

Aus der Abteilung für Kinder- und Jugendmedizin des
Universitätskrankenhauses Eppendorf, Hamburg
Direktor: Prof. Dr. K. Ullrich

Quantitative Beschreibung des klinischen Zustandes reifer und unreifer Neugeborener und ihre antioxidative Abwehrlage im Blut

**Studien unter Verwendung etablierter klinischer Scores und
der Analyse von Mikroblutproben auf Antioxidantien und
freies Eisen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin dem Fachbereich
Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von:

Birte Julia Sybille Liebig, geb. Schemmel aus Neumünster

Hamburg 2010

Angenommen von dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
am: 16.12.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. A. Kohlschütter

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. med. D. Singer

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. med. M. Kemper

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Freie Radikale: Chemische Grundlagen und Wechselwirkungen mit dem menschlichen Organismus	7
1.1.1	Was sind freie Radikale und durch welche Mechanismen entstehen sie?.....	7
1.1.2	Eisenhämömostase und antioxidativer Schutz	10
1.1.3	Eisen und Nicht Transferrin gebundenes Eisen, NTGE	11
1.1.4	Wie wirken freie Radikale auf den menschlichen Organismus?	13
1.1.5	Oxidative Schädigung und antioxidativer Schutz	13
1.2	Freie Radikale und Frühgeborene.....	14
1.2.1	Oxidativer Stress bei Frühgeborenen.....	14
1.2.2	Neugeborene und freies Nicht Transferrin gebundenes Eisen, NTGE.....	17
1.2.3	NTISS und SNAP als klinischer Indikator für den Schweregrad der Erkrankung.	17
1.3	Zielstellung	18
2	Patienten, biochemische und klinische Methoden	20
2.1	Patienten	20
2.1.1	Kollektiv des ersten Studienteils mit Erhebung der klinischen Scores und Analyse des pro-/ antioxidativen Gleichgewichtes.....	20
2.1.2	Kollektiv des zweiten Studienteils mit Bestimmung von NTBI und Analyse des pro-/ antioxidativen Gleichgewichtes.....	21
2.2	biochemische Methoden	23
2.2.1	AAPH-Hämolysetest-Mikromethode	23
2.2.1.1	Prinzip des AAPH-Hämolysetests	23
2.2.1.2	Materialien/ Reagenzien	24
2.2.1.3	Methode des AAPH-Hämolyse-Mikrotests	24
2.2.2	Bestimmung von Malondialdehyd im Plasma.....	26
2.2.2.1	Prinzip der Malondialdehydbestimmung.....	26
2.2.2.2	Materialien/ Reagenzien	26
2.2.2.3	Methode der MDA-Bestimmung	27
2.2.3	Bestimmung von lipophilen Antioxidantien (alpha- und gamma-Tocopherol, Coenzym Q10) im Plasma	29
2.2.3.1	Prinzip der Tocopherol- und Coenzym Q10-Bestimmung.....	29
2.2.3.2	Materialien/ Reagenzien	29
2.2.3.3	Methode der Tocopherol- und Coenzym Q10-Bestimmung	30
2.2.4	Bestimmung von Cholesterin im Plasma.....	32
2.2.4.1	Prinzip der Cholesterin-Bestimmung	32
2.2.4.2	Materialien/Reagenzien	32
2.2.4.3	Methode der Cholesterin-Bestimmung	32
2.2.5	Bestimmung von Coeruloplasmin im Plasma.....	33
2.2.5.1	Prinzip der Coeruloplasmin-Bestimmung	33
2.2.5.2	Materialien/Reagenzien	33
2.2.5.3	Methode der Coeruloplasmin-Bestimmung.....	34
2.2.6	Bestimmung der Fettsäuren im Plasma	34
2.2.6.1	Prinzip der Bestimmung des Spektrums der Fettsäuren	35
2.2.6.2	Materialien/ Reagenzien	35
2.2.6.3	Methode der Fettsäuren-Bestimmung.....	35
2.2.7	Bestimmung des Nicht-Transferrin-gebundenen Eisens im Serum mittels Flammen-Atomabsorptions-Spektrometrie	36
2.2.7.1	Prinzip der Atomabsorptions-Spektrometrie	36

2.2.7.2	Materialien/ Reagenzien	37
2.2.8	Methode der Bestimmung Nicht-Transferrin-gebundenen Eisens	37
2.2.9	Statistische Analysen	38
2.3	Klinische Methoden.....	38
2.3.1	Klinisch angewandte Methode im Kollektiv des ersten Studienteils	38
2.3.2	Klinisch angewandte Methode im Kollektiv des zweiten Studienteils	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Ergebnisse der klinischen Scores NTISS und SNAP mit Bezug auf den pro-/ antioxidativen Status	40
3.1.1	Zusammenhang der klinischen Scores NTISS und SNAP mit Geburtsgewicht und Gestationsalter im ersten Kollektiv	40
3.1.2	Darstellung der klinischen Scores und der pro-/ antioxidativen Parameter im Verlauf im ersten Kollektiv	42
3.1.3	Graphische Darstellung der Scores SNAP und NTISS in signifikanter Korrelation zu den ermittelten pro-/ antioxidativen Parametern im ersten Kollektiv.....	46
3.1.4	Zusammenhang der klinischen Scores NTISS und SNAP mit Geburtsgewicht und Gestationsalter im zweiten Kollektiv	55
3.1.5	Darstellung der pro-/ antioxidativen Parameter im Verlauf im zweiten Kollektiv	57
3.1.6	Graphische Darstellung der Scores SNAP und NTISS in signifikanter Korrelation zu den pro-/ antioxidativen Parametern im zweiten Kollektiv.....	66
3.1.7	Zusammenhang der klinischen Scores NTISS und SNAP mit Geburtsgewicht und Gestationsalter im 3. Kollektiv.....	76
3.1.8	Graphische Darstellung der Scores sowie der weiteren erfassten pro-/ antioxidativen Parameter im Verlauf beim dritten Kollektiv	78
3.1.9	Graphische Darstellung der Scores SNAP und NTISS in signifikanten Korrelationen zu den pro-/ antioxidativen Parametern im 3. Kollektiv	87
3.2	Darstellung der Ergebnisse des 2. Studienteils mit Bestimmung von Nicht-Transferrin-gebundenen Eisens(NTBI $\mu\text{mol/l}$) mit Bezug auf die pro- und antioxidativen Parameter.....	95
4	Diskussion	99
4.1	Methodenkritik	99
4.1.1	Kollektivauswahl und Probensammlung	99
4.1.2	Antioxidative Parameter	99
4.1.3	Bestimmung von Malondialdehyd, MDA	100
4.1.4	Bestimmung von NTGE	100
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	101
4.2.1	SNAP und NTISS in Bezug auf Reife und Geburtsgewicht	101
4.2.2	SNAP und NTISS in Bezug auf das pro-/antioxidative Gleichgewicht	103
4.2.2.1	Bilirubin.....	103
4.2.2.2	Hämatokrit	104
4.2.2.3	Vitamin E.....	105
4.2.2.4	Coenzym Q10	107
4.2.2.5	Coeruloplasmin.....	109
4.2.2.6	Radikalresistenz der Erythrozyten	109
4.2.2.7	Malondialdehyd	110
4.2.3	NTBI und Transferrin	111
4.2.4	NTBI und Bluttransfusionen.....	111
4.2.5	NTBI und oxidativer Stress	112

4.3	Ausblick.....	114
5	Zusammenfassung.....	116
6	Literaturverzeichnis.....	117
7	Abbildungsverzeichnis.....	126
8	Anhang	129
9	Danksagung.....	143
10	Lebenslauf.....	144
11	Veröffentlichungen	146
12	Eidesstattliche Versicherung.....	147

Abkürzungsverzeichnis

AAPH	2,2-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochlorid
AIS	Amnioninfektionssyndrom
ANS	Atemnotsyndrom
BPD	bronchopulmonale Dysplasie
BDI	bleomycin detectable iron
CLD	chronic lung disease
HPLC	high performance liquid chromatography
IVH	intraventriculäre Hämorrhagie
ITN	Intubationsnarkose
LT	Lebenstag
MDA	Malondialdehyd
NEC	necrotisierende Enterokolitis
NTA	Nitrilelessigsäure
NTGE	Nicht-Transferrin-gebundenes Eisen
NTISS	Neonatal Therapeutic Intervention Scoring System
NTBI	non transferrin-bound iron
PBN	alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron
PDA	persistierender Ductus arteriosus
PUFA	polyunsaturated fatty acids
ROP	Retinopathy of the premature
RPM	Retinopathia praematurorum
SNAP	Score for Neonatal Acute Physiology
SSW	Schwangerschaftswoche
TBA	Thiobarbitursäure
TBARS	Thiobarbitursäure reaktive Substanzen

1 Einleitung

Ungefähr 90% der Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht <1500g überleben heute die Neonatalperiode, von denen 25-50% der Kinder später kognitive Defizite oder Verhaltensauffälligkeiten aufweisen (Volpe 2001). Eine mögliche Ursache, warum die verbleibenden 50-75% nicht diese Defizite aufweisen, könnte ein milderer Verlauf der Intensivperiode mit weniger Komplikationen in Form von Inflammation unterschiedlicher Genese und damit ein suffizienterer Schutz gegen freie Radikale mit einem geringeren Ausmaß an oxidativer Schädigung sein.

Oxidative Prozesse, auch „oxidativer Stress“ werden als Ursache einer Reihe Erkrankungen diskutiert, die als Radikal-assoziierte-Frühgeborenenenerkrankungen oder auch „oxygen radical disease of the prematurity“ bezeichnet werden. Hierzu gehört die Bronchopulmonale Dysplasie, die Intraventrikuläre Hirnblutung, die Nekrotisierende Enterokolitis und die Retinopathia praematurorum (Sullivan 1988). Des Weiteren wird der persistierende Ductus Arteriosus Botalli (Clyman RI 1989) und die periventrikuläre Leukomalazie hierunter subsummiert (Haynes RL 2003).

Als möglicher Pathomechanismus wird ein gestörtes Gleichgewicht zwischen der Produktion freier Radikale und ihrer Eliminierung durch eine Reihe antioxidativer Substanzen diskutiert, die zusammengefasst als antioxidatives System bezeichnet werden.

1.1 Freie Radikale: Chemische Grundlagen und Wechselwirkungen mit dem menschlichen Organismus

1.1.1 Was sind freie Radikale und durch welche Mechanismen entstehen sie?

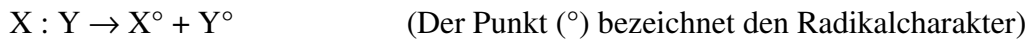
Einem Atom zugeordnete Elektronen besetzen räumliche Bereiche, die als Orbitale bezeichnet werden. Jedes Orbital kann gemäß dem Pauli-Prinzip maximal zwei Elektronen aufnehmen. Befindet sich in einem Orbital nur ein einzelnes Elektron, so wird dieses Elektron als ungepaartes Elektron bezeichnet.

Als freie Radikale werden Atome oder Moleküle definiert, die zu einer unabhängigen Existenz befähigt sind und ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzen (Halliwell u. Gutteridge 1999).

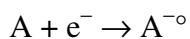
Aufgrund der Tatsache, dass Radikale ungepaarte Elektronen besitzen, können sie sehr reaktionsfähig sein. Die hervorstechende Eigenschaft dabei ist, dass ein Radikal ein anderes erzeugt und dies zu einer Kettenreaktion führen kann.

Doch wie entstehen freie Radikale?

Eine Möglichkeit ist die homolytische Spaltung einer kovalenten Bindung, bei der jedes Spaltprodukt eines der vorher gemeinsamen Elektronen behält. Die für die Spaltung benötigte Energie kann durch hohe Temperaturen, UV-Licht oder Ionisierende Strahlung erzeugt werden:



Radikale können auch entstehen, indem einem stabilen Molekül ein Elektron entzogen oder zugeführt wird:

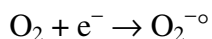


Dabei stellt der Elektronentransfer in biologischen Systemen den weitaus häufigeren Weg der Radikalerzeugung dar (Cheeseman u. Slater 1993).

