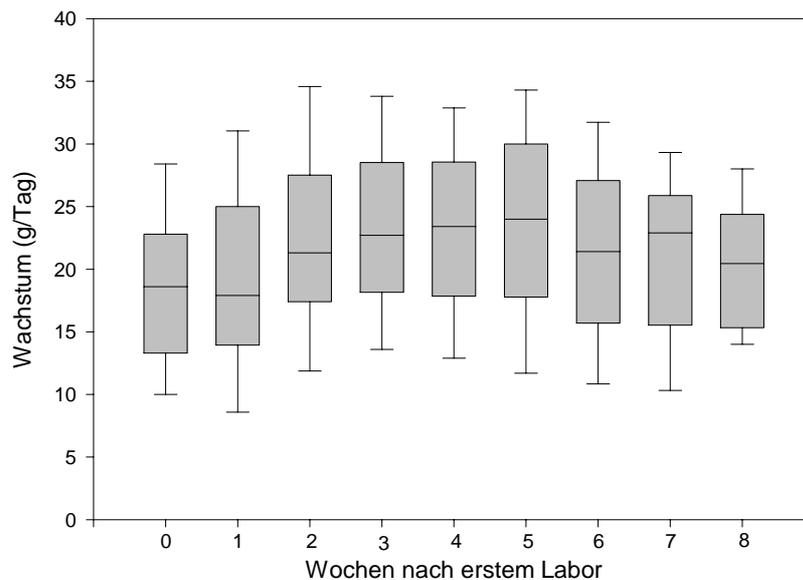


Abb.14: Gewichtszunahme der 83 Frühgeborenen

Obwohl die mittlere Gewichtszunahme der Kinder nach zwei Therapiewochen zuzunehmen scheint, finden sich im Verlauf statistisch keine signifikanten Unterschiede.

Auch unter den TV, die vor Entlassung deutlich mehr zunehmen als zu Beginn der Therapie, gibt es keine Signifikanzen (Abb. 15).

Lediglich im Verlauf der NTV finden sich signifikante Gewichtszunahmen sowohl innerhalb der ersten Woche von 19,2 g/Tag auf im Median 20 g/Tag in der zweiten Woche ($p=0,029$). Auch zwischen den Wochen 4 und 5 kommt es zu einer weiteren Steigerung der Zunahme von 22,8 g/Tag auf 25 g/Tag ($p=0,044$).

Während es innerhalb der ersten Woche bezüglich der Gewichtszunahme keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen gibt, findet sich in der zweiten Woche ein deutlicher Wachstumsvorsprung ($p=0,015$) der NTV (Median TV: 16,6 g/Tag; Median NTV: 20 g/Tag). Ursächlich hierfür mag das häufige Auftreten von Infektionen bei den TV innerhalb der ersten beiden Wochen sein (s. Kap. 5.7.).

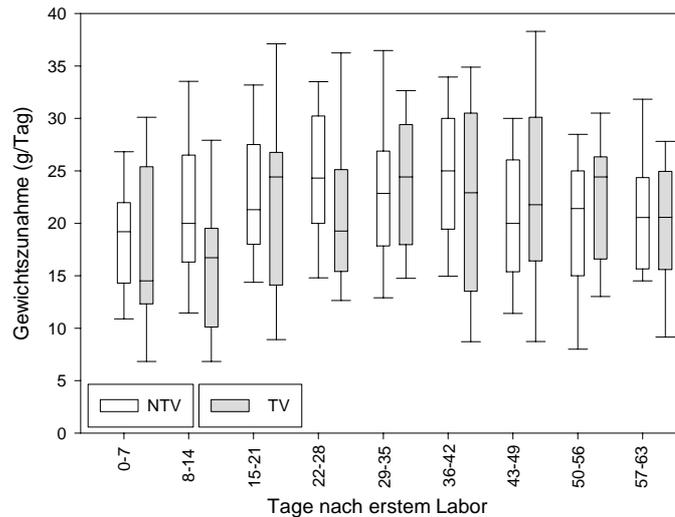


Abb.15: Gewichtszunahme im Vergleich NTV/TV

5.4. Serumchemie

5.4.1. Bilirubin

Innerhalb der ersten vier Therapiewochen fällt die Bilirubinkonzentration im Blut aller 83 Frühgeborenen von Woche zu Woche signifikant ab (Wo. 0/1: $p=0,027$; Wo. 1/2: $p<0,001$; Wo. 2/3: $p=0,008$; Wo. 3/4: $p<0,001$).

Während die Konzentration vor Therapiebeginn bei durchschnittlich 1,2 mg/dl liegt, misst man nach 4 Wochen nur noch 0,9 mg/dl (Abb. 16).

Zwischen den Wochen fünf und sechs findet sich ein erneuter signifikanter Abfall ($p=0,022$) von 0,9 mg/dl auf 0,75 mg/dl.

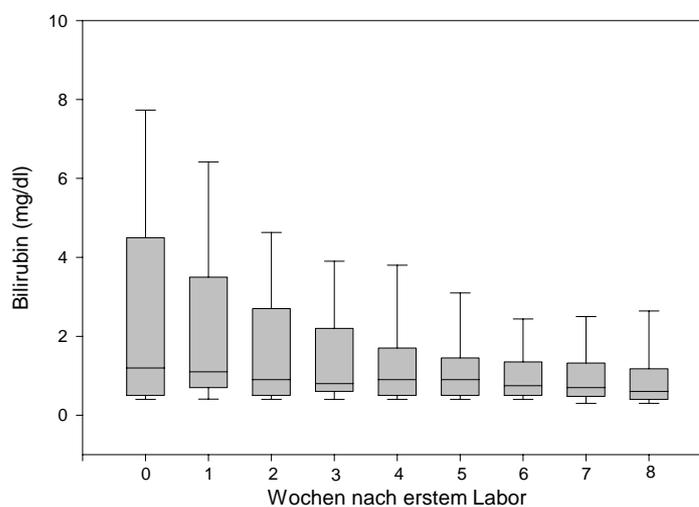


Abb.16: Bilirubin im Verlauf aller 83 Frühgeborenen

Betrachtet man den Verlauf der Bilirubinkonzentration bei allen NTV, so lässt sich ebenfalls eine signifikant sinkende Bilirubinkonzentration ab der ersten bis zur sechsten Woche feststellen (Wo. 1/2: $p=0,003$; Wo. 2/3: $p=0,008$; Wo. 3/4: $p<0,001$; Wo. 4/5: $p=0,036$; Wo. 5/6: $p=0,010$).

Der Verlauf unter den TV zeigt in der ersten Therapiewoche zunächst einen signifikanten Anstieg des Bilirubins. Bis zum Studienende ergaben sich keine weiteren signifikanten Unterschiede.

Auch ein direkter Vergleich beider Gruppen ergibt keine signifikanten Unterschiede (Abb.17).

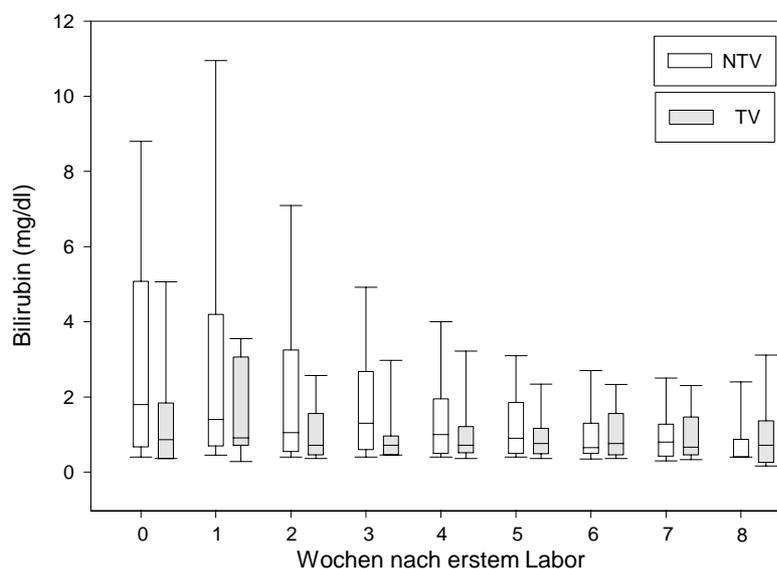


Abb.17: Bilirubin im Vergleich NTV/TV

5.4.2. Leukozyten

Bei der Betrachtung der Leukozyten aller Therapieteilnehmer dieser Studie fällt ein signifikanter Abfall zwischen der ersten und zweiten Woche ($p<0,001$) sowie der dritten und vierten Woche ($p=0,002$) auf (Abb. 18).

Dieser signifikante Abfall der Leukozyten in diesen Wochen findet sich sowohl bei der Betrachtung des gesamten Patientenkollektivs als auch bei den einzelnen Gruppen (NTV: Wo. 1/2: $p<0,001$; Wo. 3/4: $p=0,030$ und TV: Wo. 1/2: $p=0,044$; Wo. 3/4: $p=0,017$).

Der Verlauf der Leukozyten bei Vergleich der NTV und TV ergibt bis auf die dritte Therapiewoche ($p=0,002$) keine signifikanten Unterschiede.

Zu diesem Zeitpunkt weisen die TV deutlich höhere Werte als die NTV auf (TV - Median: 10,9/ μl , NTV – Median: 8,8/ μl).

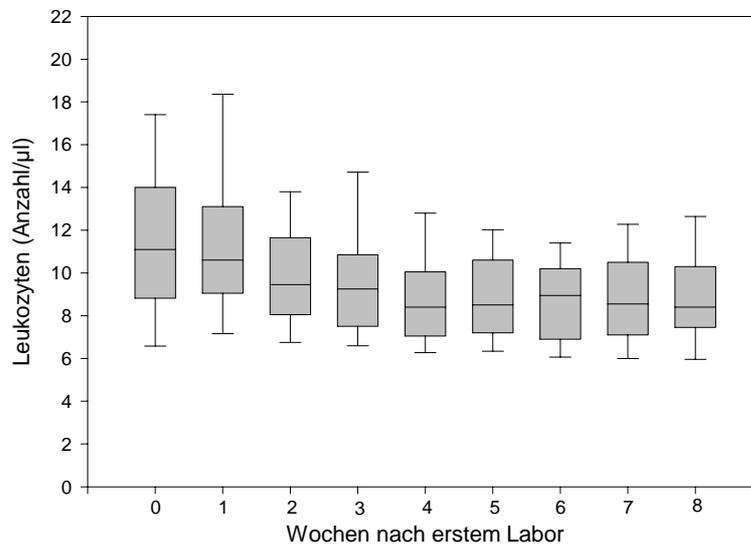


Abb.18: Leukozytenverlauf aller 83 Frühgeborenen

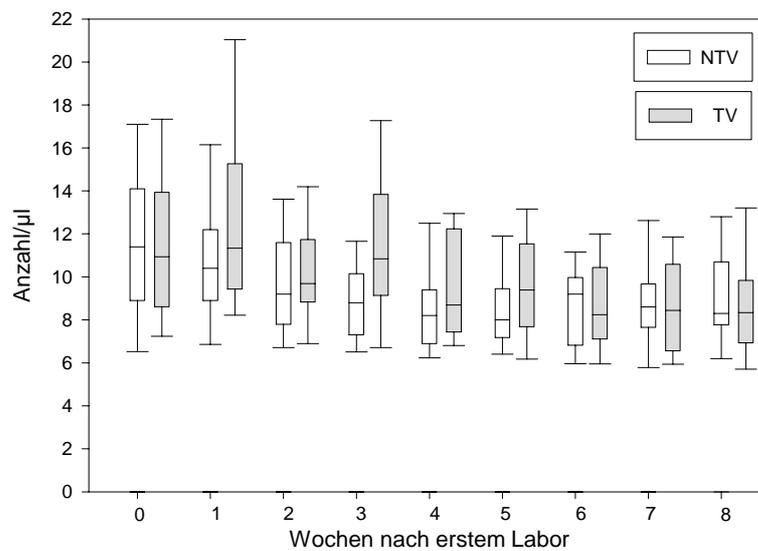


Abb.19: Leukozyten im Vergleich NTV/TV

5.4.3. Thrombozyten

Der Thrombozytenverlauf aller Kinder weist zwischen der zweiten und dritten Woche einen signifikanten Abfall ($p=0,003$) der Thrombozyten auf (Abb. 20).

Auch in der Gruppe der NTV findet sich zwischen diesen Wochen eine signifikant sinkende Thrombozytenkonzentration ($p= 0,011$).

Bei den TV hingegen zeigt sich innerhalb der ersten Therapiewoche ein signifikanter Abfall der Thrombozytenzahlen von im Median $409/\mu\text{l} \times 10^6$ vor Therapiebeginn auf im Median $325/\mu\text{l} \times 10^6$ nach einer Woche ($p=0,036$).

Zwischen den einzelnen Gruppen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 21).