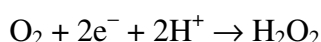
Das wichtigste Molekül im Hinblick auf die Erzeugung freier Radikale im menschlichen Organismus ist der Sauerstoff. Molekularer Sauerstoff ist in seinem Triplett-Grundzustand äußerst reaktionsträge, obwohl er zunächst der Definition eines freien Radikals entspricht: Er verfügt über zwei ungepaarte Elektronen. Jedoch weisen diese beiden Elektronen einen parallelen Spin auf, so daß Reaktionen mit Molekülen oder Atomen, die über reaktive Elektronenpaare verfügen, spinverboten sind (Pauli-Prinzip, Hund-Regel).

Dieser reaktionsträge Zustand kann aber durch physikalische bzw. chemische Aktivierung zu Singulett-Sauerstoff (Spin-Umkehr) und Sauerstoffreduktion aufgehoben oder auch durch Übergangsmetallkatalyse umgangen werden. Der auf diese Weise aktivierte Sauerstoff kann nun weiter reagieren:

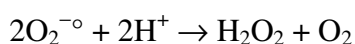
So entsteht durch Aufnahme eines Elektrons das Superoxid-Anion (ein freies Radikal):



Die Aufnahme von zwei Elektronen erzeugt Wasserstoffperoxid:



Wasserstoffperoxid wird in biologischen Systemen oft über Superoxid-Anionen erzeugt:

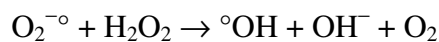


Diese sogenannte Dismutase-Reaktion kann sowohl spontan stattfinden als auch durch das Enzym Superoxid-Dismutase katalysiert werden. Wasserstoffperoxid selbst ist kein freies Radikal, gehört aber zu den reaktiven Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“ = ROS), die an der Produktion von Sauerstoff-Radikalen beteiligt sind.

So zerfällt Wasserstoffperoxid sehr leicht, vor allem in der Anwesenheit von Übergangsmetallen und erzeugt in der sogenannten Eisen-katalysierten Haber-Weiss-Reaktion das äußerst reaktive Hydroxyl-Radikal ($^{\circ}\text{OH}$):



Bei der nicht katalysierten Haber-Weiss-Reaktion reagiert das Superoxid-Anion direkt mit dem Wasserstoffperoxid, sie findet aber seltener statt:



Übergangsmetalle spielen daher bei der Generierung von Radikalen eine wichtige Rolle. In ihrem Grundzustand entsprechen sie außerdem der Definition eines Radikals. Die wichtigsten Vertreter sind Eisen und Kupfer.

Sogenanntes „Freies Eisen“, also Nicht-Transferrin-gebundenes Eisen (Fe^{2+}) spielt hier sowohl als direkt oxidierendes Agens, als auch als Katalysator bei der Generierung freier Radikale eine wichtige Rolle.

Reaktive Sauerstoffspezies entstehen im gesunden menschlichen Organismus ständig. Neben der bereits erwähnten Generierung von Hydroxyl-Radikalen im Rahmen der Haber-Weiss-Reaktion fallen bei der mitochondrialen Sauerstoffreduktion (Atmungskette), beim mikrosomalen Elektronentransport durch das Cytochrom P-450-System und bei der Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen Sauerstoff-Radikale an.

Im Rahmen der Infektabwehr produzieren neutrophile Granulozyten Superoxid, indem sie über eine membranständige NADPH-Oxidase Sauerstoff aktivieren („oxidative burst“).

Die Zahl der reaktiven Sauerstoffspezies kann sich durch Einflüsse wie beispielsweise energiereiche Strahlung, Luftverschmutzung (Ozon, Zigarettenrauch), Chemikalien, Medikamente (Tetrazykline, Zytostatika), Krankheiten, Vitamin-Defizite (A, E) erhöhen.

Sauerstoff-Radikale sind zwar die meist initial entstehende und wichtigste Radikalspezies, jedoch spielen auch andere freie Radikale eine wichtige Rolle. Hier sind

die große Anzahl der verschiedenen Kohlenstoff-Radikale zu erwähnen, die durch den Angriff eines oxidierenden Radikals (z.B. Hydroxyl-Radikal) auf Lipide, Nukleinsäuren und Proteine entstehen können. Ebenso können Schwefelverbindungen einen Angriffspunkt für Radikale darstellen, beispielsweise bei der Oxidation von Gluthation (Cheeseman u. Slater 1993).

1.1.2 Eisenhämöostase und antioxidativer Schutz

Eisen ist physiologisch gesehen lebenswichtig, biochemisch gesehen jedoch auch gefährlich.

Die Evolution hat uns die Möglichkeit gegeben ca. 10 % des im Rahmen der Ernährung zugeführten Eisens zu resorbieren, jedoch verfügt der menschliche Organismus über keine Mechanismen überschüssiges Eisen zu eliminieren.

Eisen ist ein lebensnotwendiger Bestandteil einer großen Reihe metabolischer Prozesse und biologischer Funktionen.

Es ist ein Cofaktor und Katalysator für eine Reihe von eisenhaltigen Enzymen und Hemoproteinen, die essentiell für die Sauerstoffbindung (Hämoglobin), den Sauerstoffmetabolismus (Oxidasen, Catalasen, Peroxidasen) und den Elektronentransfer (Cytochrome) sind.

Einige der eisenhaltigen Proteine sind im Energiestoffwechsel und in der DNA-Synthese involviert.

Eisen existiert in Lösung als zweiwertiges (Fe II) oder dreiwertiges Eisen (Fe III) und kann Elektronen aufnehmen oder abgeben.

Bei physiologischem pH und normalem Sauerstoffpartialdruck liegt Eisen in oxidiert dreiwertiger Form vor (Fe III), das schnell Polymere bildet und über Transportproteine zum Bestimmungsort gebracht wird, wo es gebraucht wird, oder über das Speicherprotein Ferritin biologisch unwirksam gebunden und gelagert wird.

In jedoch nicht chelatierter zweiwertiger Form (Fe II) ist die katalytische Funktion von Eisen im Rahmen des Elektronentransfers bei Redoxreaktionen für den menschlichen Organismus potentiell gefährlich, da es eine Schlüsselrolle bei der Entstehung schädlicher Sauerstoffradikale über die Haber-Weiss Reaktion spielt, was zu oxidativen Schäden an vitalen Zellstrukturen führt (McCord et al. 1998, Halliwell et al. 1990).

Somit hat der menschliche Organismus dafür zu sorgen, das Vorkommen „freien Eisens“ möglichst zu unterbinden, jedoch den Bedarf an Eisen für die Bildung von Hämoproteinen und zahlreichen eisenhaltigen Molekülen zu befriedigen.

Hierzu wurde im Laufe der Evolution ein ausgefeiltes System bestehend aus Transportproteinen und Speicherproteinen, sowie zellmembranständiger Rezeptoren entwickelt, das die Eisenhämömostase aufrechterhält (Cammack et al. 1990, Ponka et al. 1997, 1998, 1999). Aus einem Eisenmangel resultiert psychomotorische Entwicklungsverzögerung mit ernsthaften Langzeitkomplikationen (Oski et al. 1992, Lozoff et al. 2000) und Anämie. Einer Eisenüberladung werden Hepatopathien und oxidativer Stress mit Oxidation von Proteinen, Lipiden und Nucleinsäuren zugeschrieben.

1.1.3 Eisen und Nicht Transferrin gebundenes Eisen, NTGE

Der menschliche Körper enthält normalerweise insgesamt 35-45 mg/kg Eisen. Zwei Drittel dieses Eisens ist im Hämoglobin der Erythrozyten und ihrer Vorläuferzellen gespeichert, geringe Mengen auch in Myoglobin und Enzymen. 20 mg Eisen werden täglich für die Erythropoese benötigt, während die gleiche Menge auch wieder abgegeben wird (Skikne et al. 1994).

Ein spezifischer Ausscheidungsmechanismus existiert nicht. Im Plasma zirkuliert Eisen als Fe^{3+} fest gebunden an Transferrin. In diesem Plasmapool befinden sich nur ca. 3mg Eisen (siehe Abb.1.1) Jedes Transferrin-Molekül bindet zwei Eisen-Ionen mit einer hohen Bindungsaffinität (Richardson et al. 1997). Ein Viertel des Körpereisens liegt in Form von Depoteisen in den Hepatozyten und den Makrophagen des retikuloendothelialen Systems vor. Hier wird es intrazellulär in Ferritinmolekülen gespeichert, die als sphärische Moleküle je bis zu 4500 Eisenatome aufnehmen können (Theil et al. 1987).

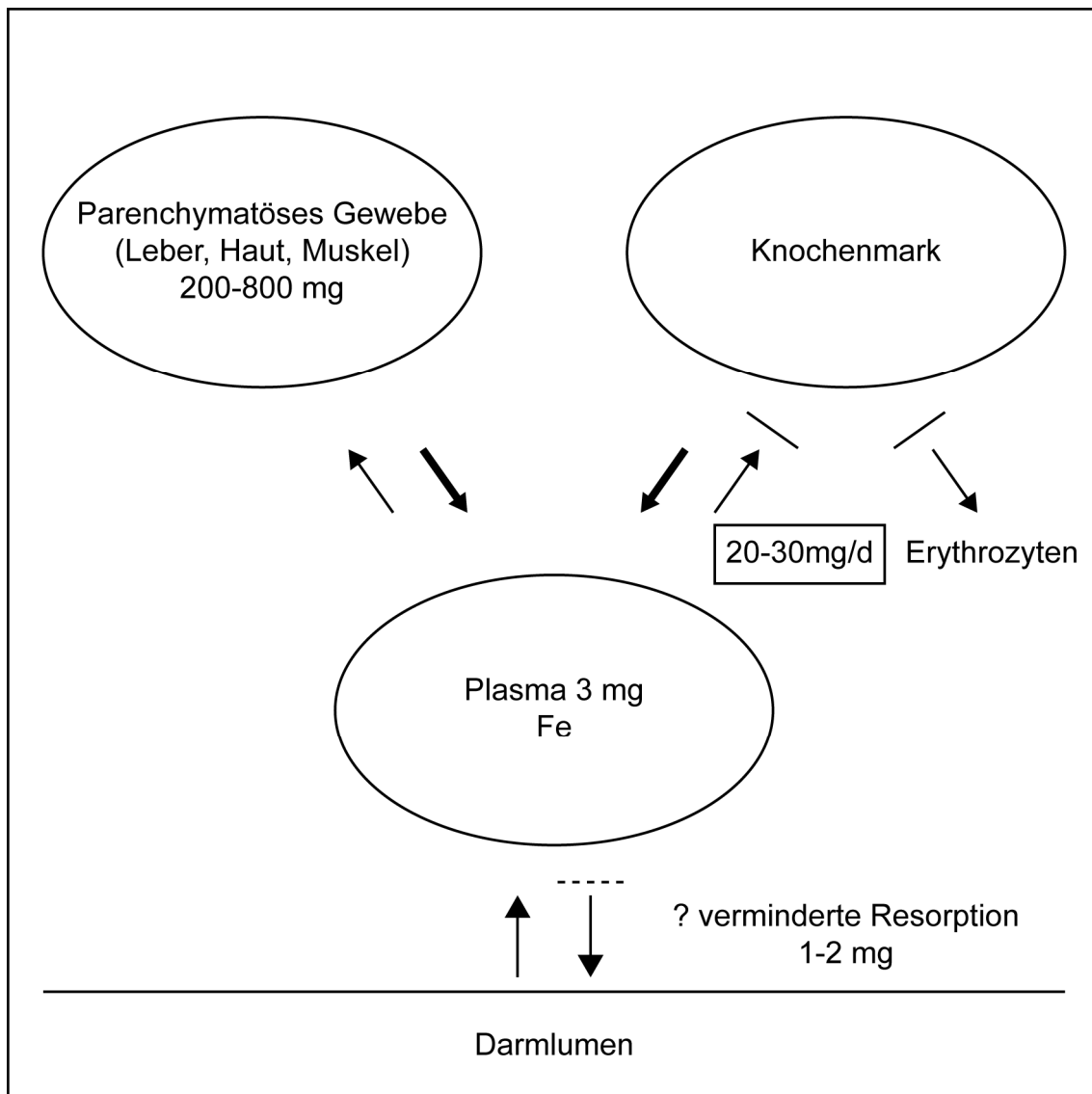
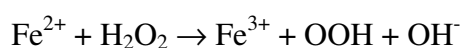


Abbildung 1.1: Eisenmetabolismus im menschlichen Organismus.