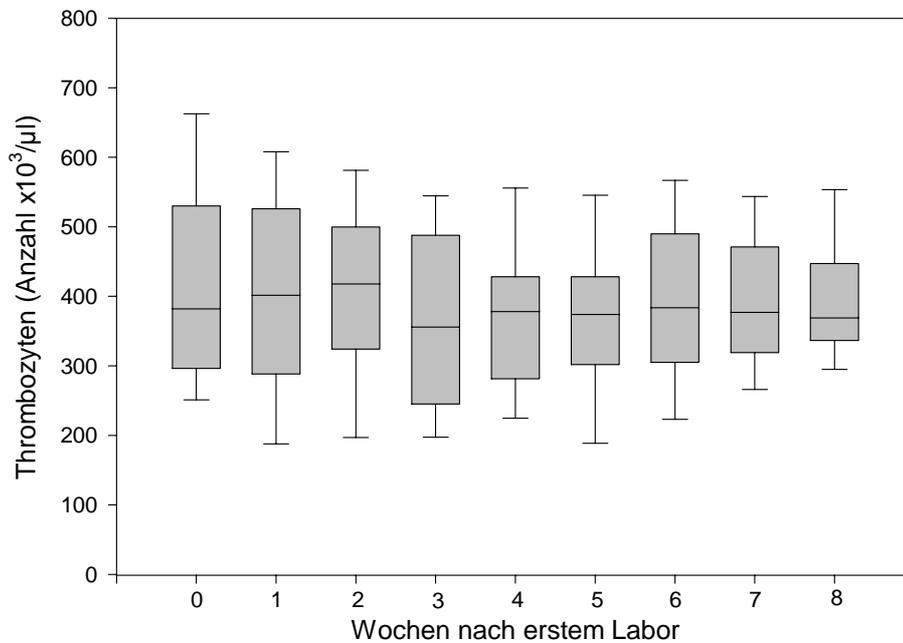


Abb.20: Thrombozytenverlauf der 83 Frühgeborenen

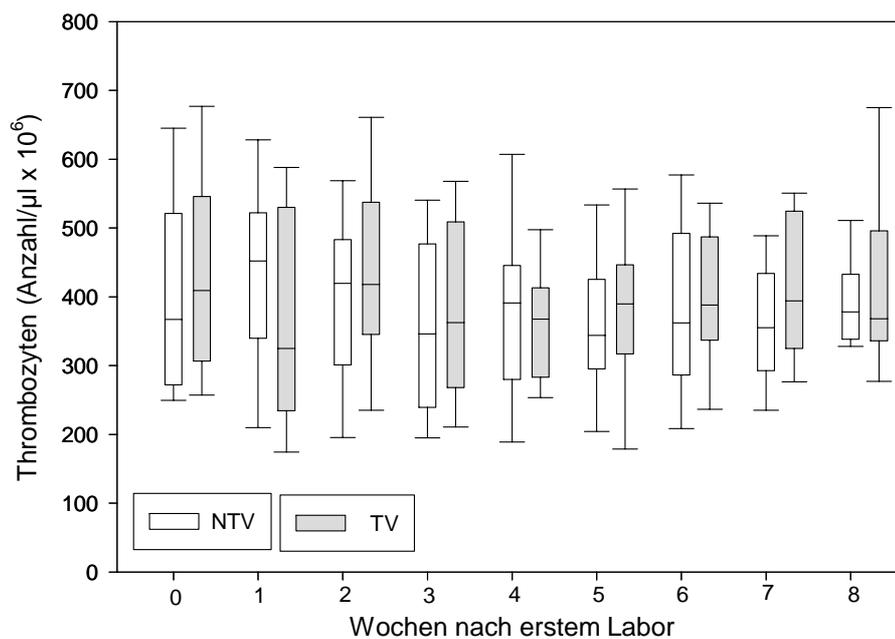


Abb.21: Thrombozyten im Vergleich NTV/TV

5.5. Auftreten von oxidativem Stress

5.5.1. TRAP

Die antioxidativen Eigenschaften im Blut der Therapieteilnehmer wurden anhand der TRAP-Messung untersucht. Bei der Betrachtung der Abb. 22 lässt sich ein Nachlassen der antioxidativen Eigenschaften vermuten. Ein signifikanter Unterschied lässt sich jedoch statistisch nicht feststellen. Auch der Verlauf beider einzelner Gruppen erbringt keine signifikanten Veränderungen.

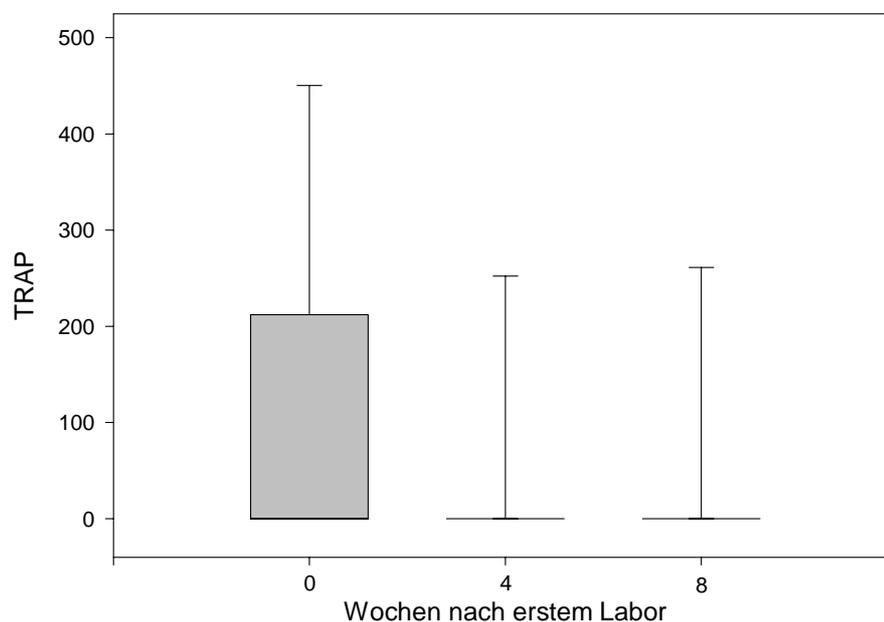


Abb.22: TRAP im Verlauf aller 83 Frühgeborenen

5.5.2. Malondialdehyd

Die Malondialdehydkonzentration im Blut der Frühgeborenen als Marker für Lipidoxidation verändert sich vom Therapiebeginn ($0,7 \mu\text{mol/l}$) bis zum Therapieende nach acht Wochen ($0,69 \mu\text{mol/l}$) nur minimal.

Auch ein Vergleich beider Gruppen (Abb. 23) ergibt keine signifikanten Unterschiede ($p=0,052$), obwohl es scheint, dass die Malondialdehydkonzentration bei den NTV im Vergleich zu den TV tendenziell ansteigt, während die Konzentration bei den TV eher sinkt (Median NTV in der Woche 8: $0,84 \mu\text{mol/l}$; Median TV in der Woche 8: $0,54 \mu\text{mol/l}$).

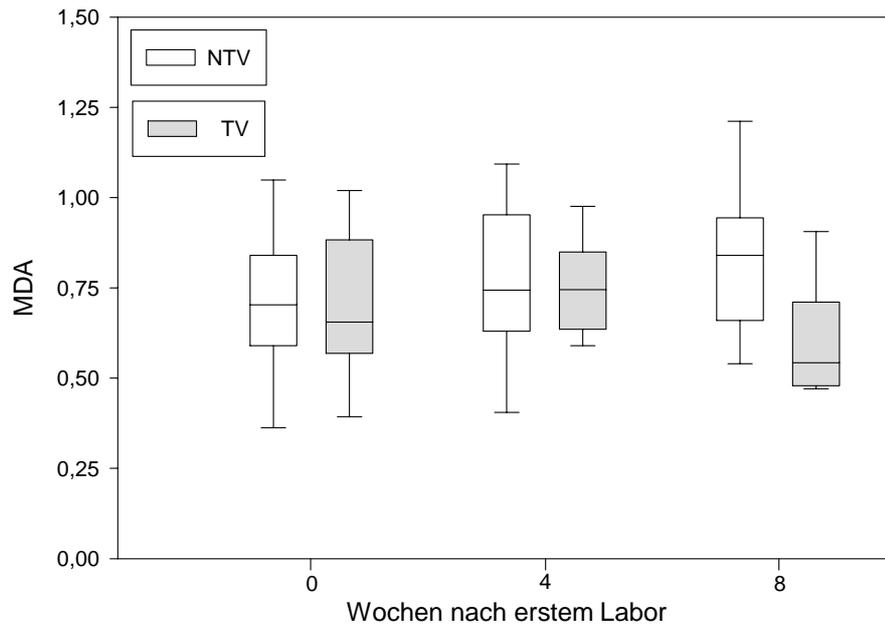


Abb.23: Malondialdehyd im Vergleich NTV/TV

5.5.3. Cholesterin

Innerhalb der ersten vier Wochen zeigen alle 83 Frühgeborenen einen signifikanten Abfall der Cholesterinkonzentration im Blut ($p=0,003$). Während am Therapieanfang noch Werte von 113,5 mg/dl (Median) gemessen werden, lassen sich nach vier Wochen nur noch 102,5 mg/dl Cholesterin (Median) nachweisen. Der weitere Verlauf zeigt keine wesentlichen Konzentrationsveränderungen (Abb. 24).

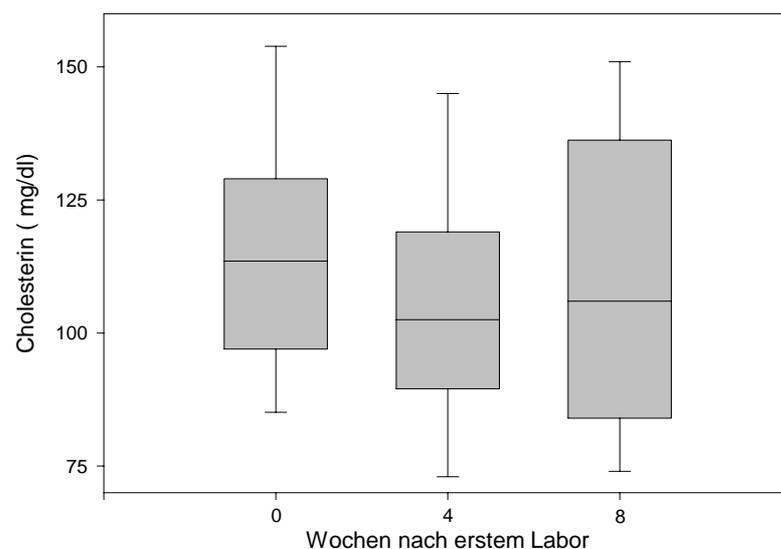


Abb.24: Cholesterinkonz. der 83 Frühgeborenen

Auch die Gruppe der NTV zeigt innerhalb der ersten vier Therapiewochen einen signifikanten Abfall der Cholesterinkonzentration ($p=0,005$).

In der Gruppe der TV lassen sich im Therapieverlauf keine signifikanten Änderungen verzeichnen.

Ein direkter Vergleich beider Gruppen (Abb. 25) vor Beginn der Therapie zeigt jedoch einen signifikanten Unterschied ($p=0,027$). Die Cholesterinwerte der NTV liegen deutlich über denen der TV (Median NTV: 119 mg/dl; Median TV: 99,5 mg/dl).

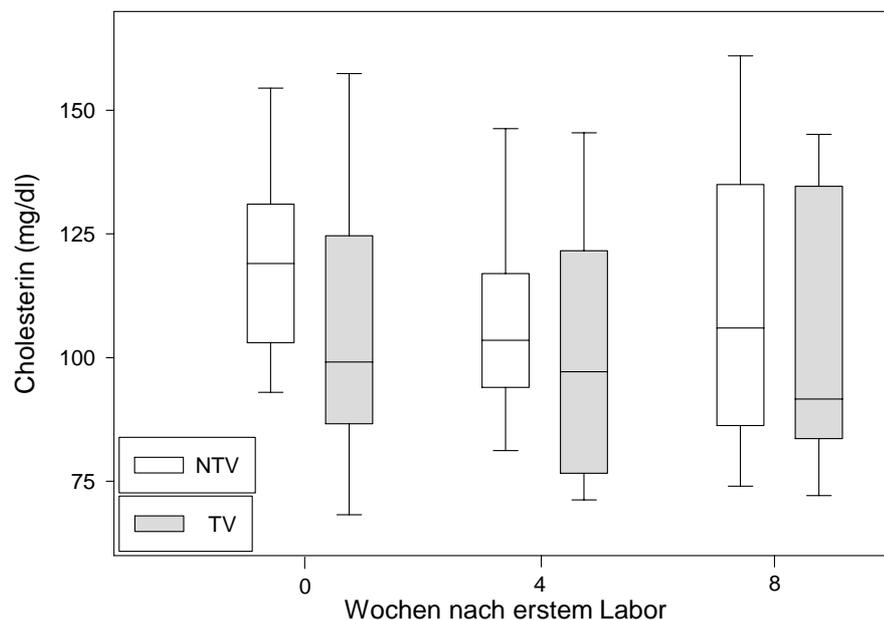


Abb.25: Cholesterinkonz. im Vergleich NTV/TV

5.5.4. Radikalresistenz

Die Hämolyseeigenschaften, bzw. die Widerstandskapazität der Erythrozyten gegenüber freien Radikalen wurde in dieser Arbeit mit dem ABAP-Hämolysetest untersucht.