Die Eisenhomöostase unterliegt strengen Regulationsmechanismen, um Schäden durch Eisenmangel und Überladung zu vermeiden (Hentze et al. 1996). Bei einem gesunden Menschen sind nur etwa 20-25% des Transferrin gesättigt, so dass das Auftreten von freiem Nicht-Transferrin-gebundenem Eisen (NTGE) verhindert wird.

Erstmalig wurde 1978 von Hershko das Auftreten niedermolekularen Eisens bei Thalassämiepatienten beschrieben. 1992 berichtete Evans et al. über das Vorkommen freien, also niedermolekularen Eisens bei gesunden Neugeborenen.

An der Bildung freier Radikale ist, z.B. mittels der Fenton-Reaktion auch Nicht-Transferrin-gebundenes Eisen beteiligt (Gutteridge u. Halliwell 1999).



Neben der katalytischen Funktion bei der Bildung freier Sauerstoffradikale kann niedermolekulares Eisen auch direkt DNS-Schäden (Henle et al. 1997), Lipidperoxidation (Schmidt 1996) und Proteinoxidation (Lucesoli et al. 1999) verursachen.

1.1.4 Wie wirken freie Radikale auf den menschlichen Organismus?

Grundsätzlich erlangen freie Radikale durch Oxidation von Molekülen, die keinen Radikalcharakter haben, eine größere Stabilität. Diese Eigenschaft ist die Grundlage der pathogenetischen Bedeutung. Der menschliche Organismus bietet eine Vielzahl von Angriffspunkten für eine solche Oxidation, es können Lipide, Proteine und Nukleinsäuren geschädigt werden (Halliwell 1999).

Lipide stellen dabei die empfindlichsten Strukturen dar. Zellmembranen enthalten einen großen Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren (auch PUFAs genannt, d.h. polyunsaturated fatty acids), die sehr leicht oxidiert werden können. Diese Lipidperoxidation erzeugt eine Kettenreaktion, in deren Verlauf immer neue PUFAs oxidativ verändert werden. Die Folge ist eine direkte Schädigung der Membranstruktur durch Fluiditätsveränderung und schließlich Funktionsverlust. Des Weiteren können durch Lipidperoxidation generierte reaktive Aldehyde indirekt andere Zellbestandteile schädigen.

Auch Proteine können auf vielfache Weise durch Radikale modifiziert werden. Oxidation von Strukturzymen beispielsweise kann deren Funktionsstörung bzw. Funktionsverlust zur Folge haben. Die durch Oxidation von Proteinen verursachte Einschleusung von Carbonylgruppen in die Seitenkette der Proteine macht man sich bei der Messung des Ausmaßes an oxidativer Schädigung zunutze (Saugstad 1996).

1.1.5 Oxidative Schädigung und antioxidativer Schutz

Den prooxidativen Mechanismen im Organismus, stehen eine Reihe antioxidativ wirkende Substanzen entgegen. Sie werden unterteilt in primäre, präventive und sekundär kettenbrechende Antioxidantien (Slater 1987).

Die primären, präventiven Antioxidantien sollen das Entstehen oder Penetrieren freier Radikale in der Umgebung verhindern. Zu dieser Gruppe gehören die Metallchelatoren (z.B. Transferrin, Coeruloplasmin), die die potentiell radikalgenerierenden Übergangsmetalle chelatieren und die Enzyme Superoxiddismutase, Katalase und

Gluthationperoxidase, die entstandene Sauerstoffradikale sofort zurück in den Grundzustand des Sauerstoffs überführen.

Die sekundären kettenbrechenden Antioxidantien sollen die Wirkung bereits entstandener Radikale im weiteren Verlauf des Reaktionsmechanismus beenden oder zumindest begrenzen. Hierzu gehören z.B. die lipophilen Antioxidantien wie alpha- und gamma-Tocopherol, Lycopon, beta-Karotin und reduziertes Coenzym Q10 (Ubichinol), hydrophile Substanzen wie Bilirubin, Vitamin C, Harnsäure, Thiol (SH)-Gruppen-reiche Proteine und das Coeruloplasmin als Metallchelator, aber auch intrazellulär die Gluthationperoxidase in Erythrozyten.

Zusammen bilden sie die antioxidative Abwehr.

Diesen Antioxidantien ist gemein, dass sie in unterschiedlicher Weise in der Lage sind die freien Elektronen der freien Radikale zu binden und damit Ihre Eigenschaft, bestehende Verbindungen und funktionelle Einheiten in Form von z.B. Oxidation zu zerstören, zu nehmen.

1.2 Freie Radikale und Frühgeborene

1.2.1 Oxidativer Stress bei Frühgeborenen

Neugeborene und besonders Frühgeborene sind am Anfang Ihres Lebens vermutlich gesteigertem oxidativen Stress ausgesetzt, mehr als im späteren Verlauf.

Der Grund hierfür liegt unter anderem an der abrupt ansteigenden Sauerstoffkonzentration postnatal.

Intrauterin ist der fetale Organismus einer niedrigeren Sauerstoffspannung ausgesetzt, als postnatal.

Das erklärt z.B. die molekularen Unterschiede zwischen dem fetalen Hämoglobin und dem postnatalen Hämoglobin. Mit der Geburt kommt es zu einem plötzlichen Anstieg der Sauerstoffspannung (Evans et al. 1986) und die erhöhte inspiratorische Sauerstoffkonzentration führt zu oxidativen Schaden an den protektiven Schleimhautsekreten und den assoziierten Zellen (Palta et al. 1991).

Im Rahmen dieser Umstellung kommt es durch gesteigerte Bildung freier Radikale zu oxidativem Stress, dem Neugeborene, aber auch speziell Frühgeborene, bei denen eine verminderte antioxidative Abwehrkapazität diskutiert wird, abrupt ausgesetzt sind.

Des Weiteren leiden Frühgeborene häufiger unter inflammatorischen Prozessen, z.B. aufgrund von Infektionen oder Reperfusion nach Hypoxie (Saugstad 2003).

Während gesunde, reife Neugeborene sowohl durch eine erhöhte Fähigkeit des Blutplasmas Radikale abzufangen (Lindemann et al. 1989), als auch durch vermehrte Induktion antioxidativer Enzyme (Frank u. Sosenko et al. 1991) und zusätzlich durch schnelleren nutritiven Aufbau erniedrigter Antioxidantien (Kelly et al. 1990) in der Lage zu sein scheinen, sich effektiv gegen freie Radikale und ihre oxidative Auswirkung zu schützen, verfügen Frühgeborene ebenfalls über eine erhöhte Fähigkeit des Blutplasmas Radikale abzufangen (Lindeman et al. 1989). Allerdings wurden sowohl erniedrigte Aktivitäten der Enzyme Glutathion-Peroxidase und Katalase in Erythrozyten (Ripalda et al. 1989), Superoxiddismutase in der Lunge (Pittkänen 1992) nachgewiesen, als auch geringere Plasmakonzentrationen für Vitamin E und beta-Karotin (Ostrea et al. 1986), Transferrin (Lindeman et al. 1992, Evans et al. 1992), Coeruloplasmin (Hilderbrand et al. 1974, Gutteridge and Stocks 1981, Lindeman et al. 1992) und alpha-Tocopherol (Ogihara 1991).

Es werden insgesamt niedrigere alpha-Tocopherolspiegel im Plasma Neugeborener im Vergleich zu Erwachsenen beschrieben. Dies kann jedoch auch auf die erniedrigten Blutfette Neugeborener zurückzuführen sein (Kiely et al. 1999).

Des Weiteren werden erniedrigte Spiegel für Transferrin und Coeruloplasmin beschrieben (Pittkänen et al. 1992, Lindeman et al. 2000).

Das Coeruloplasmin als ein akute-Phase-Protein zeigt seine antioxidative Eigenschaft indem es in der Lage ist, Kupferionen zu binden und in Form der Ferroxidase die Oxidation des reagiblen Fe^{2+} mit Radikalcharakter in das stabile Fe^{3+} zu katalysieren (Lackmann et al. 1996). Die Konzentration einiger akute-Phase-Proteine (z.B. Haptoglobin) ist erhöht während Inflammation und unterstützt den antioxidativen Schutz während der inflammatorischen Prozesse.

Bilirubin, das in unkonjugierter Form an Albumin gebunden postnatal im Rahmen der Anpassung an höhere Sauerstoffspannung mit Abbau des fetalen Hämoglobin in erhöhten Konzentrationen anfällt, wird in vitro antioxidative Eigenschaften zugesprochen. Es bindet Peroxylradikale und singulären Sauerstoff und kann die Oxidation von freien Fettsäuren verhindern (Neuzil et al. 1993). In Frühgeborenen und reifen Neugeborenen ist die molare Plasmakonzentration von Bilirubin viel höher als die molare Plasmakonzentration von alpha-Tocopherol; in Erwachsenen ist die molare Plasmakonzentration von alpha-Tocopherol nur wenig höher als die des Bilirubins. Beide Antioxidantien sind in der Lage pro Molekül zwei Radikale zu binden (Lindeman et al. 1989).

Die Hyperbilirubinämie bei Neugeborenen wird kontrovers diskutiert, da Bilirubin aus neurologischer Sicht betrachtet zelltoxisch wirkt und verantwortlich ist für die Bilirubin

induzierte Enzephalopathie mit der schlimmsten Ausprägung, dem Kernikterus (Oh et al. 2003). Experimente mit Rattenneuronen haben gezeigt, dass Bilirubin in der Lage ist eine Apoptose über die Mitochondrien durch Aktivierung der NMDA-Rezeptoren zu induzieren (Rodrigues et al. 2002, Grojean et al. 2000). In reifen Neugeborenen werden im Vergleich zu Frühgeborenen aufgrund einer ausgereiften Blut-Hirnschranke höhere Plasmakonzentrationen an indirektem Bilirubin toleriert, obwohl auch hier die therapeutische Grenze immer wieder zur Diskussion steht ohne, dass es hierzu neue Daten gibt.

Aus unserer Arbeitsgruppe gibt es Hinweise, dass aufgrund des höheren Gehaltes an Bilirubin die Oxidierbarkeit des Plasma beim Neonaten geringer sein könnte (Wiedemann et al. 2003).

Im Rahmen einer Beatmung mit bis zu einem FiO_2 von 1,0 beim Atemnotsyndrom, Inflammation durch Infektion oder Reperfusionsschaden bei Reanimation, ist eine Zunahme des oxidativen Stresses beim Frühgeborenen beschrieben (Saugstad et al. 2001). Eine signifikant höhere Ratio oxidierten Coenzym Q10/ Gesamtmenge Coenzym Q10 wurde in Neugeborenen mit Asphyxie beschrieben (Hara et al. 1999).

Die Resistenz von Erythrozyten gegen freie Radikale im in vitro Versuch korreliert mit den Spiegeln an mehrfach ungesättigten Fettsäuren und Antioxidantien in den Membranen der Erythrozyten. Die Erythrozyten Frühgeborener sind weniger empfindlich auf die Wirkung freier Radikale verglichen mit den Erythrozyten reifer Neugeborener oder Erwachsener. Ob die Ursache dafür im Verbrauch mehrfach ungesättigter Fettsäuren oder in der Proteinoxidation (Glutathion) liegt, ist nicht ganz klar (Boda et al. 1998, Moison et al. 1996).

Freie Radikale sind aufgrund ihrer extremen Kurzlebigkeit nicht einfach nachzuweisen. Hinweise dafür, dass vermehrt Zellschäden durch Radikale auftreten geben Untersuchungen, die Abbauprodukte einer abgelaufenen Radikalreaktion nachweisen.

So fanden Varsila et al. in der Ausatemungsluft Frühgeborener erhöhte Konzentrationen an Ethan und Penthan, gasförmige Abbauprodukte der Lipidperoxidation (Varsila et al. 1994).

Die Bestimmung des Malondialdehyds als Marker der Lipidperoxidation erlaubt eine Beurteilung des Angriffs von freien Radikalen auf Biomoleküle, in diesem Falle auf mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Es sind erhöhte Spiegel im Plasma zur Geburt, in engem Zusammenhang mit Azidose und Hypoxie, zwei pathologische Situationen mit deutlich reduzierten Antioxidantienspiegeln beschrieben (Schmidt et al. 1996, Hara et al. 1999).