Der Verlauf der Hämolyseeigenschaften des Blutes der 83 Frühgeborenen innerhalb der ersten vier Wochen zeigt einen signifikanten Anstieg der Radikalresistenz T50% (Min) von im Median 86 auf 105 ($p<0,001$).

Auch der Verlauf der NTV ($p=0,005$) und TV ($p=0,030$) einzeln betrachtet, ergibt vom Therapieanfang bis zur vierten Woche einen signifikanten Anstieg der Radikalresistenz. Der Verlauf beider Gruppen unterscheidet sich nicht voneinander.

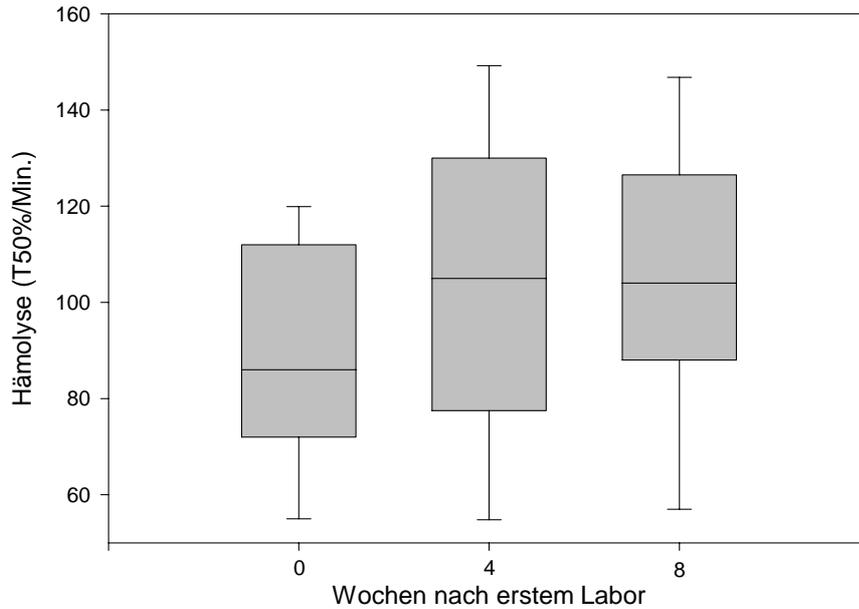


Abb.26: Radikalresistenz der 83 Frühgeborenen

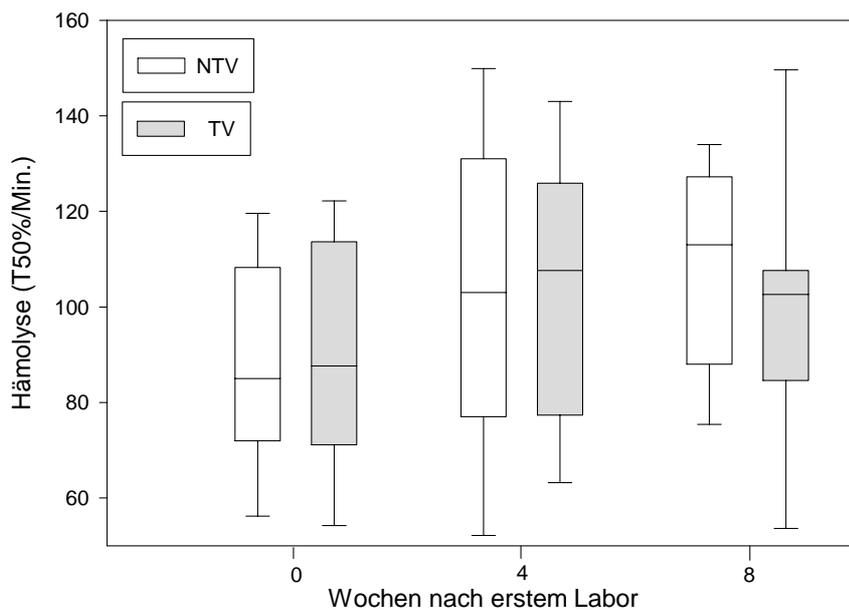


Abb.27: Radikalresistenz im Vergleich NTV/TV

5.5.5. Non-Transferrin-Bound-Iron (NTBI)

Die Abb. 28 zeigt das Vorhandensein von Non-Transferrin-Bound-Iron vor Therapiebeginn und nach 4 Wochen. Hieraus wird ersichtlich, dass es zu keinem vermehrten Auftreten des toxisch wirkenden, freien Eisens unter der rh-Erythropoietin-Therapie und Eisensubstitution kommt.

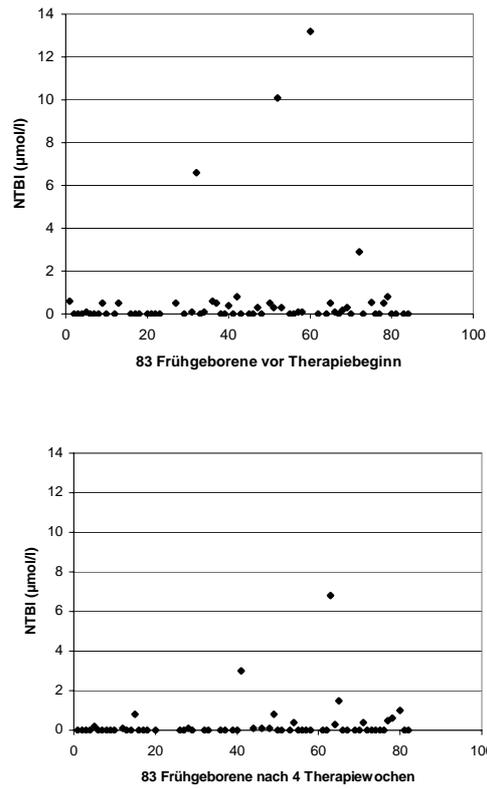


Abb.28: NTBI vor Therapiebeginn und nach 4 Therapiewochen bei 83 Frühgeborenen

Auch die Betrachtung beider Gruppen zeigt weder im Verlauf noch im Vergleich der Verläufe signifikante Unterschiede (Abb.29).

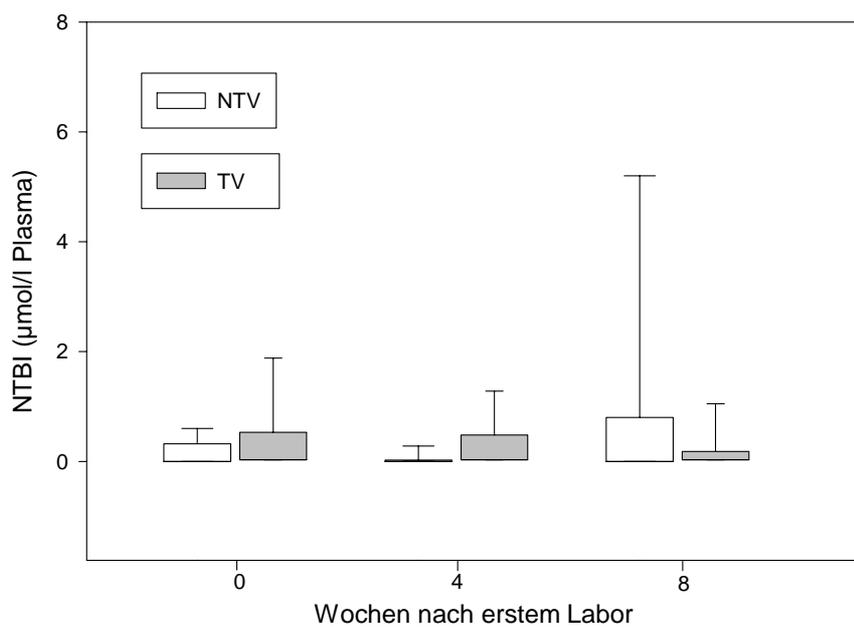


Abb.29: NTBI im Vergleich NTV/TV

5.6. Transfusionen während der Therapie

Die Einteilung der Frühgeborenen in so genannte Therapieversager und Nicht-Therapieversager erfolgte streng nach den Kriterien, ob eine Bluttransfusion nötig war und/oder die Hämoglobinkonzentration unter 8 g/dl abfiel.

Zwei der insgesamt 25 Therapieversager fielen mit ihrem Hb-Wert unter 8 g/dl. Klinisch waren beide Kinder so stabil, dass sie jedoch keine Erythrozytenkonzentrate benötigten. Eines der beiden Kinder fiel nach drei Wochen von einem Ausgangs-Hb von 9,1 g/dl auf 7,3 g/dl. Das andere Kind wies nach vier Wochen einen Hb-Abfall von zu Beginn 8,7 g/dl auf 7,6 g/dl auf.

Alle übrigen Kinder erhielten aufgrund einer klinischen Verschlechterung ein oder in sieben Fällen auch zwei Erythrozytenkonzentrate.

19 der insgesamt 25 Therapieversager erhielten die Transfusionen innerhalb der ersten beiden Therapiewochen.

Auffällig hierbei war das häufige Zusammenfallen vom Auftreten antibiotikapflichtiger Infektionen und der anschließenden Gabe von Erythrozytenkonzentraten. 17 der 25 Therapieversager litten im Verlauf an einer Infektion. Eines der Frühgeborenen erkrankte während des Untersuchungszeitraums zweimal an einer Infektion.

Die Erythrozytenkonzentrate wurden in dem Zeitraum zwischen der ersten Antibiotikagabe bis maximal sechs Tage nach Diagnosestellung der Infektion transfundiert (Tab. 4).

<u>Erythrozytengabe</u>	<u>Häufigkeit</u> (absolut)	<u>Häufigkeit</u> (relativ) gerundet
mit Beginn der Antibiose	6	33%
nach 1 Tag	5	28%
nach 2 Tagen	1	6%
nach 3 Tagen	1	6%
nach 4 Tagen	1	6%
nach 5 Tagen	2	11%
nach 6 Tagen	2	11%

Tab. 4: Häufigkeitsverteilung der Erythrozytentransfusion nach Infektionsbeginn in Tagen

5.7. Infektionen während der Therapie

Insgesamt 26 aller 83 Frühgeborenen erkrankten im Verlauf der Epo-Behandlung an einer antibiotikapflichtigen Infektion. Auffallend war, dass 73 % aller Infektionen innerhalb der ersten zwei Wochen auftraten.

Betrachtet man nun die Verteilung der erkrankten Kinder auf die beiden Gruppen, fällt auf, dass von 25 Therapieversagern insgesamt 17 Kinder an einer antibiotikapflichtigen Infektion litten.

In der Gruppe der 58 Nicht-Therapieversager waren insgesamt neun Frühgeborene betroffen.

Betrachtet man das zeitliche Auftreten der Infektion, fällt zunächst bei den 17 erkrankten Therapieversagern auf, dass 14 von ihnen innerhalb der ersten zwei Epo-Therapiewochen antibiotisch behandelt werden mussten (82 %). Nur drei Patienten erlitten erst im weiteren Verlauf eine Infektion.

In der Gruppe der erkrankten neun NTV bedurften immerhin fünf von ihnen innerhalb der ersten beiden Therapiewochen einer antibiotischen Therapie (55%).

Um zu überprüfen, ob es signifikante Unterschiede im Auftreten einer Infektion und dem Vorliegen eines Therapieversagens gibt, wurde ein Fisher-Test durchgeführt.

Dieser Test wird hauptsächlich bei Vierfeldertafeln mit kleinen Randsummen verwendet und stellt eine Alternative zum χ^2 – Vierfeldertest dar. Er dient der Analyse von Häufigkeitsunterschieden bezüglich der Ausprägungen eines oder mehrerer Merkmale (Tab.5).

	NTV	TV	
Inf.	9	17	26
keine Inf.	49	8	57
	58	25	83

Tab.5: Fisher-Test: Signifikanzprüfung bzgl. des Auftretens einer Infektion und dem Vorliegen des Therapieversagens

Das Auftreten von Infektionen in der Gruppe der Therapieversager ist signifikant höher als das Auftreten von Infektionen bei Nichttherapieversagern ($p < 0,001$).

5.8. Zusammenhänge zwischen Therapieversagen und Verlaufsparemtern

Der Zusammenhang zwischen dem Therapieversagen und verschiedenen Verlaufsparemtern wurde in dieser Arbeit mit Hilfe einer logistischen Regression untersucht.

Hierbei wurde das Therapieversagen in Beziehung zum Geschlecht, der SSW, dem Geburtsgewicht, dem Vorliegen einer Infektion, dem Ausgangswert vom Hämoglobin, von den Leukozyten, vom Serumeisen und von den Retikulozyten sowie zum Wachstum der Kinder in der ersten Woche gesetzt.

Es ergab sich kein Zusammenhang zwischen einem Therapieversagen und dem Geschlecht, der SSW, dem Geburtsgewicht, dem Wachstum sowie den Leukozyten-, Serumeisen- und Retikulozytenwerten.