Ein niedriger Plasmaspiegel an antioxidativen Substanzen zum Zeitpunkt der Geburt ist als unabhängiger Risikofaktor für die Mortalität Frühgeborener beschrieben (Silvers et al. 1998).

1.2.2 Neugeborene und freies Nicht Transferrin gebundenes Eisen, NTGE

Freies Nicht-Transferrin-gebundenes Eisen spielt bei der Pathogenese der sogenannten radikal-assoziierten Erkrankungen des Frühgeborenen eine zentrale Rolle.

Die Veränderung des Sauerstoffpartialdruckes nach der Geburt und die damit verbundene oxidative Schädigung der Schleimhautsekrete und der assoziierten Zellen führt zu einer Invasion von Makrophagen und Granulozyten, die im Rahmen der Inflammation Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid freisetzen (Groneck et al. 1994).

Protektive antioxidative Enzyme oder Moleküle wie Katalase, Glutationperoxidase und Gluthation sind im Alveolartrakt des Neonaten vermindert (Jain et al. 1995, Van Zoeren-Grobbe et al. 1997).

Im Rahmen dieser geschwächten antioxidativen Abwehrlage kommt es zu einer Induktion der Radikalgenerierung über die Fenton-Reaktion.

Wasserstoffperoxid H_2O_2 ist per se nicht sehr toxisch, reagiert jedoch mit freiem, niedermolekularem Eisen zu hoch reaktiven Hydroxylradikalen. Dieses Eisen kann ungebunden, sowie in leichten Verbindungen wie z.B. Albumin oder Citrat vorliegen.

Bei beatmeten Frühgeborenen wurde in bronchoalveolärem Lavagesekret in einem hohen Prozentsatz erhöhte Konzentrationen von BDI, bleomycin detectable iron, nachgewiesen und bei diesen Kindern eine größere Inzidenz chronischer Lungenerkrankungen postuliert (Gerber et al. 1999).

Das niedermolekulare Eisen bei reifen, gesunden Neugeborenen mit gutem APGAR und pH bei Geburt durchaus häufig ist und mit einer überaus hohen Transferrinsättigung vergesellschaftet ist, überraschte erstmalig 1992 die Arbeitsgruppe Evans et al..

1.2.3 NTISS und SNAP als klinischer Indikator für den Schweregrad der Erkrankung.

Die Literatur beschäftigt sich primär mit den beiden klinischen Scores SNAP und NTISS am ersten Lebenstag, um eine Vorhersage über die Mortalität der Frühgeborenen machen zu können. Hierbei zeigte sich der NTISS als unabhängig und vorhersagekräftig

bezüglich der Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation, sowie des gesamten Klinikaufenthaltes bei den Überlebenden, jedoch nicht als vorhersagekräftig bezüglich der Mortalität (Richardson et al. 1993).

Meadow et al. 2002 erhob in einer Studie den SNAP-Score im Verlauf der ersten 14 Lebenstage, kam jedoch zu dem Ergebnis, dass der SNAP am ersten Lebenstag eine Vorhersagekraft über die Mortalität des Patienten erlaubt, diese jedoch mit fortschreitendem Alter des Patienten abnimmt und die Signifikanz verliert.

Ohne den Anspruch einer Vorhersagekraft über den Verlauf des Patienten nutzten wir den SNAP- und NTISS-Score um eine objektivierte Aussage über den klinischen Zustand des Patienten im Verlauf machen zu können.

1.3 Zielstellung

Mit der Annahme, dass die Auswirkung freier Radikale auf den Organismus eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Entstehung von sogenannten Radikal-assoziierten Frühgeborenenenerkrankungen spielt, müssten Frühgeborene mit schwacher antioxidativer Abwehrlage und/oder gesteigerter Produktion freier Radikale im Sinne oxidativen Stresses ein entsprechend schlechteres klinisches Ergebnis haben.

Der erste Teil dieser Studie befasst sich daher mit dem Zusammenhang zwischen Parametern des prooxidativ/ antioxidativen Gleichgewichtes und dem klinischen Zustand des Patienten.

Zur Objektivierung des klinischen Verlaufs wurden während des Beobachtungszeitraumes der Patienten der Score for Neonatal and Acute Physiology (SNAP) und der Score for Neonatal Therapeutic Intervention Scoring System (NTISS) herangezogen, und die Ergebnisse wurden mit den laborchemischen Ergebnissen zur antioxidativen Abwehrlage und dem Status der Lipidperoxidation in Blutproben verglichen.

Mit diesen Scores wurden Daten aus der prä-, peri- und postnatalen Phase der Probanden gesammelt und ausgewertet.

Der zweite Teil der Studie beschäftigt sich mit der Frage in wie weit freies, also Nicht-Transferrin-gebundenes Eisen im Blut kranker unreifer und reifer Neugeborenen vorkommt und ob bei den Kindern mit nachweislich erhöhten Spiegeln freien Eisens zum Zeitpunkt der Blutentnahme eine entsprechend schwächere antioxidative Abwehrlage vorliegt.

Bei beiden Kollektiven dieser Studie stellte sich die Ethikfrage in den Vordergrund, da einer Blutentnahme bei Frühgeborenen eine schwere Gewichtung zufällt. Bei einem

Blutvolumen von ca. 80 ml/kg Körpergewicht konnten wir bei unseren Probanden eine Blutentnahme zu Studienzwecken in Anbetracht der Größe und der Schwere der Erkrankung bei Früh- und Neugeborenen nicht vertreten.

Hier konnten wir im ersten Teil der Studie auf eine Mikromethodik (Kohlschütter et al. 1995, Finckh et al. 1995, Boda et al. 1998) zurückgreifen, für die das Material aus den Kapillaren bereits zur Bestimmung des Bilirubins genutzt worden waren und sonst verworfen worden wären.

Im zweiten Teil der Studie legten wir vertretbare Modalitäten für die Blutentnahme zur Bestimmung des NTBI fest, die immer an eine medizinisch notwendige Blutentnahme gebunden war, sowie weitere Parameter zur Darstellung der antioxidativen Abwehrlage.

2 Patienten, biochemische und klinische Methoden

2.1 Patienten

2.1.1 Kollektiv des ersten Studienteils mit Erhebung der klinischen Scores und Analyse des pro-/ antioxidativen Gleichgewichtes.

Innerhalb des Zeitraums September 1997 bis Juni 1998 wurden insgesamt 46 Frühgeborene der Kinderintensivstation der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf untersucht.

Bei diesen Frühgeborenen handelte es sich um extrem unreife Frühgeborene mit einem Gestationsalter von 24 bis 31 Wochen, sowie reifere Kinder mit einem Gestationsalter von 32-34 Wochen.

Das zusammengefasste und gemeinsam beurteilte Kollektiv zeigt ein mittleres Gestationsalter von 29,8 Schwangerschaftswochen.

Das Studium dieses Kollektivs umfaßte zwei wesentliche Schwerpunkte: Zum einen die Bestimmung der pro-/ antioxidativen Abwehrlage der Kinder, die über Messung spezieller Parameter in Kapillarblutproben erfolgte; zum anderen die Erhebung klinischer Daten aus der prä-, peri-, und postnatalen Phase der Frühgeborenen.

Die Laboruntersuchungen erfolgten im Blut aus nicht weiter benötigten Kapillaren, zur routinemäßigen Hämatokrit- und Bilirubinbestimmung. Für die Studie der Frühgeborenen erfolgte zu keinem Zeitpunkt eine Blutentnahme zu wissenschaftlichen Zwecken.

Es wurden alle zur photometrischen Bilirubinbestimmung anfallenden Kapillarblutproben des oben beschriebenen Frühgeborenenkollektivs gesammelt und bei 4°C für maximal 12 Stunden im Dunkeln gelagert.

Zur Weiterverarbeitung wurden die Kapillaren erneut zentrifugiert (300g, 5 min), anschließend zwischen Plasma und Zellsediment durchtrennt und sowohl Plasma, als auch Zellsediment wurden unter Argonstrom in getrennte Teströhrchen überführt. Das Plasma wurde nach Argonüberschichtung bei -80°C eingefroren.

Das Zellsediment wurde mit PBS/NaCl-Gemisch gewaschen und zur Bestimmung der Radikalresistenz der Erythrozyten, wie unter beschrieben eingesetzt.

Im Plasma dieses Patientenkollektives wurden folgende Parameter bestimmt:

1. Malondialdehyd (Produkt der Lipidperoxidation)
2. Lipophile Antioxidantien (alpha-Tocopherol, gamma-Tocopherol, Coenzym Q10)
3. Cholesterin (lipophile Bezugsgröße)
4. Coeruloplasmin
5. Spektrum der Fettsäuren (v.a. Linolsäure, Arachidonsäure, Docosahexansäure)

Alle Messungen erfolgten mit mikromatisierten Methoden, die den Einsatz von nur 5µl Plasma je Methode ermöglichten und die in der Kinderklinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf entwickelt wurden (Kohlschütter, Agbenu et al. 1995, Finckh et al. 1995, Hübner et al. 1988).

Da sowohl der Plasmaanteil, als auch der Füllungsstand der Kapillaren variierten enthielten einige Proben nicht genügend Material, um alle Parameter bestimmen zu können. Bei diesen Proben waren wir gezwungen, auf einen bzw. mehrere Parameter zu verzichten.

2.1.2 Kollektiv des zweiten Studienteils mit Bestimmung von NTBI und Analyse des pro-/ antioxidativen Gleichgewichtes

Innerhalb des Zeitraumes Dezember 1997 bis März 1998 wurden insgesamt 30 kranke Früh- und Neugeborene der Kinder- Intensivstation und der Neugeborenenstation der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin untersucht. Dazu wurden insgesamt 49 heparinisierte Blutproben mit maximal 500 µl zu einem Zeitpunkt entnommen, indem eine routinemäßige Punktion erfolgte.

Dies geschah unter der Voraussetzung, daß die Kinder mindestens eines der folgenden Charakteristika erfüllten:

- a. Körpergewicht von mindestens 2500 g.
- b. Polyglobulie
- c. Der Proband stand unmittelbar vor einer Bluttransfusion.

Das postkonzeptionale Alter der Probanden rangiert von der 26. bis 43. Schwangerschaftswoche, im Mittel 38 Schwangerschaftswochen.

Das Lebensalter der Probanden zum Zeitpunkt der Punktion rangierte vom 1.-114. Lebenstag, im Mittel 18. Lebenstag.

Das Studium dieser Gruppe umfaßte zwei Schwerpunkte. Zum einen untersuchten wir die Blutproben auf das Vorkommen freien Eisens (Nicht-Transferrin-gebundenes Eisen), zum anderen untersuchten wir parallel das antioxidative Abwehrvermögen dieser Kinder.

Als Ergänzung erhoben wir retrospektiv klinische Daten aus der postnatalen Phase.

Die Laboruntersuchungen erfolgten aus heparinisierten Blutproben mit 500µl Inhalt, die unter den bereits genannten Voraussetzungen entnommen wurden und dann im Dunkeln bei 4°C für maximal 12 Stunden gelagert wurden.

Zur Weiterverarbeitung wurden die Blutproben zentrifugiert (3000 U/min, 5 Minuten).

Das Plasma wurde wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben in getrennte Teströhrchen überführt, mit Argongas überschichtet und bei -80°C eingefroren.

Das Zellsediment wurde in einem PBS/ NaCl-Gemisch gewaschen und zur Bestimmung der Radikalresistenz der Erythrozyten wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben eingesetzt.

Im Plasma wurden folgende Parameter bestimmt:

1. Nicht-Transferrin-gebundenes Eisen
2. Malondialdehyd (Produkt der Lipidperoxidation)
3. Lipophile Antioxidantien (alpha-Tocopherol, gamma-Tocopherol, Coenzym Q10)
4. Cholesterin (lipophile Bezugsgröße)
5. Coeruloplasmin
6. Spektrum der Fettsäuren (v.a. Linolsäure, Arachidonsäure, Docosahexaensäure)

Alle diese Messungen mit Ausnahme der Bestimmung des NTBI, erfolgten mit mikromatisierten Methoden wie bereits in Kapitel 2.1.1 beschrieben, die es mit dem Einsatz von 5µl Plasma je Methode ermöglichten neben der NTBI-Bestimmung einen umfangreichen pro-/ antioxidativen Status wie bei dem Frühgeborenenkollektiv zu bestimmen.