Zwischen dem Auftreten eines so genannten Therapieversagens und einer Infektion sowie zwischen dem Auftreten eines Therapieversagens und der Hämoglobinkonzentration zu Beginn der Therapie konnten hingegen signifikante Zusammenhänge nachgewiesen werden.

Variablen in der Gleichung

	Signifikanz (Sig.)	Odd`s Ratio (Exp(B))	95% Konfidenzintervall für Exp (B)	
			Unterer Wert	Oberer Wert
Infektion	.000	86.811	9.085	829.509
Hämoglobin (g/dl)	.000	.327	.175	.614

1. Frühgeborene, die unter Therapie eine Infektion bekommen, haben ein drastisch erhöhtes Risiko, zu einem so genannten Therapieversager zu werden. Ihr Risiko ist bei einem Konfidenzintervall von 9 bis 829 um ca. 80fach erhöht.

2. Von zwei Kindern hat dasjenige ein drastisch erhöhtes Risiko ein Therapieversager zu werden, das einen um 1 g/dl niedrigeren Ausgangs-Hämoglobinwert hat.

6. Diskussion

Die Anämie von Früh- und Neugeborenen ist nach der chronischen Niereninsuffizienz ein zweites, wichtiges Indikationsgebiet, bei dem eine Substitutionstherapie mit rh-Erythropoietin möglich ist.

Der Transfusionsbedarf von Frühgeborenen stellt trotz aller Bemühungen um Minimierung iatrogenen Blutverluste ein relevantes Problem dar. Eine Möglichkeit, die Blutbildung dieser kleinen Patienten durch rh-Erythropoietin-Gabe zu stimulieren, bedeutet deshalb einen wesentlichen Fortschritt.

Rekombinant hergestelltes Erythropoietin gehört seit ungefähr 14 Jahren zu der Behandlung der Frühgeborenenanämie. Es gilt als potentes Mittel zur Steigerung der Erythropoese und Reduktion der Transfusionsmenge.

In der Perinatalphase ist das Ansprechen der endogenen Erythropoietinproduktion auf einen Hämoglobin-Abfall vermindert. Eine wesentliche Rolle hierbei spielt das noch unreife erythropoetische System. Auch die Verlagerung der EPO-Produktion von der Leber in die Nieren zählt als eine weitere Ursache.

Erythrozytenkonzentrate stellen eine allgemeine Form der Behandlung der Frühgeborenenanämie dar. Es wird geschätzt, dass ungefähr 80% der intensivpflichtigen Kinder ein Erythrozytenkonzentrat während ihrer Behandlung erhalten, ungefähr 37% sogar mehr als zwei. Des Weiteren fand man heraus, dass jedes Kind, das mehr als eine Transfusion bekommt, durchschnittlich das Blut von 4,9 Spendern erhält (100). Bluttransfusionen bergen nicht nur die Gefahr von Infektionsübertragung, wie beispielsweise HIV und Hepatitis, sondern auch die Übertragung im Konzentrat verbliebener Spenderleukozyten. Bluttransfusionen führen aber auch zu einem Anstieg der korporalen Eisenmenge und könnten so zu einer Entstehung freier Radikale und den damit assoziierten Erkrankungen führen.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl der Erythrozytentransfusionen gegeben werden müssen, um die Blutverluste durch iatrogene Entnahmen wieder aufzufüllen (61).

Alle Studien zeigen aber, dass rh-EPO ein potentes Mittel ist, den Transfusionsbedarf Frühgeborener zu reduzieren.

Es existieren mittlerweile jedoch auch kritische Äußerungen zum Einsatz von rh-Erythropoietin. Auch wenn die Effizienz der Behandlung mit rh-Epo vielfach demonstriert werden konnte, sind die Ergebnisse bei sehr kleinen Frühgeborenen teilweise unbefriedigend, da die Notwendigkeit von Transfusionen nach wie vor eine große Rolle spielt (80).

Auch Strauss hat die Effektivität der Behandlung der Frühgeborenenanämie mit rh-Erythropoietin im Vergleich zu Bluttransfusionen in Frage gestellt. Seiner Meinung nach bleiben Erythrozytenkonzentrate nach wie vor Behandlungsstandard der Anämie. Rh-Erythropoietin und Eisen bieten allenfalls eine Alternative oder Kombinationsmöglichkeit (93).

In vielen Studien wurde gezeigt, dass relativ große und stabile Frühgeborene am besten auf eine Behandlung mit rh-EPO ansprechen. Aber es sind gerade diese Kinder, die im Verlauf in der Regel nur ein geringes Risiko haben, eine Bluttransfusion zu erhalten. Sehr kleine und kranke Kinder benötigen dagegen häufig kurz nach der Geburt Bluttransfusionen. Diese Patienten zeigen insgesamt nur geringe Effekte der rh-EPO-Therapie. Strauss ist der Ansicht, dass sich aufgrund fehlender Informationen bezüglich Effizienz und potentieller Toxizität von Erythropoietin und Eisen die Behandlung als Standardtherapie ausschließt (93).

Tatsächlich bleiben trotz vieler durchgeführter Studien weiterhin Fragen bezüglich der optimalen Dosierung von rh-Erythropoietin und Eisen sowie bezüglich des optimalen Behandlungsbeginns offen (80).

Bei den Frühgeborenen sind in Relation zum Körpergewicht höhere Dosen erforderlich als bei Erwachsenen. Diese Tatsache ist jedoch nicht gleichbedeutend mit einem schlechteren Ansprechen des Knochenmarks auf Erythropoietin. Die Abbaurate sowie das Verteilungsvolumen von Erythropoietin liegen bei Neugeborenen höher als bei Erwachsenen.

In Bezug auf Studienaufbau, rh-EPO-Dosierung, Eisensubstitution, Geburtsgewicht, Alter bei Therapiebeginn und klinischem Zustand der Frühgeborenen findet sich in den zahlreichen EPO-Studien eine große Variabilität.

In drei Studien betrug das Geburtsgewicht aller Frühgeborenen weniger als 1000 g. In 6 anderen Studien lag das Geburtsgewicht bei 50 % der Frühgeborenen unter 1000 g. Fünf weitere Studien beinhalteten nur ca. 25-50 % der Kinder mit einem Geburtsgewicht von unter 1000 g. In vielen Studien betrug der Anteil der Frühgeborenen mit einem Gewicht weniger als 1 kg weniger als 25 % (96).

Die wöchentliche Gabe von rh-Erythropoietin differiert in den unterschiedlichen Studien zwischen 70 IE/kg/Woche und 1400 IE/kg/Woche (62, 65).

Das Alter der Frühgeborenen bei Therapiebeginn variiert vom ersten Lebenstag bis hin zum siebzigsten (64, 65).

In zwei Studien wurde Eisen intravenös verabreicht (14, 56). Sieben Studien behandelten die Frühgeborenen mit einer hohen oralen Eisensubstitution von 6 mg/kg/Tag oder mehr. In der

Mehrzahl der Studien wurde jedoch Eisen in moderaten Dosierungen von 2-4 mg/kg/Tag per os eingesetzt (96).

Die Behandlung der Frühgeborenen in einer Studie von Shannon et al. begann drei Wochen postpartal, sobald die Kinder klinisch stabil waren. Verabreicht wurde eine wöchentliche Dosis von 500 IE/kg rh-EPO. In der Zeit vor dem Behandlungsbeginn benötigten die Frühgeborenen jedoch im Durchschnitt 3,5 Transfusionen. Es stellte sich schnell die Frage nach einem früheren Therapiebeginn bereits in den ersten Lebenstagen (86).

In einer Studie von Ohls et al. mit Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht < 1250 g wurde die Effizienz der Behandlung bei einer Kombination aus frühzeitiger (vier Tage postpartal) rh-EPO-Gabe von 1200 IE/kg/Woche und Eisen überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass es im Therapieverlauf zu einer gesteigerten Erythropoese mit erhöhten Retikulozytenzahlen und höherem Hämatokrit kam. Eine Auswirkung auf die Transfusionshäufigkeit konnte jedoch nicht bewiesen werden (68). Eine andere Studie konnte jedoch bei Frühgeborenen mit einem Gewicht unter 1000 g eine Reduktion von Transfusionen bei frühzeitiger rh-Epo- und enteraler Eisensubstitution nachweisen. Begonnen wurde hierbei zwischen dem fünften und dem vierzigsten Tag mit 750 U/kg/Woche rh-Epo und einer Eisensubstitution von 2 bis 6 mg/kg/Tag (95).

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von rh-Epo und hochdosierter Eisengabe auf die Erythropoese Frühgeborener zu untersuchen. Es ging dabei in erster Linie um die Frage der optimalen Eisendosierung. Untersucht wurden unter anderem, mögliche Nebenwirkungen, Auswirkungen auf das Serumeisen und die Eisenspeicher sowie das Auftreten von freiem Eisen im Plasma. Es wurden weiterhin mögliche Ursachen für die Notwendigkeit von Bluttransfusionen unter rh-Erythropoietin-Therapie gesucht und geprüft.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde keine Placebogruppe aufgestellt, da dies in Kenntnis der Wirkungen von rh-Epo und höheren Eisendosierungen weder erforderlich noch zu rechtfertigen schien, anämischen Frühgeborenen die Nutzung dieses Medikamentes vorzuenthalten.

Eine dieser Arbeit vorangehende Studie zur Prophylaxe der Frühgeborenenanämie ohne Erythropoietingabe zeigte einen deutlichen Hb-Abfall vom Zeitpunkt der Geburt bis zur Entlassung (42).

Bei kleinen Patientenzahlen ist es nicht unproblematisch, statistische Tests durchzuführen. Deshalb müssen die Ergebnisse vorsichtig interpretiert werden. Nicht immer konnten die anstehenden Blutentnahmen exakt zu den festgelegten Zeitpunkten erfolgen. Gelegentlich kam es vor, dass die Entnahmen mit 1-2 Tagen Verzögerung stattfanden.

In dieser Arbeit gab es bezüglich des Therapiebeginns keine festen Vorgaben. Bedingungen waren zum einen eine Beendigung der maschinellen Beatmung der Frühgeborenen sowie der Ausschluss einer schweren Infektion. Das Alter der Frühgeborenen bei Therapiebeginn variierte zwischen 7 und 81 Tagen.

42% aller Frühgeborenen hatten ein Geburtsgewicht unter 1000 g. Die Spanne reichte von 445 g bis 2300 g bei Geburt. Im Mittel wogen die Frühgeborenen 1030 g.

Alle Frühgeborenen erhielten Erythropoietin in einer Dosierung von 1000 IE/kg/Woche. Verabreicht wurden die Einheiten in drei Einzeldosen. Im Vergleich zu vorherigen Studien liegt die Dosierung des rh-Erythropoietin im oberen Bereich. Es wurde gezeigt, dass Dosierungen von 300-1200 IE/kg/Woche erforderlich waren, um zu einem signifikanten Retikulozytenanstieg zu führen und den Transfusionsbedarf zu verringern (3, 55, 87).

Mit einem Retikulozytenanstieg nach Epo-Gabe ist laut Ehmer et al. nach ungefähr 2-3 Tagen zu rechnen (20). So konnte auch in dieser Arbeit ein deutlicher Anstieg der Retikulozytenzahlen um mehr als das Doppelte der Ausgangswerte nach bereits einer Woche gezeigt werden. Während der gesamten Zeit der rh-Erythropoietingabe blieben die Retikulozytenzahlen auf einem im Vergleich zum Ausgangswert hohen Level.

Ohls et al. zeigte in einer randomisierten, kontrollierten Studie deutlich höhere Hämatokritwerte in einer mit Erythropoietin behandelten Gruppe als in der Placebo-Gruppe. Die Retikulozytenwerte stiegen in der Epo-Gruppe ebenfalls deutlich an und blieben bis zum Ende der Studie erhöht (68).

Eine Messung der Hämoglobinkonzentrationen im Verlauf der Epo-Therapie in dieser Studie ergab insgesamt konstante Werte. Bezogen auf den Ausgangswert kam es innerhalb der ersten beiden Wochen zu einem Abfall der Hämoglobinkonzentration. Anschließend stiegen die Konzentrationen wieder an, wobei es in Bezug auf den Ausgangswert weder zu einer Steigerung noch zu einem Abfall kam.

Der anfängliche Hb-Abfall liegt vermutlich an dem verzögerten Wirkeintritt des rh-Erythropoietins. Ein Anstieg des Hämoglobins ließ sich auch bei Ehmer et al. erst nach ungefähr einer Woche feststellen (20).

Frühgeborene haben bezogen auf ihr Geburtsgewicht prozentual einen größeren täglichen Gewichtszuwachs als reif geborene Kinder. Mit zunehmendem Gewicht expandiert das Blutvolumen.

Die Expansion des Blutvolumens ist bei Frühgeborenen im Vergleich zu reifen Babys wesentlich größer. Die Vermehrung des Blutvolumens findet jedoch zu einem Zeitpunkt statt, in dem die Frühgeborenen zusätzlich einer großen Zahl an Blutentnahmen ausgesetzt sind.

Einige Autoren beschreiben eine gegensinnige Korrelation zwischen dem Auftreten einer Anämie und dem Gestationsalter sowie einem niedrigen Geburtsgewicht. Kausale Zusammenhänge konnten aber bislang nicht bewiesen werden.

In den meisten kontrollierten Studien mit rh-EPO fand sich kein Unterschied in der Gewichtszunahme zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe (3, 21, 84, 87).

In zwei Studien nahmen die mit rh-Erythropoietin behandelten Frühgeborenen weniger an Gewicht zu als die Kontrollkinder. Shannon et al. gaben den Kindern eine EPO-Dosis von 500 bzw. 1000 IE/kg/Woche (85) und Maier et al. therapierten mit einer Dosierung von 750 IE/kg/Woche (49).

Die Ursache für den geringeren Gewichtszuwachs ist unklar. Spekuliert wird, dass die gesteigerte Erythropoese zu einem vermehrten Verbrauch von Eiweiß, Vitaminen und Kalorien führt, der durch die Ernährung nicht adäquat gedeckt war.

Eine Studie von Brown et al. belegte hingegen, dass Kinder, die während der rh-EPO-Behandlung ausreichend Proteine für eine stetige Gewichtszunahme erhalten, ebenfalls ausreichend mit Proteinen versorgt sind, um eine suffiziente Erythropoese zu betreiben. Hierbei korreliert eine Menge von 3,1 – 3,5 g/kg/Tag zugeführtem Protein mit steigenden Retikulozytenzahlen. Eine weitere Steigerung der Proteinzufuhr führt hingegen zu keiner Steigerung der Erythropoese (12).

Im Rahmen dieser Arbeit erhielten die Frühgeborenen eine tägliche Proteinzufuhr von 3,1-3,5 g/kg/Tag. Ernährt wurden die Frühgeborenen oral oder sollten mit dem Aufbau der oralen Ernährung begonnen haben.

Im Rahmen der normalen Vitaminszufuhr erhalten die Kinder täglich 25 mg Vitamin E als Radikalfänger.

In dieser Studie ließ sich in Bezug auf die tägliche Gewichtszunahme weder eine signifikante Steigerung noch Abnahme nachweisen. Die Gewichtszunahme war konstant.

Pathak et al. prüften den Effekt von Vitamin E im Rahmen der rh-Erythropoietintherapie und Eisengabe. Es wurde die Auswirkung auf die Hämoglobinkonzentration und die Notwendigkeit von Bluttransfusionen bei Frühgeborenen überprüft. Trotz Dosierungen von 50 IE/Tag Vitamin E im Gegensatz zu keiner Substitution fand sich weder eine Auswirkung auf die Hämoglobinkonzentration noch auf die Retikulozytenzahlen, die Transfusionshäufigkeit oder die

Eisenkonzentration. Das in der Nahrung enthaltene Vitamin E scheint demnach ausreichend zu sein (73).

Nichts desto Trotz fungiert Vitamin E als wirksames Antioxidanz. Aus diesem Grund wird eine Eisensubstitution häufig mit einer Vitamin E-Gabe kombiniert.

Eine wesentliche Frage bei der Behandlung mit rh-EPO ist die Höhe der oralen Eisensubstitution.

Die Kinder produzieren eine große Menge an Hämoglobin. Für jedes Gramm Hämoglobin werden 3,47 mg elementares Eisen benötigt. Dabei verbrauchen Frühgeborene die größten Mengen ihres zur Verfügung stehenden Eisens für die Erythropoese.

Drei Studien haben die Substitution mit 2-6 mg Eisen pro Kilogramm Körpergewicht vorgeschlagen (49, 55, 86). Trotzdem stellten alle drei Studien einen Abfall des Serumferritins fest. Auch Nazir et al. führte eine vergleichende Studie zweier Eisendosierungen durch. Die Frühgeborenen erhielten 1200 IU/kg/Woche rh-Erythropoietin und entweder 6 oder 12 mg/kg/Tag Eisen. Es kam auch hier zu einem Abfall des Serumferritins und der Transferrinsättigung, wobei es zwischen beiden Gruppen keinen Unterschied gab. Da zu Beginn der Studie die Ferritinwerte gleich waren, lag der Schluss nahe, dass das zusätzliche Eisen bei doppelter Dosierung entweder nur vermindert absorbiert, nicht verwertet oder anderweitig genutzt wurde.

Es konnte bei doppelter Dosierung keine weitere Steigerung der Erythropoese gezeigt werden (59).

Der Vergleich einer oral hochdosierten Eisengabe mit der intravenösen Gabe zeigte ähnliche Verläufe des Hämatokrits und der Retikulozytenwerte sowie eine vergleichbare Transfusionsrate. Ein entscheidender Unterschied wurde jedoch in Bezug auf die Ferritinkonzentration festgestellt. Bei Frühgeborenen, die Eisen intravenös erhielten, blieben die Ferritinkonzentrationen gleich, während sie in der oral substituierten Gruppe abfielen. Auch die tägliche Gewichtszunahme war größer als in der Gruppe der oral Substituierten. Insgesamt wurden beide Dosierungen gut vertragen und führten zu einer suffizienten Erythropoese (56).

Die Frühgeborenen in dieser Arbeit erhielten zunächst eine Eisensubstitution mit 2 mg/kg/Tag per os, die bei guter Verträglichkeit zweitäglich auf bis zu 6 mg/kg/Tag gesteigert wurde. Die Messung des Serumeisens im Verlauf ergab interessanterweise einen signifikanten Abfall in der ersten Therapiewoche. Bezogen auf den Ausgangswert ließ sich sogar innerhalb der ersten vier Wochen ein signifikanter Abfall verzeichnen. Hierbei lagen die Werte trotz hoher Eisensubstitution stets im unteren Normbereich. Durch die Stimulation der Erythropoese mit rh-Erythropoietin werden große Mengen an Serumeisen benötigt. Die den Frühgeborenen zur Verfügung stehende Menge scheint hierbei nur sehr begrenzt zu sein.

Auch die Eisenspeicher leerten sich zusehends im Laufe der Therapie. Das Serumferritin veränderte sich schnell unter Epo-Behandlung. Im gesamten Verlauf kam es zu einem drastischen Abfall des Ferritins auf ungefähr ein Drittel des Ausgangswertes.

Bislang gibt es keine perfekte Methode den individuellen Eisenstatus zu bestimmen.

Die am häufigsten verwendete Methode ist die Bestimmung des Ferritins. Doch scheint diese Bestimmung für eine Aussage bezüglich der Eisenspeicher von Frühgeborenen nur indirekt beweisend zu sein. Zusätzlich kann Serumferritin während einer Infektion falsch erhöht sein.

Nach Meinung von Griffin et al. wäre die Bestimmung des Zinkprotoporphyrins zur Beurteilung des Eisenhaushaltes wesentlich billiger und schneller.

Zinkprotoporphyrin wird fluorometrisch bestimmt und als Verhältnis pro Mol Häm angegeben. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine umgekehrte Korrelation zwischen Ferritin und Zinkprotoporphyrin besteht. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass die Bestimmung des Zinkprotoporphyrins sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern sensitiv zum Nachweis eines Eisenmangels benutzt werden kann.

Dieser Parameter wäre als Screeningmethode gut geeignet, da die Bestimmung billig und brauchbar ist und vor allem aus einem Tropfen Blut erfolgen kann (31).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es zu einer deutlichen Steigerung des Zinkprotoporphyrins auf das Dreifache des Ausgangswertes kam. Eine statistische Prüfung zwischen dem Verlauf des Ferritins und dem Verlauf des ZPPs ergab einen gegensinnigen Zusammenhang beider Parameter.

Diese Ergebnisse unterstreichen die Aussagekraft des ZPPs in Bezug auf die Eisenspeicher im Körper. Auch scheint die Bestimmung aus nur einem Tropfen EDTA-Blutes für diese Methode zu sprechen, da im Rahmen einer Blutbildkontrolle ebenfalls EDTA-Blut verwendet wird.

Die Bestimmung des Ferritins erfolgt aus einem separat abgenommenen Serumröhrchen.

In-vitro-Studien und Tierversuche ergaben widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Frage, ob EPO die Granulopoese beeinflusst. Maier et al. zeigten eine hemmende Wirkung von hohen Epo-Dosierungen auf die Differenzierung neutrophiler Granulozyten aus weißen Vorläuferzellen (50).

Desypris et al. beobachteten hingegen bei erwachsenen Patienten mit renaler Anämie, dass rh-EPO die Vorläuferzellen der Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten stimuliert (17).

In Knochenmarkspunktaten Frühgeborener fanden Ohls und Christensen unter rh-EPO-Behandlung neben einer gesteigerten Erythropoese einen verringerten Speicherpool für neutrophile Granulozyten bei noch ausreichender Neubildung (63).

Einige kontrollierte Studien zeigten wiederum keinen Einfluss der rh-EPO-Behandlung auf die Zahl von neutrophilen Granulozyten oder Thrombozyten im Blut Frühgeborener (3, 14, 21).

Der Thrombozytenverlauf der Frühgeborenen dieser Studie zeigte zwischen der zweiten und dritten Woche einen deutlichen Abfall, verändert sich im Weiteren aber nicht.

Die Bestimmung der Leukozytenzahl zeigte ebenfalls einen signifikanten Abfall, jedoch zwischen den Wochen 1 und 2 und den Wochen 3 und 4.

Ob es hierbei einen Zusammenhang mit dem Auftreten von antibiotikapflichtigen Infektionen gibt, kann nicht bewiesen werden. Innerhalb der ersten zwei Therapiewochen traten jedoch 73% der Infektionen auf.

Man weiß, dass durch Eisen eine individuelle Modulation des Immunsystems möglich ist. Eisen spielt nicht nur eine Rolle beim Sauerstofftransport, der Desoxyribonukleinsäuresynthese oder einigen Redoxreaktionen, sondern auch im Rahmen immunologischer Verteidigungsmechanismen.

Granulozyten, Makrophagen, T- und B-Zelllymphozyten sowie natürliche Killerzellen können Eisen aufnehmen und speichern. Dabei unterscheiden sie sich zum einen in der Aufnahme und Speicherung des Eisens, aber auch bezüglich der Synthese und des Gebrauchs eisenbindender und eisenspeichernder Proteine.

Im Rahmen von Infektionen, aber vor allem bei chronischen Entzündungen, kommt es zu einer Eisenumverteilung mit relativer Überladung der Eisenspeicher bei gleichzeitiger, relativer Eisenunterversorgung der erythropoietischen Zellen. Transferrin ist bekanntermaßen ein Anti-Akute-Phase-Protein, dessen Synthese bei den genannten Erkrankungen als Folge eines entwicklungsgeschichtlichen Selektionsvorteils herunterreguliert wird (1, 74). Die Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Infektionen nimmt bei verminderter Verfügbarkeit von Transporteisen ab, da Bakterien und andere Infektionserreger zu ihrer Vermehrung ebenfalls in großem Umfang Eisen benötigen. Somit stellt die verminderte Verfügbarkeit von Eisen einerseits einen Schutzmechanismus, andererseits auch einen wesentlichen Pathomechanismus bei der Entwicklung einer Entzündungsanämie dar.

Es wurde gezeigt, dass ein Eisenverlust in Bakterienkulturen mit einer Wachstumshemmung assoziiert ist. Klinische Studien zeigten, dass ein Eisenexcess in Patienten das Risiko, an einer Infektion zu leiden, erhöht. Bakterien mit geringer Pathogenität wie beispielsweise *Yersinia enterocolitica*, die normalerweise zu kleineren gastrointestinalen Infektionen führen, können durch Eisenüberschuss im Patienten zu schwerer Sepsis, Darmperforation und multiplen Abszessen führen.

Auch die eisenbindenden Proteine scheinen eine Rolle in der humoralen Immunität zu spielen. In Abwesenheit ungesättigter eisenbindender Proteine führen Antikörper und Komplementfaktoren keine effiziente Opsonisierung von Bakterien durch (74).

Bei den Infektionen der Frühgeborenen dieser Studie handelte es sich um akut aufgetretene systemische Infektionen, die eine Therapie mit Antibiotika nötig machten.

Ein Kriterium für die Behandlung der Frühgeborenen mit rh-EPO war der Ausschluss einer Infektion. Man kann deshalb davon ausgehen, dass keines der Kinder bereits bei Therapiebeginn erkrankt war.

Trotzdem erkrankten fast zwei Drittel der Therapieversager in den ersten beiden Therapiewochen mit rh-EPO. Auffallend war zusätzlich, dass innerhalb der ersten beiden Therapiewochen 76% aller Transfusionen gegeben werden mussten.

Da die Mehrzahl der Transfusionen in den ersten beiden Tagen nach Auftreten der Infektion notwendig war und durchgeführt wurde, ist die Entwicklung einer Entzündungsanämie sehr unwahrscheinlich.

Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass es im Rahmen der neu aufgetretenen Infektion zu vermehrten Blutentnahmen gekommen ist. Nichts desto trotz ist eine infektassoziierte Hämolyse als Ursache nicht auszuschließen.