2.2 biochemische Methoden

2.2.1 AAPH-Hämolysetest-Mikromethode

2.2.1.1 Prinzip des AAPH-Hämolysetestes

Es wird die von Boda, Finckh et al. entwickelte Mikromethode zur Bestimmung der Radikalresistenz der Erythrozyten *in vitro* eingesetzt (Boda 1998). Dabei werden 15 µl gereinigtes Erythrozytenkonzentrat in Form einer 0,5 %igen Suspension über 2½ Stunden bei 37°C mit dem Radikalgenerator AAPH (2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride) inkubiert. Die Diazo-Verbindung AAPH zerfällt in Lösung bei 37°C in Stickstoff und zwei Kohlenstoff-Radikale (Abb. 2.1(a)).

Bei dieser Temperatur hat AAPH eine lange Halbwertszeit von 175 Stunden, so daß innerhalb der ersten Stunden eine nahezu konstante Menge an Kohlenstoff-Radikalen generiert wird (Niki et al. 1990).

In einem weiteren Schritt reagieren diese Kohlenstoff-Radikale mit Sauerstoff zu Peroxyl-Radikalen (Abb. 2.1 (b)), welche die Lipide und Proteine der Erythrozyten angreifen.

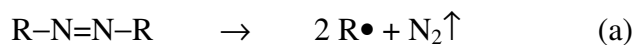


Abb. 2.1: Die Entstehung von Kohlenstoff-Radikalen (a) und Peroxyl-Radikalen (b) durch den Zerfall von Diazo-Verbindungen (z.B. AAPH) (Barclay et al. 1984); R = Kohlenstoffrest, O = Sauerstoff, N = Stickstoff, • = freies Elektron

Sobald die antioxidativen Schutzmechanismen der Erythrozyten aufgebraucht sind, kommt es zum Integritätsverlust der Zellmembran und nachfolgend zur Hämolyse. Es wird die Extinktion des durch die Hämolyse freigesetzten Hämoglobins photometrisch bestimmt (540 nm) und zur Berechnung des Hämolysedegades eingesetzt. Dazu wird der Grad der Hämolyse in einem Reaktionsansatz alle 30 Minuten bestimmt und in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in einem Diagramm dargestellt. Mithilfe der sich dadurch ergebenden sigmoiden Funktion läßt sich rechnerisch die Inkubationszeit ermitteln, bei der 50 % der Erythrozyten hämolysiert sind. Dieser Wert wird H 50 genannt und in Minuten Inkubationszeit angegeben.

2.2.1.2 Materialien/ Reagenzien

- Spektrophotometer Pye Unicam SP 8-100
- Zentrifuge Hettich Universal
- Zentrifuge „Biofuge A“ der Firma Heraeus, Sepatech
- Wasserbad mit Thermostat (Gesellschaft für Labortechnik mbH & Co.)
- Ampullenritzmesser „Balduin“
- ½-Mikroeinmalküvetten der Firma Ratiolab, Art.-Nr. 1201
- NaCl 0,9% der Firma B. Braun Melsungen AG
- Phosphatpuffer „Seromed“ PBS (Dulbeco) ohne Ca^{++} , Mg^{++}
- destilliertes Wasser (Aqua dest.)
- Triton X der Firma Serva/ Heidelberg
- AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride) der Firma Fluka; Art.-Nr. 56510 (in der Literatur zum Teil auch mit ABAP abgekürzt)

2.2.1.3 Methode des AAPH-Hämolyse-Mikrotests

1. Entnahme der Blutprobe
2. Zentrifugation der Blutprobe (5 Minuten, 3000 Umdrehungen)
3. Verarbeitung: Nach Zentrifugation und Trennung des Plasmaanteils vom Zellsediment Zugabe von 4 ml NaCl/ PBS-Gemisch zum Erythrozytensediment und vollständiges Auflösen des Sediments durch Schwenken. Eine weitere kurzzeitige Aufbewahrung bei 4°C ist jetzt möglich (verschließbares Plastikspitzröhrchen; maximal 24 Stunden)
4. Waschen des Erythrozytensediments: Nach erneutem vollständigen Durchmischen Zentrifugation für 5 min bei 3000 U/min und Verwerfen des Überstandes (scharfes Absaugen)
5. Herstellung einer 0,5%igen Erythrozytensuspension in Reagenzgläsern:

15 µl Erythrozytensediment + 2985 µl PBS-Lösung

6. Reaktionsansatz in 3 rundbödigen Glas-Reagenzgläsern (A,B,C):

A und B: 1200 µl 0,5%ige Ery.-Suspension + 1200 µl AAPH (74 mM)

C: 400 µl 0,5%ige Ery.-Suspension + 400 µl NaCl/PBS-Gemisch

7. Inkubation des Ansatzes bei 37°C in einem Wasserbad (der Ansatz muß vollständig im Wasser stehen) unter leichtem horizontalen Rütteln bei offenen Reagenzgläsern (Schutz gegen Kondenswasser mit Alufolie, ohne die Reagenzgläser vollständig zu verschließen)
8. Vorbereitung von 1/2-Mikroeinmalküvetten zur Extinktionsmessung:

Küvetten für Ansatz A und C: 350 µl NaCl/PBS-Gemisch (4°C)

Küvette für Ansatz B: 350 µl 0,1%ige Triton X-100 (4°C)

(Die Temperaturen dieser beiden Lösungen sollten 4°C betragen, um bei Zugabe der Aliquots aus den Ansätzen einen weiteren Zerfall des AAPH in die aktive Stufe zu verhindern.)

9. Aliquotentnahme aus den Ansätzen A,B,C:

Ansatz A und B: Alle 30 min. Entnahme von 350µl Aliquot (nach vorherigem, gutem Durchmischen durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette) direkt in die vorbereiteten 1/2-Mikroeinmalküvetten.

Ansatz C: Gleiche Vorgehensweise, allerdings nur nach 30 und 150 min

Beenden der Entnahmen nach 150 min. (evtl. nach 180 min.)

10. Zentrifugation der 1/2-Mikroeinmalküvetten der Ansätze A und C für 5 min bei 3000 U/min
11. Photometrische Messung der Extinktion aller Ansätze bei 540 nm nach Nullabgleich mit NaCl/PBS-Gemisch
12. Berechnung des Hämolysegrades:

$$\frac{EA - EC^*}{EB - EC^*} \times 100 = \text{Hämolyse in \%}$$

E = Extinktion

A = Ansatz A = Probenwert

B = Ansatz B = Wert der totalen Hämolyse

C = Ansatz C = Negativkontrollwert

C* = Mittelwert von C_{30min.} und C_{150min.} = (C_{30min.} + C_{150min.})

Die H 50-Werte, d.h. die Inkubationszeit in Minuten, bei der 50 % der Erythrozyten hämolysiert sind, wurden anhand des Software-Programms GraphPad TM („Plot, analyze data and digitize graphs“; Motulsky H, M.D.; Departement of Pharmacology, University of California, San Diego) ermittelt.

2.2.2 Bestimmung von Malondialdehyd im Plasma

2.2.2.1 Prinzip der Malondialdehydbestimmung

Die Methode der Malondialdehydbestimmung in kleinen Mengen Plasma (5 µl) beruht grundsätzlich auf der Arbeit von Fukunaga, Suzuki und Takama 1993.

Das im Plasma vorhandene Malondialdehyd (MDA) wird unter Hitzeeinwirkung bei einem pH-Wert von 3.5 mit Thiobarbitursäure (TBA) gekoppelt. Dieser TBA-MDA-Komplex (in der Literatur auch als TBARS bezeichnet = thiobarbituric acid reactive substances) wird in Butanol extrahiert. Das Butanolextrakt wird über die HPLC (high performance liquid chromatography) getrennt und der TBA-MDA-Komplex mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors (Extinktion 515 nm, Emission 553 nm) gemessen. Der Vorteil dieser Methode gegenüber anderen liegt darin begründet, daß sie durch den Einsatz der HPLC und der daran anschließenden Fluoreszenzdetektion sehr spezifisch ist.

Es wird ausschließlich mit Einwegplastikmaterial gearbeitet, da sämtliche Glasgeräte durch Spülmittelreste mit Aldehyden kontaminiert sein könnten.

2.2.2.2 Materialien/ Reagenzien

- HPLC-System bestehend aus Pumpe (Bischoff, Leonberg), Injektionssystem (40 µl Schleife, Rheodyne), Säule (Spherisorb ODS II, 125 × 4,6 mm, Bischoff, Leonberg), Fluoreszenzdetektor (RF 535, Shimadzu) und Integrator (LKB Bromma, 2220 Recording Integrator)
- Eppendorfprobenthermostat (heizbar bis 95°C)
- Zentrifuge „Biofuge A“ der Firma
- 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP; MG 220,3 g) der Firma Fluka, Best.Nr. 86570
- Methanol Lichrosolv-Qualität der Firma Merck
- Essigsäure p.a. 100% Eisessig der Firma Merck, Best.Nr. 1.00063

- Wasser Lichrosolv-Qualität der Firma Merck oder HPLC-Wasser der Firma Baker
- Natriumacetat wasserfrei suprapur der Firma Merck, Best.Nr. 1.06264
- Diethylenetriamine-pentaacetic acid (DTPA) der Firma Fluka, Best.Nr.
- 2-Thiobarbitursäure der Firma Aldrich, Best.Nr.
- 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol (BHT) der Firma Fluka, Best.Nr.34750
- Ethanol Lichrosolv-Qualität der Firma Merck
- 1-Butanol Lichrosolv-Qualität der Firma Merck, Best.Nr. 1.01988
- Acetonitril Lichrosolv-Qualität

2.2.2.3 Methode der MDA-Bestimmung

Vorbereitung

Das HPLC-Laufmittel (80% Wasser + 20% Acetonitril) herstellen und die Pumpe auf eine niedrige Förderungsgeschwindigkeit einstellen (z.B. 0,25 ml/min). Anschließend den Fluoreszenzdetektor zünden.

Pufferherstellung

In ein graduiertes 50 ml Nunc-Röhrchen werden zuerst 45 ml Wasser und dann 5 ml Eisessig gegeben. Anschließend werden 427 mg Natriumacetat, 20 mg DTPA und 100 mg Thiobarbitursäure hinzugefügt.

Diese Pufferlösung sollte für mindestens 1 Stunde auf dem Roller gemischt werden.

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. Diese Stammstandardlösung (Konzentration: 51,4 mmol/l) kann bei -20 C etwa 8 Wochen aufbewahrt werden.

50 µl dieser Stammlösung werden in einem Plastikspitzröhrchen mit 4950 µl Wasser verdünnt (Lösung I; 1:10 verdünnt; Konzentration: 0,514 mmol/l). 500 µl Lösung I werden mit 4500 µl Wasser ebenfalls in einem Plastikspitzröhrchen verdünnt (Lösung II; 1:10 verdünnt; Konzentration 51,4 µmol/l). 500 µl Lösung II werden mit

4500 µl Wasser verdünnt (Lösung III; 1:10 verdünnt; Konzentration 5,14 µmol/l).
Lösung III wird nun noch weiter in Eppendorftubes verdünnt:

Tabelle 2.1: Herstellung der Standardreihe:

	2,57 µmol/l	1,29 µmol/l	0,64 µmol/l	0,32 µmol/l	0,16 µmol/l
Lösung III	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
Wasser	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl

Herstellung der BHT-Lösung

100 mg BHT werden in einem Plastikspitzröhrchen in 1 ml Ethanol aufgelöst (10 %ige Lösung).

Durchführung

In Eppendorfgefäßen werden je 5 µl des zu messenden Plasmas, ein Blindwert (Wasser) und die Standardreihe

(S2: 2,57 µmol/l; S3: 1,29 µmol/l; S4: 0,64 µmol/l, S5: 0,32 µmol/l, S6: 0,16 µmol/l) vorgelegt. Mit der Multipette wird zu allen Proben 200 µl des Puffers und dann wiederum mit einer Multipette 10 µl BHT-Lösung gegeben. Die Proben werden verschlossen, jede Probe kurz gevortext und alle Proben für 45 Minuten bei 95°C im Eppendorfthermostat inkubiert. Wichtig: Während und auch noch einige Zeit nach dieser Inkubation sollten die Eppendorfprobentubes mit einem schweren Gegenstand (z.B. einem Buch) beschwert werden, da sich sonst die Deckel dieser Tubes lösen können.