Die Frühgeborenen, die eine oder mehrere Bluttransfusionen benötigten und somit in dieser Arbeit per definitionem zu Therapieversagern wurden, erlitten im Vorfeld wesentlich häufiger behandlungsbedürftige Infektionen als die so genannten Nicht-Therapieversager. Das Auftreten von Infektionen in der Gruppe der Therapieversager war signifikant höher als das Auftreten von Infektionen bei Nicht-Therapieversagern. Ferner konnte in dieser Arbeit statistisch belegt werden, dass Frühgeborene, die unter der Therapie mit rh-EPO eine Infektion bekommen, ein wesentlich erhöhtes Risiko haben, eine Bluttransfusion erhalten zu müssen und so zu einem so genannten Therapieversager zu werden.

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die notwendige Gabe von Erythrozytenkonzentraten bei einigen Frühgeborenen unter rh-Erythropoietin nicht mit einem Versagen der hormonellen Stimulation begründet werden kann, sondern vielmehr mit dem zufälligen Auftreten von Infektionen vergesellschaftet ist.

Lediglich zwei Frühgeborene scheinen „echte“ Therapieversager zu sein. Sie wiesen unter der Therapie mit rh-Erythropoietin Hb-Werte unter 8 g/dl auf. Die Gabe von Erythrozytenkonzentraten war jedoch aufgrund des klinischen Zustandes der Kinder nicht notwendig.

Beide Kinder lagen schon zu Beginn der Therapie mit Ausgangswerten von 9,1 g/dl und 8,7 g/dl deutlich unter dem Durchschnitt.

In dieser Arbeit konnte außerdem nachgewiesen werden, dass ein weiteres Risiko, Transfusionen zu benötigen, ein im Vergleich um 1 g/dl niedrigerer Ausgangs-Hämoglobinwert birgt. Je schlechter die Ausgangsbedingungen für eine Therapie mit rh-Erythropoietin bezüglich der Hb-Konzentration sind, desto wahrscheinlicher ist die im Verlauf nachfolgende Bluttransfusion.

Ein Vergleich der beiden Gruppen zeigt, dass die so genannten Therapieversager deutlich niedrigere Ausgangs-Hämoglobinkonzentrationen aufwiesen, als die Nicht-Therapieversager. Auch bei Entlassung lagen die Nicht-Therapieversager mit ihren Hb-Werten über denen der so genannten Therapieversager.

Trotz Stimulation der Erythropoese mit rh-EPO kam es im Verlauf der Nicht-Therapieversager bezogen auf den Ausgangswert zu einem beobachtbaren Abfall des Hämoglobins. In der Gruppe der so genannten Therapieversager ließ sich dieser Abfall nicht finden. Ursache hierfür war wohl die im Therapieverlauf frühe Gabe von Erythrozytenkonzentraten.

Diese Gabe von Erythrozytenkonzentraten ist auch verantwortlich dafür, dass es in der Gruppe der Therapieversager in den ersten drei Wochen nur zu einer zögerlichen Steigerung der Eisensubstitution kam. Um eine Eisenüberladung nach Transfusion zu vermeiden, wurde die Eisengabe für 14 Tage ausgesetzt, was bezogen auf den Ausgangswert bei den Therapieversager auch nicht zu einem Abfall der Serumeisenkonzentration führte. Es fand sich nach vier Therapiewochen und der Gabe von mindestens einer Bluttransfusion ein signifikanter Anstieg des Serumeisens. Die gemessenen Werte lagen aber immer noch im unteren Normbereich.

Bei der Gesamtheit der Frühgeborenen kam es jedoch trotz hoher Eisendosierungen zu einem Abfall des Serumeisens unter rh-Erythropoietintherapie. Auch die unter Therapie stark abfallenden Ferritinkonzentrationen sowie das ansteigende Zinkprotoporphyrin sprechen für einen Eisenmangel, auch wenn die Behandlung der Frühgeborenenanämie mit Erythropoietin und gleichzeitiger oraler Eisengabe von 6-8 mg/kg Körpergewicht pro Tag das Risiko des Auftretens von NTBI und oxidativem Stress birgt.

Kommt es zu einer Eisenüberladung oder zu einem niedrigen Plasma-pH, wie beispielsweise während einer Ischämie, dissoziiert Eisen aus seiner Transferrinbindung und induziert die Bildung freier Radikale (47).

Aber auch gespeichertes Eisen ist potentiell gefährlich. Das Speicherprotein Ferritin reagiert sehr vulnerabel auf einen Angriff von Superoxidradikalen. So kommt es, dass freie Radikale die weitere Mobilisation von Eisen aus seiner Ferritinbindung induzieren. Eine kaskadenförmige weitere Eisenfreisetzung und erneute Produktion freier Radikale ist die Folge (53).

Eisen und Superoxide induzieren zu einer Lipidperoxidation und führen zu einer nachweislich zu einer Zerstörung von biologischen Membranen und DNA.

Dieser Mechanismus scheint ein Grund für die Entstehung von bronchopulmonaler Dysplasie, Frühgeborenenretinopathie, nekrotisierender Enterokolitis und intraventrikulären Einblutungen zu sein. Die Pathogenese dieser vier Erkrankungen ist komplex und bislang noch wenig erforscht. Reaktive Sauerstoffradikale spielen jedoch nachweislich eine bedeutende Rolle. Nach einer Hypoxie oder Ischämie mit anschließender Reperfusion beispielsweise reagieren entstandene Superoxide in Anwesenheit von Eisen im Sinne der Haber-Weiss-Reaktion und produzieren hoch reaktive Hydroxylradikale. Diese führen zur Zerstörung von DNA und Disulfidbrücken von Proteinen sowie zur Lipidperoxidation.

Ein weiterer Mechanismus ist die Aktivierung von Entzündungszellen.

Auch im Gehirn kann eine Ischämie mit nachfolgender Reperfusion zu entzündlichen Reaktionen führen. Die Aktivierung der Mikroglia führt zur Freisetzung von IL-1, IL-6, TGF und Fibroblasten-Growth-Factor. Diese wiederum dienen als Mediatoren für die Migration von Entzündungszellen in reperfundierte Gebiete (71). Hier kommt es vermittelt durch Cytokine zur weiteren Aktivierung von Leukozyten mit anschließender Bildung von Sauerstoffradikalen.

Frühgeborene haben nur sehr begrenzte Kapazitäten, um exogen zugeführtes Eisen zu assimilieren. Sie haben ein hohes Risiko, unter oxidativem Stress zu leiden. Ursache hierfür ist ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien.

Einige Studien wiesen das Auftreten von freiem Eisen im Plasma in einem hohen Prozentsatz von Neu- und Frühgeborenen nach (33). Auch Schemmel et al. konnten sowohl bei reifen als auch unreifen Neugeborenen in $\frac{2}{3}$ aller Fälle toxisches freies Eisen im Blut nachweisen (82). Die Bedeutung eines solchen Befundes für den Einzelfall ist jedoch noch unbekannt.

In einer weiteren Studie wurde eine erniedrigte Eisenbindungskapazität im Liquor Neu- und Frühgeborener gezeigt (32). Gleichzeitig fand man im Liquor als Ausdruck eines hohen Anteils an aktiviertem Eisen hohe Konzentrationen an Vitamin C bei niedrigen Coeruloplasminkonzentrationen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Behandlung der Frühgeborenenanämie mit Erythropoietin und Eisen nicht zum Auftreten von NTBI und oxidativem Stress führte.

Einige Studien beschäftigten sich mit der Messung der totalen antioxidativen Kapazität von Früh- und Neugeborenen im Nabelschnurblut.

In einer Studie von Rogers et al. wurde gezeigt, dass es eine Korrelation zwischen dem Gestationsalter und der antioxidativen Kapazität im Nabelschnurblut gibt. Keine direkte Verbindung ließ sich hingegen zwischen der antioxidativen Kapazität und mütterlichem Nikotingebrauch, Präeklampsie, Chorioamnionitis, Nabelschnur-pH oder dem Auftreten von Sauerstoffradikal-assoziierten Erkrankungen von Frühgeborenen darstellen (79).

Die TRAP im Nabelschnurblut ist das Ergebnis der gesamten intrauterinen Entwicklung.

Antioxidative Enzyme, wie die Superoxiddismutase, die Peroxidase, die Katalase und die Glutathionreduktase werden hingegen erst am Ende der Schwangerschaft in hohen Konzentrationen gebildet. Frühgeborene besitzen deshalb nur geringe Mengen an antioxidativen Enzymen bei häufig normalen Mengen an TRAP.

Während der ersten Lebensstage der Frühgeborenen ist die Verteidigung durch Antioxidantien gegen potentiell toxische freie Sauerstoffradikale somit reduziert.

In dieser Zeit findet sich aber eine physiologische Erhöhung der Serumbilirubinkonzentration.

So zeigten Bernhard et al. bereits 1954, dass das Bilirubin vor einer Destruktion durch oxidative Substanzen schützt und somit bei Frühgeborenen als Antioxidant fungiert (5).

Trotzdem stellt die neonatale Hyperbilirubinämie ein klinisches Problem dar, da Bilirubin in hoher Konzentration als potentiell toxisches metabolisches Produkt gilt. Begünstigt durch eine in den ersten Lebenstagen erhöhte Gefäßpermeabilität sowie Hypoxie und Hypoglykämie kann in Hirngewebe eingedrungenes indirektes Bilirubin zytotoxisch wirken und zu einer Gliose sowie einem Neuronenverlust führen.

Nichtsdestotrotz nimmt man an, dass das physiologisch ansteigende Serumbilirubin andere, zu diesem Zeitpunkt fehlende, antioxidative Enzyme ersetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass Bilirubin in physiologischen Konzentrationen Fettsäuren vor Oxidation schützt (91). Andere Studien belegten, dass der Anteil des Bilirubins an der totalen antioxidativen Kapazität rund 10% beträgt (26). In reifen Neugeborenen konnte eine direkte Korrelation zwischen dem Serumbilirubin und der totalen antioxidativen Kapazität festgestellt werden. Eine solche Korrelation bestand bei Frühgeborenen nicht. Eine andere Studie zeigte wiederum niedrige Serumbilirubinkonzentrationen bei Neonaten, die an einer von Sauerstoffradikalen induzierten Erkrankung litten. Man schloss daraus, dass Bilirubin durch Sauerstoffradikale verbraucht wird und somit eine Rolle als Antioxidant spielt (35).

Auch in dieser Arbeit lässt sich ein signifikanter Abfall des Bilirubins über den gesamten Verlauf nachweisen.

Malondialdehyd als Marker der Lipidperoxidation und die TRAP blieben unverändert. Das Cholesterin war im Verlauf der Therapie rückläufig und lag nach vier Wochen unter der Normgrenze.

Nachweislich zugenommen hat allerdings die Radikalresistenz der Erythrozyten im Verlauf. Man weiß, dass Erythrozyten im Nabelschnurblut reifer Neugeborener und Frühgeborener sensitiver auf oxidativen Streß reagieren als Erythrozyten Erwachsener. Boda et al. zeigten, dass es im Laufe der ersten Lebenswoche zu einem Anstieg der Radikalresistenz im Blut gesunder Neugeborener kommt. Ursächlich sind hier vermutlich die Induktion antioxidativer Enzyme, veränderte Lipidmoleküle der Erythrozytenmembran sowie steigende Level von mit der Nahrung aufgenommenen Antioxidantien (6).

Die Ergebnisse dieser Arbeit, in Kombination mit dem Wissen aus vorangegangenen Studien, beweisen, dass die Behandlung der Frühgeborenenanämie mit rh-Erythropoietin sinnvoll ist und Wirkung zeigt. Die Kombination aus rh-Erythropoietin und Eisen stimuliert die Erythropoese, hält die Hb-Werte auf höheren Leveln und führt bei Frühgeborenen nicht zum Auftreten unerwünschter Wirkungen.

Frühgeborene, die kein rh-EPO erhielten und „nur“ mit prophylaktischen Eisendosen und Vitamin B12 und Folsäure behandelt wurden, erlitten einen drastischen Abfall ihrer Hb-Konzentration.

Auch wenn es unter der Therapie mit rh-Erythropoietin zu einem Hb-Abfall kommt, so ist dieser wesentlich geringer und die Gabe von Erythrozytenkonzentraten deshalb häufig nicht notwendig.

Nichts desto trotz können Transfusionen in Einzelfällen nicht vermieden werden.

Niedrigere Ausgangshämoglobinkonzentrationen und Infektionen scheinen zwei entscheidende Faktoren für ein Versagen der Therapie mit rh-Erythropoietin zu sein.

Eine Therapie mit rh-Erythropoietin sollte demnach möglichst früh bei stabilen Frühgeborenen begonnen werden.

Ob ein größerer Therapieerfolg mit Steigerung der Erythropoese durch eine weitere Steigerung der Eisendosierung erzielt werden kann, ist fraglich. Es muss in nachfolgenden Studien untersucht werden, ob eine Steigerung der Eisendosierung in der Lage ist, den laborchemisch nachweisbaren Eisenmangel aufzufangen.

Außerdem muss diskutiert werden, ob eine Eisensubstitution mit initial intravenöser Eisengabe den unter Therapie entstehenden Eisenmangel verhindern kann.

Eine Substitution mit einer verhältnismäßig hohen Dosierung von 6 – 8 mg/kg KG/Tag oral führt nachweislich nicht zum Auftreten von freiem, toxischem Eisen.

7. Zusammenfassung

Frühgeborene sind häufig anämisch und viele benötigen innerhalb der ersten zwei Lebensmonate mindestens eine Bluttransfusion. Mit der Herstellung großer Mengen rekombinanten Erythropoietins wurde eine effiziente Behandlung der Frühgeborenenanämie gefunden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 83 Frühgeborene, die zwischen der 24. und 33. SSW und/oder mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g zur Welt kamen, mit 1000 E/kg/Woche Erythropoietin behandelt. Verabreicht wurde das rh-Epo in drei Einzeldosen entweder parenteral oder subkutan. Zusätzlich erhielten sie eine Eisensubstitution mit initial 2 mg/kg/Tag, die bei guter Verträglichkeit zweitäglich auf bis zu 6 – 8 mg/dl gesteigert wurde. Es wurden täglich 25 mg Vitamin E gegeben. Die Proteinzufuhr lag zwischen 3,1 – 3,5 g/kg/Tag.

Nach bereits einer Behandlungswoche kam es zu einem signifikanten Anstieg der Retikulozyten um mehr als das Doppelte der Ausgangswerte. Initial zeigte sich ein Abfall der Hämoglobinkonzentration, der nach drei Wochen jedoch wieder auf das Ausgangsniveau anstieg.

Bezogen auf den Ausgangswert des Serumeisens ließ sich in den ersten vier Wochen ein signifikanter Abfall beobachten. Auch die Eisenspeicher leerten sich im Verlauf der Therapie zusehends. Das Ferritin fiel signifikant ab. Zinkprotoporphyrin verhielt sich hierzu gegenseitig und stieg signifikant an. Die Eisensubstitution mit einer verhältnismäßig hohen Dosierung von 6 – 8 mg/kg/Tag schien einen Eisenmangel nach Stimulation der Erythropoese nicht verhindern zu können. Das Eisen wurde von allen Kindern gut vertragen und führte nachweislich nicht zum Auftreten von freiem, toxischem Eisen oder oxidativem Stress.

Insgesamt 26 aller 83 Kinder erkrankten im Verlauf an einer antibiotikapflichtigen Infektion. Dabei traten innerhalb der ersten zwei Therapiewochen 73% der Infektionen auf. Insgesamt 76% aller Bluttransfusionen, die trotz der rh-EPO-Therapie gegeben werden mussten, wurden innerhalb dieser Zeit verabreicht. Es konnte statistisch belegt werden, dass Frühgeborene, die unter Therapie eine Infektion bekommen, ein wesentlich erhöhtes Risiko haben, eine Bluttransfusion erhalten zu müssen. Ein weiteres Risiko, Transfusionen zu benötigen, birgt ein im Vergleich um 1 g/dl niedrigerer Ausgangs-Hämoglobinwert. Es konnte gezeigt werden, dass die Frühgeborenen, die tatsächlich eine Transfusion benötigten, deutlich niedrigere Ausgangs-Hämoglobinwerte aufwiesen.

Eine Therapie mit rh-Erythropoietin sollte demnach möglichst früh bei stabilen Frühgeborenen begonnen werden. Die Behandlung führt zu einer Steigerung der Erythropoese und wird von den Kindern gut vertragen. Ob ein größerer Therapieerfolg durch Steigerung der Eisendosierung erzielt werden kann, ohne dabei zum Auftreten von freiem Eisen zu führen, muss in nachfolgenden Studien untersucht werden.

8. Literaturverzeichnis

- 1 Alford CE, King TTE, Campell PA (1991) Role of transferrin, transferrin receptors and iron in macrophage listericidal activity. *J Med* 174:459-466
- 2 Bader D, Kugelmann A, Maar-Rogin N, Weinger-Abend M, Hershkowitz S, Tamir A, Lanir A, Attias D, Barak (2001) The role of high-dose oral iron supplementation during erythropoiesis therapy for anemia of prematurity. *J Perinat* 4:215-220
- 3 Bechensteen AG, Haga P, Halvorsen S et al (1993) Erythropoietin, protein, and iron supplementation and the prevention of anaemia of prematurity. *Arch Dis Child* 69:19-23
- 4 Bechensteen EJ, Haga P, Halvorsen S, Liestol K, Lindemann R, Whitelaw A (1996) Effect of low and moderate doses of recombinant human erythropoietin on the haematological response in premature infants on a high protein and iron intake. *Eur J Pediatr* 156:56-61
- 5 Bernhard K, Ritzel G, Steiner KU (1954) Über eine biologische Bedeutung der Gallenfarbstoffe: Bilirubin und Biliverdin als Antioxidantien für das Vitamin A und die essentiellen Fettsäuren. *Helv Chim Acta* 37:306-313
- 6 Boda V, Finckh B, Dürken M, Commentz J, Hellwege HH, Kohlschütter A (1998) Monitoring erythrocyte free radical resistance in neonatal blood microsamples using a peroxy radical-mediated haemolysis test. *Scand J Clin Lab Invest* 58:317-322
- 7 Bommer J, Kugel M, Schoeppe W, Brunkhorst R, Samtleben W, Bransieße W, Scigalla P (1988) Dose-related effects of recombinant human erythropoietin on erythropoiesis. Results of a multicenter trial in patients with end-stage renal disease. *Contrib Nephrol* 66:85-93
- 8 Bommer J, Schwobl B, Ritz E (1990) Efficiency of intravenous and subcutaneous rh-Epo-therapy in hemodialysis patients. *Kidney Int* 37:289
- 9 Bonsdorff E, Jalavisto E (1948) A humoral mechanism in anoxic erythrocytosis. *Acta Physio. Scand* 16:150-170
- 10 Brown MS, Garcia JF, Phibbs RH, Dallman PR (1984) Decreased response of plasma immunoreactive erythropoietin to available oxygen in anemia of prematurity. *J Pediatr* 105:793-799
- 11 Brown MS, Jones MA, Ohls RK, Christensen RD (1993) Single-dose pharmacokinetics of recombinant human erythropoietin in preterm infants after intravenous and subcutaneous administration. *J Pediatr* 122:655-657

- 12 Brown MS, Shapiro H (1996) Effect of protein intake on erythropoiesis during erythropoietin treatment of anemia of prematurity. *J Pediatr* Vol 128:512-517
- 13 Brune T, Heinrichs H, Reiner G, Zerban R, Pauly JU, Fontaine L, Müller-Wiefel DE, Oster W, Schindel F (1992) Comparison of three routes of administration of recombinant human erythropoietin expressed in C-127 mouse cells. In: Pagel, Weiss, Jelkmann (eds) (1992) *Pathophysiology and Pharmacology of Erythropoietin*. Springer, Berlin Heidelberg, p213-218
- 14 Carnielli V, Montini G, Da Riolo R, Dall'Amico R, Cantarutti F (1992) Effect of high doses of human recombinant erythropoietin on the need for blood transfusions in preterm infants. *J Pediatr* 121:96-102, 1992
- 15 Carnot P, Deflandre C (1906) Sur l'activite hemopoietique des differents organes au cours de la regeneration du sang. *C.R. Acad Sci Paris* 143:384-386
- 16 Curry JL, Trentin JJ, Wolf N (1967) Hematopoietic splenectomy studies in erythropoiesis. *J Experim Med* 125:703-720
- 17 Desypris EN, Graber SE, Krantz SB, Stone WJ (1988) Effects of recombinant erythropoietin on the concentration and cycling status of human marrow hematopoietic progenitor cells in vivo. *Blood* 72:2060-2062
- 18 Dinkelhaar RB, Engels EY, Shoemaker AA (1981) Metabolic studies on erythropoietin II. The role of liver and kidney in the metabolism of erythropoietin. *Exp Hematol* 9:796-803
- 19 Egrie JC, Eschbach JW, McGuire T, Adamson DW (1988) Pharmacokinetics of recombinant human erythropoietin administered to hemodialysis patients. *Kidney Int* 33:262
- 20 Ehmer B, Scigalla P (1994) *Erythropoietin als Therapeutikum*. Quintessenz Verlag Berlin
- 21 Emmerson AJB, Coles HJ, Stern CMM, Pearson TC (1993) Double-blind trial of recombinant human erythropoietin in preterm infants. *Arch Dis Child* 68:291-296
- 22 Eschbach JW, Mladenovic J, Garcia JF, Wahl PW, Adamson JW (1984) The anemia of chronic renal failure in sheep response to erythropoietin-rich plasma in vivo. *J Clin Invest* 74:434-441
- 23 Fisher JW (1979) Extrarenal erythropoietin production. *J Lab Clin Med* 93,5:695-699
- 24 Flake AW, Harrison MR, Adzick NS, Zanjani ED (1987) Erythropoietin production by the fetal liver in an adult environment. *Blood* 70:542-545

- 25 Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (1996) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Spektrum Akad. Verl.,503-512
- 26 Frei B, Stocker R, Ames BN (1988) Antioxidant defences and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:9748-52
- 27 Fukunaga K, Suzuki T, Takama K (1993) Highly sensitive high-performance liquid chromatography for the measurement of malondialdehyd in biological samples. *J Chromatography* 621:77-81
- 28 Garcia JF, Sherwood J, Goldwasser E (1979) Radioimmunoassay of Erythropoietin. *Blood Cells* 5:405-419
- 29 Garrett SW, Worwood M (1994) Zinc protoporphyrin and iron-deficient erythropoiesis. *Acta Haematologica* 91:21-25
- 30 Goldwasser E (1985) The action of erythropoietin as an inducer of erythroid differentiation. *Hematopoetic Stem Cell Physiology* 77-84, Alan R Liss, Inc
- 31 Griffin IJ, Reid MM, McCormick KPB, Cooke RJ (2002) Zinc protoporphyrin/haem ratio and plasma ferritin in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 87:F49-F51
- 32 Gutteridge JMC (1992) Iron and oxygen radicals in brain. *Ann Neurol* 32:S16-S21
- 33 Gutteridge JMC, Mumby S, Koizumi M, Taniguchi N (1996) Free iron in neonatal plasma activates aconitase: evidence for biological reactive iron. *Biochem Biophys Res Commun* 229:806-806
- 34 Halperin DS, Wacker P, Lacourt G, Feliz M, Bebel JF, Aspro M, Wyss H (1990) Effects of recombinant human erythropoietin in infants with anemia of prematurity: a pilot study. *J Pediatr* 116:778-786
- 35 Hammermann C, Goldstein R, Kaplan M, Eran M, Goldschmidt D, Eidelman AI, Gartner LM (1998) Bilirubin in the premature: Toxic Waste or Natural Defense? *Clin Chem* 44, No 12:2551-2553
- 36 Jacobs K, Shoemaker CH, Rudersdorf R, Neni SD, Kaufmann RJ, Mufsan A, Seehra J, Jones SS, Hewick R, Fritsch E, Kawakita M, Shimizu T, Myake T (1985) Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 313: 806-810
- 37 Jacobson LO, Goldwasser E, Fried W, Plzak L (1957) Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature* 179:633-634
- 38 Jelkmann W (1986) Renal erythropoietin: properties and production. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 104:139-215

- 39 Jourdanet D (1863) De l'anemie des altitudes et de l'anemie en general dans ses rapports avec pression de l'athmosphere. Paris, Balliere
- 40 Kampf D, Kahl A, Passlick J (1989) Single dose kinetics of recombinant human erythropoietin after intravenous, subcutaneous and intraperitoneal administration. *Contr Nephrol* 76:106-111
- 41 Kling PJ, Schmidt RL, Roberts RA, Widness JA (1996) Serum erythropoietin levels during infancy: association with erythropoiesis. *J Pediatr* 128:791-796
- 42 Kowalzik F (2002) Prophylaxe der Frühgeborenenanämie mittels Vitamin B 12 und Folsäure. Med. Dissertation. Universität Hamburg
- 43 Krantz SB, Goldwasser E (1984) Specific binding of erythropoietin to spleen cells infected with the anemia strain of Friend virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:7574-7578
- 44 Kroemer G, Solf A, Ehmer B (1990) Single dose pharmacokinetics of recombinant human erythropoietin comparing intravenous, subcutaneous and intraperitoneal administration in CAPD patients. *Kidney Int* 37:331
- 45 Kubanek B (1989) Erythropoietin. *Münchener Med. Wschr.* 131:954-957
- 46 Lacombe C, Silva JL, Bruneval P (1988) Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J clin Invest* 81:620-623
- 47 Lefnesky EJ (1994) Tissue iron overload and mechanisms of iron-catalyzed oxidative injury. *Adv Exp Med Biol* 366:129-146
- 48 Lin FK, Suggs S, Lin ChH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z, Bradrawi SM, Lai PH, Goldwasser E (1985) Cloning and expression of human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:7580-7584
- 49 Maier RF, Obladen M, Scigalla P, Linderkamp O, Duc G, Hieronimi G, Halliday H, Versmold H, Moriette G, Jorch G, Verellen G, Semmekrot B, Grauel EL, Holland B, Wardrop C (1994) The effect of epoetin beta on the need for transfusion in very low birth weight infants. *New Engl J Med* 330:11737-11738
- 50 Maier RF, Obladen M (1995) Die Behandlung der Frühgeborenenanämie mit rekombinantem menschlichem Erythropoietin. *Monatsschr Kinderheilkd* 143:18-27, Springer Verlag
- 51 Maier RF, Obladen M, Kattner E, Natazschka J, Messes J, Regazzoni BM (1998) High-versus low dose erythropoietin in extremely low birth weight infants. *J Pediatr* 132:866-870