Nach den 45 Minuten werden die Proben entnommen und zu jeder Probe wird nach dem Abkühlen mit einer Multipette 200 µl n-Butanol gegeben. Die Probentubes werden wieder verschlossen und jede Probe wird für 15 Sekunden (Stoppuhr) gevortext. Alle Proben werden jetzt in der Eppendorfzentrifuge für 5 Minuten bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert, je 120 µl der Butanolphase (Überstand) werden in neue Eppendorfgefäße abgehoben und diese anschließend im Kühlschrank aufbewahrt.

Die HPLC-Pumpe wird jetzt auf eine Förderungsgeschwindigkeit von 1 ml/min eingestellt und je 40 µl der Butanolphase injiziert. Der Peak für den MDA-TBA-Komplex erscheint nach einer Retentionszeit von ungefähr 3.6 Minuten.

Berechnung

Die MDA-Konzentrationen in den Plasmaproben werden mit Hilfe der Standardreihe berechnet.

2.2.3 Bestimmung von lipophilen Antioxidantien (alpha- und gamma-Tocopherol, Coenzym Q10) im Plasma

2.2.3.1 Prinzip der Tocopherol- und Coenzym Q10-Bestimmung

Die Messungen der lipophilen Antioxidantien Vitamin E (alpha- und gamma-Tocopherol) und Coenzym Q10 beruhen auf den Arbeiten von Finckh et al. 1995. Diese Mikromethode erlaubt eine Messung der oben genannten lipophilen Antioxidantien aus nur 5 µl Plasma mittels High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC). Nach vorangegangener Extraktion erfolgen eine Auftrennung der Komponenten auf der HPLC-Säule und anschließend deren elektrochemische Detektion. Dazu werden die redoxaktiven Komponenten zuerst reduziert (Potential: -0.60 V) und im weiteren Verlauf in der analytischen Zelle bei einem Potential von -0,15 V und +0,60 V wieder oxidiert und dabei detektiert.

Ein großer Vorteil dieser Methode besteht neben dem Einsatz von nur 5 µl Plasma in der Mitführung der internen Standards gamma-Tocotrienol, Ubiquinol-9 und Ubiquinone-9 in jeder Probe.

2.2.3.2 Materialien/ Reagenzien

- HPLC-Pumpe (Pharmacia LBK, Freiburg, Modell 2150)
- Injektionssystem (40 µl Schleife, Rheodyne, Cotati, CA)
- SuperPac Pep-S RP C2/C18 Säule (250 × 4.0 mm, 5 µm Partikelgröße, Pharmacia)
- Vorsäule (10 × 4.0 mm, 5 µm Partikelgröße, Pharmacia)

- Detektionssystem bestehend aus einem elektrochemischen Detektor (Coulchem Modell 5100 A oder 5200, ESA, Bedford, MA) verbunden mit einer Konditionierungszelle (Modell 5020, -0,60 V) und einer analytischen Zelle (Modell 5011, Elektrode 1 -0,15 V; Elektrode 2 +0,60 V)
- Integrator SP 4270 (Spectra-Physics, Darmstadt)
- Ubiquinone-9 und Ubiquinone-10 der Firma Sigma Chemical Co. (Deisenhofen)
- alpha-Tocopherol, gamma-Tocopherol und gamma-Tocotrienol der Firma Merck (Darmstadt)
- Methanol, Ethanol und 2-Propanol Lichrosolv-Qualität der Firma Merck
- Lithium-Perchlorat der Firma Fluka (Neu-Ulm)
- 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol (BHT) der Firma Fluka, Best.Nr.34750
- R:M, bestehend aus Reagenzalkohol (5% Propanol, 95% Ethanol) + Methanol im Verhältnis 1:1

2.2.3.3 Methode der Tocopherol- und Coenzym Q10-Bestimmung

Vorbereitung

Das Laufmittel wird hergestellt (13,4 mM Lithium-Perchlorat in Methanol:Ethanol:2-Propanol, 88/24/10, v/v), gut gemischt und mit Helium entgast. Die Pumpe wird auf eine Förderungsgeschwindigkeit von 1,2 ml/min eingestellt.

Herstellung der Standard-Lösungen

Diese Lösungen werden hergestellt durch Auflösen der entsprechenden Menge des reinen Standards (Tocopherole, Ubiquinone-9 und Ubiquinone-10) in Ethanol. Die Standard-Lösungen von Ubiquinol-9 und Ubiquinol-10 werden aus den korrespondierenden Ubiquinonen hergestellt, indem Natrium-Dithionit als Reduktionsmittel eingesetzt wird.

Alle Standard-Lösungen werden unter Argonstrom verschlossen und bei -20°C in lichtgeschützten Glasfläschchen aufbewahrt. Die Berechnung der Konzentrationen und die Überprüfung der Reinheit erfolgt über bekannte Extinktionskoeffizienten und verfügbare Wellenlängen.

Herstellung der internen Standards

- gamma-Tocotrienol: 1:50 mit Ethanol verdünnen
- Ubiquinol-9: 1:4 mit Ethanol vorverdünnen, 1:50 weiterverdünnen

Auch hier gilt: Lichtgeschützte Flaschen verwenden und luftdicht verschließen!
Beide Standards bei -20°C aufbewahren!

Durchführung

5 µl Plasma werden in einem kleinen, mit Alufolie umwickelten Glasspitzröhrchen vorgelegt, dann werden 25 µl gamma-Tocotrienol und 25 µl Ubiquinol-9 dazu pipettiert. Nach Zugabe von 50 µl BHT wird das Röhrchen verschlossen (passende Schraubverschlüsse) und 10 sec gevortext. Dann werden 500 µl Hexan hinzu gegeben und diesmal für 2 min gevortext (Stoppuhr). Nach Zentrifugation (1000g, 5 min, 4°C) lassen sich 400 µl des Überstandes abheben (verschließbares, mit Alufolie umwickeltes Plastikspitzröhrchen). Dieser Überstand wird unter Argonstrom vollständig eingedampft und anschließend in 40 µl R:M aufgenommen. Davon werden 25 µl in das HPLC-System eingespritzt (mindestens 30 µl in der Spritze aufziehen!).

Die Peaks des Chromatogramms sollten sich nach folgenden Retentionszeiten darstellen:

- gamma-Tocotrienol ~ 3,3 min
- gamma-Tocopherol ~ 4,0 min
- alpha-Tocopherol ~ 4,3 min
- Ubiquinol-9 ~ 7,4 min
- Ubiquinol-10 ~ 9,7 min
- Ubiquinone-9 ~ 12,0 min
- Ubiquinone-10 ~ 16,5 min

Berechnung

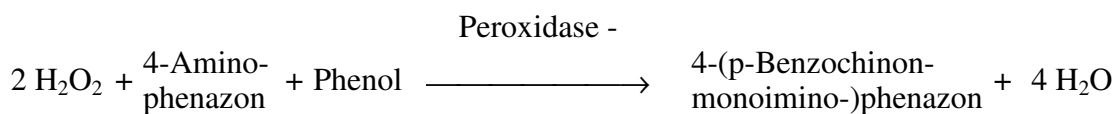
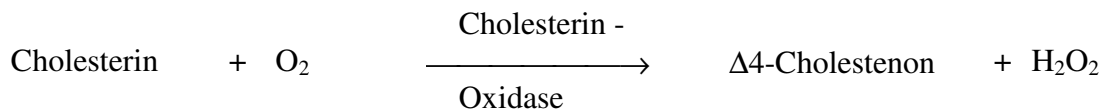
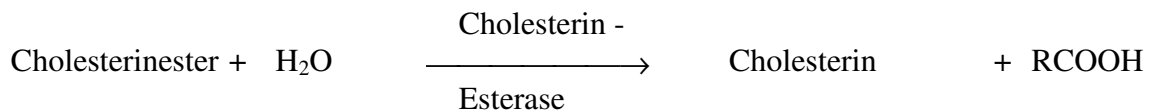
Die Konzentrationen der lipophilen Antioxidantien im Plasma werden bestimmt, indem die Fläche unter dem jeweiligen Peak mit der des entsprechenden internen Standards ins Verhältnis gesetzt wird. Dabei dient gamma-Tocotrienol als interner Standard für gamma-Tocopherol und alpha-Tocopherol, Ubiquinol-9 als interner Standard für Ubiquinol-10 und Ubiquinone-9 als interner Standard für Ubiquinone-10.

2.2.4 Bestimmung von Cholesterin im Plasma

Die Messungen der Cholesterinwerte wurden von Frau Giesecking im Labor der Universitätskinderklinik Hamburg durchgeführt.

2.2.4.1 Prinzip der Cholesterin-Bestimmung

Cholesterin wird photometrisch nach der CHOD-PAP-Methode bestimmt:



2.2.4.2 Materialien/Reagenzien

- Spektralphotometer (Pye Unicam SP 8-100)
- Wellenlänge 546 nm
- Küvetten (1 cm Schichtdicke)
- Cholesterin-Reagenz (1442350, Boehringer-Mannheim GmbH)

2.2.4.3 Methode der Cholesterin-Bestimmung

Durchführung

In Reagenzgläser werden je 20 µl Plasma und 2 ml Reagenzlösung pipettiert. Für jede Meßreihe muß ein Reagenzien-Leerwert mitgeführt werden, der ausschließlich 2 ml

Reagenzlösung enthält. Der Ansatz wird gut gemischt und dann für 10 min bei 20-25°C inkubiert. Innerhalb von 1 Stunde wird bei einer Wellenlänge von 546 nm die Extinktion der Probe gegen den Reagenzien-Leerwert gemessen (= E_{Probe}).

Berechnung

Die Konzentration (c) des Cholesterins (in mg/dl) lässt sich direkt aus folgender Formel berechnen:

$$c = 853 \times E_{\text{Probe}}$$

2.2.5 Bestimmung von Coeruloplasmin im Plasma

Die Messungen wurden von Frau Wernicke im Neurochemischen Labor der Universitätskinderklinik Hamburg durchgeführt.

2.2.5.1 Prinzip der Coeruloplasmin-Bestimmung

Die Coeruloplasmin-Konzentration wird mit der radialen Immundiffusion bestimmt. Dabei werden Agarosegel-Platten eingesetzt, die in der Agargelschicht ein gegen das Coeruloplasmin gerichtetes Antiserum enthalten. Die Proben werden in die im Agargel ausgestanzten Auftragstellen eingefüllt. Die antigenhaltige Probe diffundiert kreisförmig (radial) in das Gel und trifft auf den darin enthaltenen Antikörper. Im Äquivalenzbereich befinden sich Antigen und Antikörper im Gleichgewicht, d.h. sie liegen in gleichen Konzentrationen vor, und dadurch bildet sich ein Präzipitatring. Der Durchmesser des Kreises ist proportional der Antigenkonzentration der Probe.

2.2.5.2 Materialien/Reagenzien

- Immundiffusionsplatten (NOR-Partigen[®], Behring Diagnostika)
- Kontrollplasma (NOR-Partigen, Behring Diagnostika)
- Messlineal mit 1/10 mm Einteilung
- Wertetabelle

2.2.5.3 Methode der Coeruloplasmin-Bestimmung

Durchführung

Vorbereiten der Platte

Deckfolie des Alubehälters abziehen, Platte entnehmen und geöffnet ca. 5 min bei Raumtemperatur stehen lassen, wenn in den Auftragsstellen Kondenswasser vorhanden ist.

Beschicken der Platte

Auftragsstelle 1: 5 µl Kontrollplasma

Auftragsstelle 2-12: 5 µl Patientenprobe

Die 5 µl Plasma jeweils vorsichtig in die Mitte der Auftragsstelle einfüllen, ohne die Gelschicht zu beschädigen. Nach dem Auftragen die Platte fest verschließen und bei Raumtemperatur 2 Tage stehen lassen.

Ablesen der Platte

Nach Ablauf der Diffusionszeit von 2 Tagen werden die Präzipitatchdurchmesser (D) auf 0,1 mm genau ausgemessen.

Auswertung

Anhand der Kontrollprobe werden die Qualität der Platte und die Richtigkeit der Testdurchführung überprüft. Der ermittelte Wert muß im Vertrauensbereich des deklarierten Sollwertes liegen, dann können die Patientenproben aus der Bezugswertetabelle abgelesen werden.

2.2.6 Bestimmung der Fettsäuren im Plasma

Die Zusammensetzung der Fettsäuren wurde im Neurochemischen Labor der Universitätskinderklinik Hamburg von Frau Sehringer-Mansour gemessen.

2.2.6.1 Prinzip der Bestimmung des Spektrums der Fettsäuren

Die Fettsäuren im Plasma werden mit organischen Lösungsmitteln extrahiert und ihre Zusammensetzung gaschromatographisch bestimmt.

2.2.6.2 Materialien/ Reagenzien

- Zentrifuge
- Trockenschrank
- Wasserbad
- Pyrexröhrchen mit Verschuß
- Schliffröhrchen
- Stickstoff
- Phosphatpuffer Seromed PBS-Dulbeco, Biochrom KG, Berlin
- Chloroform (Merck 2445)
- Methanol (Merck 6007)
- Butylhydroxytoluol BHT (Fluka 34750)
- Hexan (Merck 4391)
- Interner Standard (0,1 mg/µl) bestehend aus:
19:0 (Alltech, Derefield) und 27:0 (Ultra Scientific, North Kingstone) im Verhältnis 1:1

2.2.6.3 Methode der Fettsäuren-Bestimmung

Vorbereitung

- Vor dem Versuch müssen folgende Lösungen hergestellt werden:
- Folch, herzustellen aus Chloroform und Methanol im Verhältnis 2:1
- BHT-Stammlösung, herzustellen aus 5 g BHT ad 100 ml Methanol
- Folch mit 0,05% BHT, herzustellen aus 99 ml Folch und 1 ml BHT-Stammlösung
- Methanol-Acetylchlorid-Lösung: Zu 50 ml Methanol (im Eisbad) tropfenweise 2,8 ml Acetylchlorid zugeben und mindestens 20 min rühren lassen (Nur unter dem Abzug, heftige Reaktion!).

Durchführung

Zu 10 µl Plasma werden 5 µl interner Standard, 990 µl PBS und 3 ml Folch mit 0,05 % BHT pipettiert. Der Ansatz wird nach gutem Schütteln bei 3000 U/min zentrifugiert. Anschließend wird die untere Phase in lange Pyrex-Röhrchen überführt und unter Stickstoff bei 40°C im Wasserbad eingedampft. Nach Zugabe von 1 ml Methanol-Acetylchlorid-Lösung und gutem Mischen erfolgt eine einstündige Inkubation im Trockenschrank.

Zum abgekühlten Ansatz werden 5 ml Hexan gegeben und wiederum gut gemischt. Die obere Phase wird in Schliff Röhrchen überführt, bei 40°C im Wasserbad unter Stickstoff eingedampft und dann in 10 bis 30 µl Hexan aufgenommen. 1 µl dieses Ansatzes wird in den Gaschromatographen eingespritzt.

2.2.7 Bestimmung des Nicht-Transferrin-gebundenen Eisens im Serum mittels Flammen-Atomabsorptions-Spektrometrie

2.2.7.1 Prinzip der Atomabsorptions-Spektrometrie

Die Bestimmung des Nicht-Transferrin-gebundenen Eisens im Serum erfolgte durch Komplexbildung des freien Eisens mit Nitrilotriessigsäure (NTA) und nachfolgender Ultrafiltration modifiziert nach Singh et al. (1990).

Zur Messung des Eisens im Ultrafiltrat wird mittels eines Autosamplers 20µl aus der Probe in ein elektrisch beheizbares Graphitrohr eingebracht.

Die Temperatur wird automatisch stufenweise gesteigert, so daß die Prozesse der Trocknung, thermischer Zersetzung der Matrix und der thermischen Dissoziation in freie Atome (Atomisierung), nacheinander getrennt ablaufen. Während der Trocknungs- und thermischen Zersetzungs Vorgänge werden Lösemittel- und Matrixdämpfe durch eine Argon-Gasströmung durch das Graphitrohr entfernt. Dieser Gasstrom wird während der Atomisierung (Temperatur 2500°C) unterbrochen, so daß die freien Atome für mehrere Zehntelsekunden im Lichtstrahl verbleiben und zur Lichtabsorption angeregt werden.

Diese Absorption wird mit einer Eisen-Hohlkathodenlampe bei einer Wellenlänge von 248,3 nm gemessen.

2.2.7.2 Materialien/ Reagenzien

- Eppendorf-Pipetten und passende Pipettenspitzen (Saarstedt Nümbrecht)
- Kunststoffröhrchen und -verschlüsse (Greiner Labortechnik)
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge „Biofuge A“ der Firma Heraeus, Sepatech
- Ultrafree-MC Millipore Filter-Einheiten = Low Binding Regenerated Cellulose Ultrafiltration Membrane, 10.000NMWL Filter Unit, 10 mm Durchmesser, (Millipore Corporation, Bedford, MA01730, USA)
- Gefäße zur Messung der Proben im Atomabsorptionsspektrometer
- Nitritotriessigsäure Trinatriumsalz Hydrat 99%, NTA: $N(CH_2CO_2Na)_3 \cdot H_2O$, (Aldrich)
- Waschlösung aus Salpetersäure 65%, (Merck, Darmstadt) + TritonX 100, (Merck)
- Matrixlösung, aus Triton X 100 der Firma Serva, Heidelberg (=1%) + 2 M HNO_3 (=0,02 M) in Aqua dst.
- Spüllösung 0,01M Ethylendiamintetraacetat (EDTA)
- Eisenstandardlösung: 120 µg/l FE herzustellen durch Verdünnen (mittels Matrixlösung) des Konzentrierten Eisenstandards (Sigma 1000 µgFe/ ml in 1% HCl)

2.2.8 Methode der Bestimmung Nicht-Transferrin-gebundenen Eisens

Durchführung

Alle Gefäße und Hilfsmittel wurden mit der Triton X 100- und salpetersäurehaltigen Waschlösung eisenfrei gewaschen.

Das Serum wird im Verhältnis 1:6 mit der 880 mM NTA-Lösung versetzt und gemischt. Der Ansatz wird im geschlossenen Kunststoff-Röhrchen 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und wird danach in einen Millipore Ultrafree MC Filter gegeben. Diese Filter mit ihrem Inhalt werden 120 Minuten bei 700 x g (Biofuge A: 3250 U/min) zentrifugiert. Das Ultrafiltrat kann in dem Reaktionsgefäß der Filtereinheit bis zur atomabsorptionsspektrometrischen Messung bei -20°C aufbewahrt werden.

Für die Messung and der AAS werden die Ultrafiltrate und die Eisenstandardlösung im Verhältnis 1:10 mit Matrixlösung verdünnt. Die Standardkurve aus der Standard- und der Matrixlösung umfaßt einen Konzentrationsbereich von 20µg/l bis 120µg/l Eisen. Die Proben können mit Matrixlösung soweit verdünnt werden, bis Ihre Meßwerte im Bereich der Standardkurve liegen.

Auswertung

Die vom Meßgerät ausgegebene Eisenkonzentration im Ultrafiltrat wird mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert und die vorher zu bestimmende Konzentration des Eisens in der verwendeten NTA-Lösung wird subtrahiert.

2.2.9 Statistische Analysen

Zur statistischen Auswertung fanden Verfahren Anwendung, die nicht auf der Annahme einer Normalverteilung der Daten beruhten, denn diese konnte nicht nachgewiesen werden.

Als Grundlage für die Berechnungen wurde zunächst für jeden Parameter die Fläche unter der Kurve für den entsprechenden Beobachtungszeitraum ermittelt.

Die Signifikanzanalyse erfolgte durch den Wilcoxon-Matched-Pairs-Test. Zum Vergleich der beiden Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt.

Korrelationen wurden mit Hilfe des Spearman-Korrelationskoeffizienten berechnet.

Als Rechenprogramm nutzten wir STATISTICA.

2.3 Klinische Methoden

2.3.1 Klinisch angewandte Methode im Kollektiv des ersten Studienteils

Die klinischen Daten zur Darstellung des Krankheitsverlaufes des ersten Patientenkollektives wurden für die Lebenstage 1, 3, 7, 14, 21, 28 und Entlassungstag von der Kinderintensivstation unter Verwendung der klinischen Scores SNAP (Score for Neonatal Acute Physiology) und NTISS (Neonatal Therapeutic Intervention Scoring System) mit Integration von prä-, peri- und postnatalen Risikofaktoren, erhoben. Dazu benutzen wir wie bereits in der Pilotstudie verwendete Fragebögen (s. Anhang).

Der SNAP-Score umfasst 26 Parameter aus den Bereichen Respiration, Herz-Kreislauf, Neurologie, sowie Blut- und Urinbefunde.

Entwickelt wurde er zur Vorhersage der neonatalen Mortalität. Es werden innerhalb der ersten 24 Lebensstunden sämtliche Organsysteme bewertet und schwere Entgleisungen objektiviert.

Wir nutzten den SNAP-Score mit dem Wissen, dass die Nutzung über 24 Stunden hinaus weniger eine Aussage über das Mortalitätsrisiko ermöglicht, als eine objektive Beurteilung des klinischen Zustandes des Patienten unter intensivmedizinischen Maßnahmen.

Trotzdem bietet der SNAP, wie der NTISS die Möglichkeit den klinischen Verlauf anhand von absoluten Punktwerten zu erfassen und sie mit den biochemischen Parametern korrelieren zu können.

In klinischen Studien wurde der SNAP im Verlauf der ersten Lebenswoche erhoben (Richardson et al. 1993; Kling et al. 1997, Meadow et al. 2002). Von der Arbeitsgruppe, die den Score entwickelt hat, wurde betont, dass dies sinnvoll sein könnte, da Komplikationen und am Aufnahmetag nicht absehbare Folgen erfasst werden könnten.

Der klinische Score NTISS umfasst 61 Parameter aus den Bereichen Respiration, Herz-Kreislauf, Medikation, Stoffwechsel, Ernährung, Transfusion und medizinische Eingriffe.

Ebenso wie mit dem SNAP lässt sich mit dem NTISS der momentane Zustand des Patienten und der Krankheitsverlauf durch ein Punktesystem objektivieren. Da der NTISS als Schwerpunkt den therapeutischen Aufwand widerspiegelt, stellt er eine gute Ergänzung zum SNAP dar. Durch den Einsatz beider Scores wird die Vorhersagekraft beider gesteigert. Hierbei steht ein hoher Punktwert für die schwere der Erkrankung (Gray et al. 1992, Douglas et al.1993).

2.3.2 Klinisch angewandte Methode im Kollektiv des zweiten Studienteils

Aufgrund des sehr variablen Zeitpunktes der Blutentnahme zur Bestimmung freien nicht-Transferrin-gebundenen Eisens und aufgrund des inhomogenen Patientenkollektives bezüglich des Alters und des klinischen Verlaufes, beschränkten wir die klinische Datenerhebung auf wenige Parameter aus den Bereichen Ernährung mit und ohne Eisensupplementation, Blutbefunden, sowie das klinische Outcome mit Diagnoseerhebung.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der klinischen Scores NTISS und SNAP mit Bezug auf den pro-/ antioxidativen Status

Es wurde die untersuchten Frühgeborenen in drei Kollektive eingeteilt und diese jeweils gesondert betrachtet. Das erste Kollektiv besteht aus Kindern von denen wir die Daten aus dem ersten und dritten Lebenstag erheben konnten (n= 32). Das zweite Kollektiv fasst jene Kinder zusammen, von denen wir die Daten des ersten, dritten und 7. Lebenstag erheben konnten (n= 28). Das dritte Kollektiv besteht aus Kindern von denen wir die Daten des ersten, dritten, 7. und 14. Lebenstag erheben konnten (n= 8).

3.1.1 Zusammenhang der klinischen Scores NTISS und SNAP mit Geburtsgewicht und Gestationsalter im ersten Kollektiv

Am ersten und 3. Lebenstag zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Reife der Probanden, sowie deren Geburtsgewicht mit dem SNAP-Score und dem NTISS-Score. Beide Scores nahmen mit zunehmendem Gewicht und zunehmender Reife der Patienten ab.

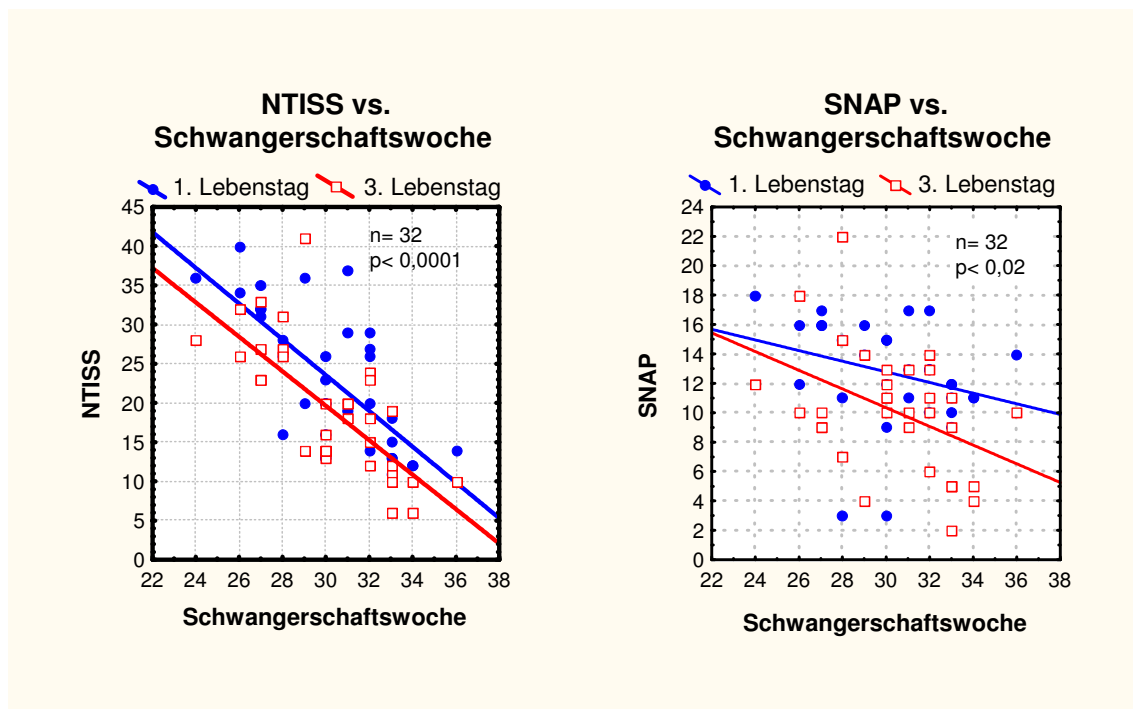


Abbildung 3.1: NTISS- und SNAP-Score am ersten und 3. Lebenstag in Bezug auf das Gestationsalter im ersten Kollektiv.

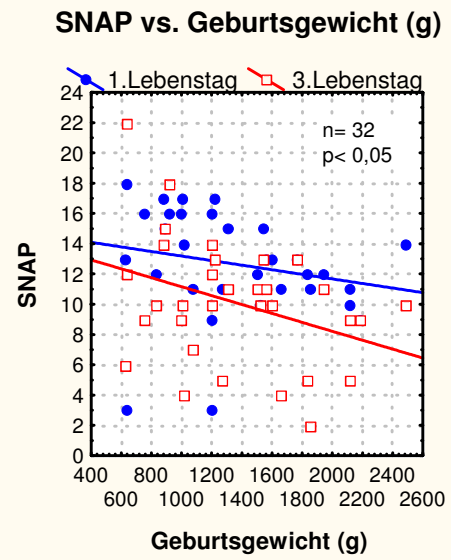
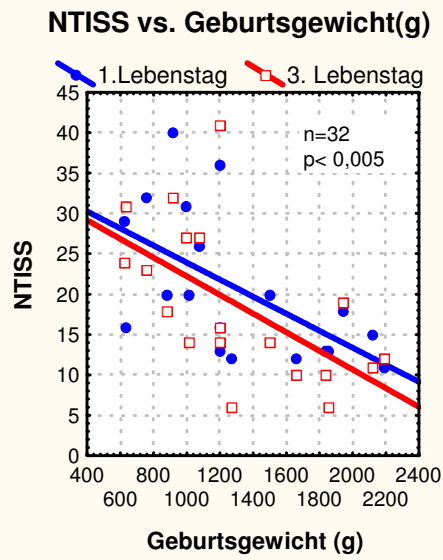


Abbildung 3.2: NTISS- und SNAP-Score am ersten und 3. Lebenstag in Bezug auf das Geburtsgewicht im ersten Kollektiv.

3.1.2 Darstellung der klinischen Scores und der pro-/ antioxidativen Parameter im Verlauf im ersten Kollektiv

Beim Vergleichen der Scores SNAP und NTISS zeigen beide eine signifikant niedrigere Punktzahl am 3. im Vergleich zum 1. Lebenstag.

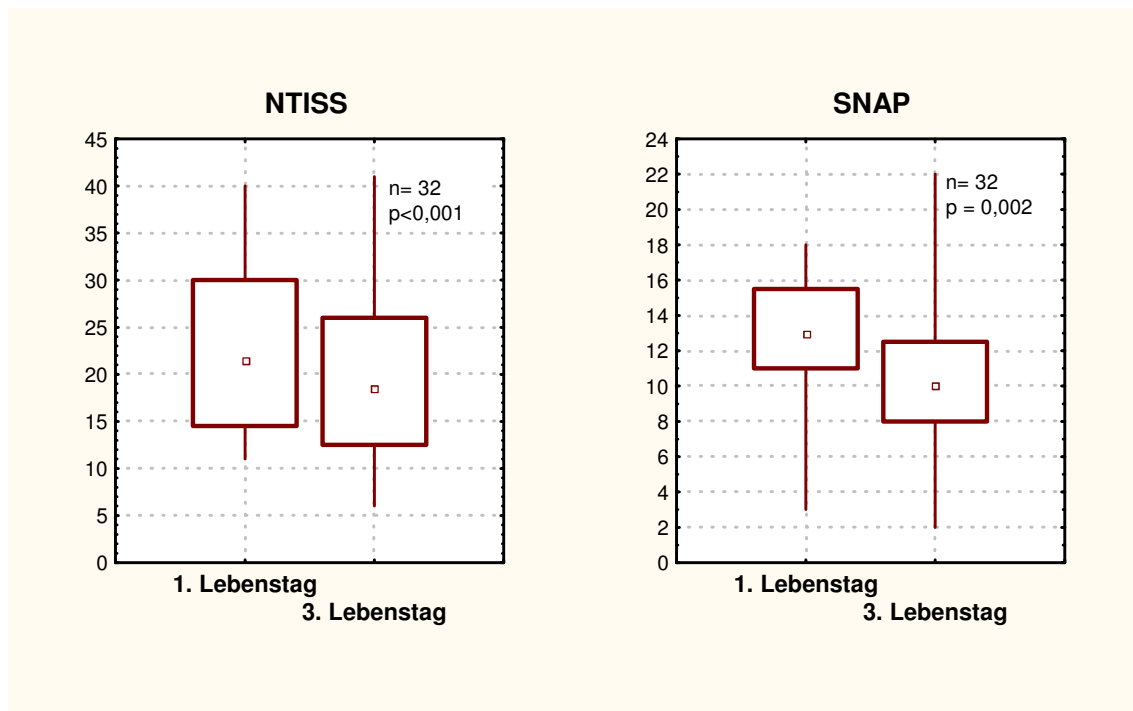


Abbildung 3.3: NTISS und SNAP im Vergleich 1. zu 3. Lebenstag im ersten Kollektiv.

Des Weiteren imponierte ein Abfall des Hämatokrits in den ersten drei Lebenstagen, sowie ein Anstieg des Bilirubins.

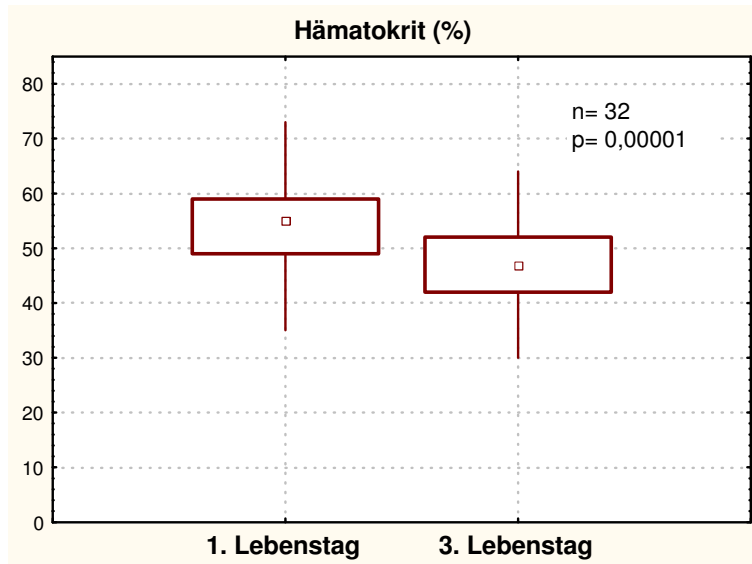


Abbildung 3.4: Hämatokrit im Vergleich 1. zu 3. Lebenstag im ersten Kollektiv.

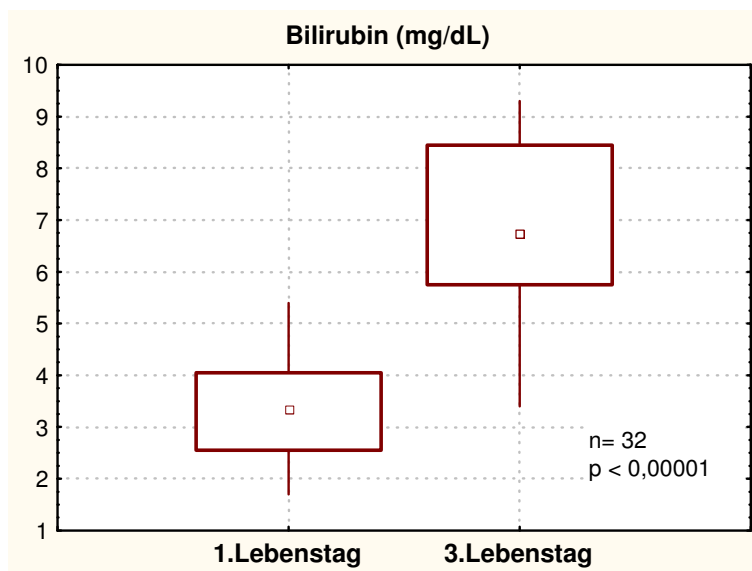


Abbildung 3.5: Bilirubin (mg/dL) im Vergleich 1. zu 3. Lebenstag im ersten Kollektiv.

Das Coeruloplasmin stieg im Vergleich erster zu drittem Lebenstag an, ebenso das Cholesterin.

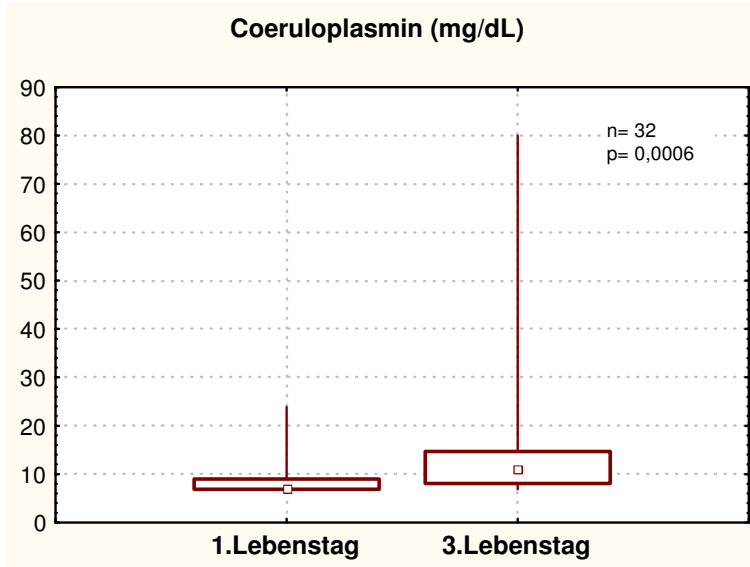


Abbildung 3.6: Coeruloplasmin (mg/dL) im Vergleich 1. zu 3. Lebenstag im ersten Kollektiv.