- 52 Maier RF, Witt H, Buhner C, Monch E, Kottgen E (1999) HFE gene mutation and transferrin saturation in very low birth weight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 81:144-145
- 53 McCord JM (1998) Iron, free radicals, and oxidative injury. *Semin Hematol* 35:5-12
- 54 McDougall IC, Roberts DE, Neubert P (1989) Pharmacokinetics of intravenous, intraperitoneal and subcutaneous recombinant human erythropoietin in patients on CAPD. *Lancet* 1:425-425
- 55 Meyer MP, Meyer JH, Commerford A, Hann FM, Sive AA, Moller G, Jacobs P, Malan AF (1994) Recombinant Human Erythropoietin in the treatment of anemia of prematurity: Results of a double-blind, placebo-controlled study. *Pediatrics* Vol. 93 No 6:918-923
- 56 Meyer MP, Haworth C, Meyer JH, Commerford A (1996) A comparison of oral and intravenous iron supplementation in preterm infants receiving recombinant erythropoietin. *J Pediatr* 129:258-263
- 57 Miyake T, Kung CKH, Goldwasser E (1977) Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 252:5558-5564
- 58 Natoli S, Violi F (1999) Oxidative stress and hypercholesterolemia: increase of radical hydroxyl in patients with hypercholesterolemia. *Cardiologia* 44(2):187-90
- 59 Nazir S, Peverini RL, Deming DD, Hopper AO, Vyhmeister NR (2002) Comparison of 2 Iron Doses in infants receiving recombinant human erythropoietin therapy. *Arch Pediatr Adolesc Med* 156:540-544
- 60 Neumayer HH, Brockmüller J, Fritschka E, Roots I, Scigalla P, Wattenberg P (1989) Pharmacokinetics of recombinant human erythropoietin after administration and long-term intravenous treatment in patients on maintenance hemodialysis. *Contrib Nephrol* 76:132-142
- 61 Obladen M, Sachsenweger M, Stahnke M (1988) Blood sampling in very low birth weight infants receiving different levels of intensive care. *Eur J Pediatr* 147(4): 399-404
- 62 Obladen M, Scigalla P, Maier RF (1991) Efficacy and safety of recombinant human erythropoietin to prevent anemia of prematurity. *Contrib Nephrol* 88:314-326
- 63 Ohls RK, Christensen RD (1991) Recombinant erythropoietin compared with erythrocyte transfusion in the treatment of anemia of prematurity. *J Pediatr* 119: 781-788

- 64 Ohls RK, Christensen RD (1993) Erythropoietin administration to preterm infants during their first two weeks of life: a randomized, placebo-controlled trial. *Pediatr Res* 33:285 A
- 65 Ohls RK, Hunter DD, Christensen RD (1993) A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of recombinant erythropoietin in treatment of the anemia of bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr* 123:996-1000
- 66 Ohls RK, Osborne KA, Christensen RD (1995) Efficacy and cost analysis of treating very low birth weight infants with erythropoietin during their first two weeks of life: a randomized, placebo-controlled trial. *J Pediatr* 126(3): 421-426
- 67 Ohls RK (1999) Erythropoietin to prevent and treat the anemia of prematurity. *Curr Opin in Pediatr* 11:108-114
- 68 Ohls RK, Ehrenkranz RA, Wright LL, Lemons JA, Korones SB, Stoll BJ, Stark AR, Shankaran S, Donovan EF, Close NC, Das A (2001) Effects of early erythropoietin therapy on the transfusion requirement of preterm infants below 1250 grams birth weight: A multicenter, randomized, controlled trial. *Pediatr* Vol. 108 No.4:934-942
- 69 Ong WY, Halliwell B (2004) Iron, atherosclerosis and neurodegeneration: a key role for cholesterol in promoting iron-dependent oxidative damage? *Ann N Y Acad Sci* 1012:51-64
- 70 Pagel LH, Jelkmann W, Weiss C. Tissue hypoxia and production of erythropoietin. In: Jelkmann W, Groß AJ (eds) (1989) *Erythropoietin*, Springer Berlin Heidelberg New York, S. 36-47
- 71 Palmer C (1995) Hypoxic-ischemic encephalopathy. Therapeutic approaches against microvascular injury, and role of neutrophils, PAF and free radicals. *Clin Perinatol* 22: 481-517
- 72 Parks DA, Granger DN (1986) Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand* 548:87-99
- 73 Pathak A, Roth P, Piscitelli J, Johnson L (2003) Effects of vitamin E supplementation during erythropoietin treatment of the anemia of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatol* 88:F324-F328
- 74 Patruta SI, Hörl WH (1999) Iron and infection. *Kidney International* 55:125-130
- 75 Phibbs RH, Shannon K, Mentzer WC (1989) Rationale for using recombinant human erythropoietin to treat the anemia of prematurity. *Contrib Nephrol* 76:324-329
- 76 Phibbs RH, Keith JF III (1994) Recombinant human erythropoietin stimulates erythropoiesis and reduces transfusions in preterm infants. *Pediatr Res* 35:248A

- 77 Reissmann KR (1950) Studies on the mechanism of erythropoetic stimulation in parabiotic rats during hypoxia. *Blood* 5:373-380
- 78 Robles R, Palomino N, Robles A (2001) Oxidative stress in the neonate. *Early Hum Dev.* 65 Suppl: S 75-81
- 79 Rogers S, Witz G, Anwar M, Hiatt M, Hegyi T (2000) Antioxidant Capacity and Oxygen Radical Diseases in the Preterm Newborn. *Arch Pediatr Adolesc Med Vol* 154:544-548
- 80 Saizou C, Moriette G, Sauchez L (2004) Erythropoietin and anemia in premature infants. *Arch Pediatr* 11:1516-20
- 81 Salmonson T, Danielson BG (1990) Pharmacokinetics of intravenous recombinant human erythropoietin in patients with chronic renal failure. *J Internal Med* 228:53-57
- 82 Schemmel B, Fischer R, Finckh B, Commentz J, Kohlschütter A, Hellwege HH (1999) Freies Eisen im Plasma kranker Neugeborener. *Geburtsh. Neonatol.* 203
- 83 Shannon KM (1990) Anemia of prematurity progress and prospects. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 12:14-20
- 84 Shannon KM, Mentzer WC, Abels RI, Freeman P, Newton N, Thompson D, Sniderman S, Ballard R, Phibbs RH (1991) Recombinant human erythropoietin in the anemia of prematurity: Results of a placebo-controlled pilot study. *J Pediatr* 118:949-955
- 85 Shannon KM, Mentzer WC, Abels RI, Wertz M, Thayer-Moriyama J, Li WY, Thompson D, Decelle S, Phibbs RH (1992) Enhancement of erythropoiesis by recombinant human erythropoietin in low birth weight infants: A pilot study. *J Pediatr* 120:586-592
- 86 Shannon KM, Keith JF, Mentzer WC, Ehrenkranz RA, Brown MS, Widness JA, Gleason C, Bifano E, Millard D, Davis C, Stevenson D, Alverson D, Simmons C, Brim M, Abels R, Phibbs R (1995) Recombinant human erythropoietin stimulates erythropoiesis and reduces erythrocyte transfusion in very low birth weight preterm infants. *Pediatrics* 95:1-8
- 87 Soubasi V, Kremenopoulos G, Diamandi E, Tsantali C, Tsakiris D (1993) In which neonates does early recombinant erythropoietin treatment prevent anemia of prematurity? Results of a randomized controlled study. *Pediatr Res* 34:675-679
- 88 Spivak JL (1986) The mechanism of action of erythropoietin. *Int J Cell Cloning* 4: 139-166

- 89 Spivak JL, Hogans RB (1989) The in vivo mechanism of recombinant human erythropoietin in the rat. *Blood* 73:90-99
- 90 Stamatoyannopoulos G, Rosenblum BB, Papayannopoulou T, Brice M, Nakamoto B, Shepard TH (1979) HbF and HbA production in erythroid cultures from human fetuses and neonates. *Blood* 54: 440-450
- 91 Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN (1987) Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235:1043-6
- 92 Strauss RG (1991) Transfusion therapy in neonates. *Am J Dis Child* 145:904-911
- 93 Strauss RG (2001) Managing the anemia of prematurity: Red blood cell transfusion versus recombinant erythropoietin. *Transfusion Medicine Reviews* 3:213-223
- 94 Sullivan JL (1988) Iron, plasma antioxidants, and the oxygen radical disease of prematurity. *Am J Dis Child* 142:1341-1344
- 95 Turker G, Sarper N, Gokalp AS, Usluer H (2005) The effect of early recombinant erythropoietin and enteral iron supplementation on blood transfusion in preterm infants. *Am J Perinatol* 22:449-55
- 96 Vamvakas EC, Strauss RG (2001) Meta-analysis of controlled clinical trials studying the efficacy of rhHuEPO in reducing blood transfusions in the anemia of prematurity. *Transfusion* Vol. 41:406-415
- 97 Vento M, Vina J, Asensi M (1999) Erythropoietin and iron therapy for preterm infants. *J Pediatr*: 520-520
- 98 Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Barclay LRC, Locke SJ (1987) The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochimica et Biophysica Acta* 924:408-419
- 99 Widness JA, Pedersen PY, Modi NB, Schmidt RL, Chesinat DH (1992) Development changes in erythropoietin pharmacokinetics: increased clearance and distribution in fetal and neonatal sheep. *Pharmacol Exp Ther* 261:977-984
- 100 Williamson P, Griffiths G, Norfolk D, Levene M (1996) Blood transfusions and human recombinant erythropoietin in premature newborn infants. *Arch Dis Child* 75: F65-F68
- 101 Zanjani E, Ascensao JL, McGlave PB, Banisadre M, Ash RC (1981) Studies on the liver to kidney switch of erythropoietin production. *J Clin Invest* 67: 1183-1188

9. Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Professor Dr. med. Hans-Henning Hellwege für die Überlassung des Themas und seine hilfreiche und stets freundliche Betreuung dieser Arbeit. Durch seine Erfahrung, sein umfassendes Wissen und kritisches Urteil wurde ich immer wieder neu motiviert.

Großer Dank gebührt auch Frau Dr. rer. nat. Barbara Finckh für ihre wissenschaftliche Unterstützung im Labor und die zielorientierte Zusammenarbeit. Auch bei statistischen Fragen stand sie mir immer helfend zur Seite.

Ich danke Frau Dr. med. Kerstin Reinhard, geb. Daniel, für die Überlassung ihrer Patientendaten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Jutta Giesecking für die langjährige, konstruktive und freundschaftliche Hilfe bei vielen Arbeiten im Labor.

Mein Dank gilt auch allen Medizinisch-Technischen Assistentinnen des Stoffwechsellabors der Kinderklinik, insbesondere Tanja Hoffmann und Maike Westfal, für ihre freundliche Aufnahme im Labor und konstruktive Hilfe.

Ich bedanke mich bei dem gesamten ärztlichen und pflegerischen Personal der Kinderintensivstation für die, bei dieser Arbeit notwendigen, regelmäßigen Blutentnahmen bei den Frühgeborenen.

Ich danke Herrn Volker Schoder für seine Beratung und geduldige Hilfe bei der statistischen Auswertung und Interpretation der zahlreichen, in dieser Studie erhobenen Daten.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meinem Ehemann Florian für die Geduld und Anregungen, mit denen er meine Arbeit begleitet hat.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Kürzel, geb. Grossmann
Vorname: Daniela
Geburtsdatum/-ort: 23.12.1975 in Flensburg

Schulbildung:

1982 – 1986 Grundschule Falkenberg, Flensburg
1986 – 1995 Gymnasium Auguste-Viktoria-Schule, Flensburg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Ausbildung:

Okt. 1995- März 1996 Beginn einer Ausbildung zur Krankenschwester
Universitäts-Krankenhaus Eppendorf, Hamburg

Hochschulbildung:

1996 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität
Hamburg
1998 Ärztliche Vorprüfung
1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2000 Beginn der Promotionsstudien in der Kinderklinik des
Universitäts-Krankenhauses Eppendorf
(Direktor Prof. Dr. med. K. Ullrich)
2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Okt. 2001-Sept. 2002 Absolvierung des Praktischen Jahres
Nov. 2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Ärztliche Tätigkeit:

Jan. 2003- Juni 2004 Ärztin im Praktikum (Gynäkologie und Geburtshilfe, Klinikum
Itzehoe)
Ab Dez. 2004 Assistenzärztin (Anästhesie und operative Intensivmedizin, Jo-
hanniter Krankenhaus Geesthacht)

Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: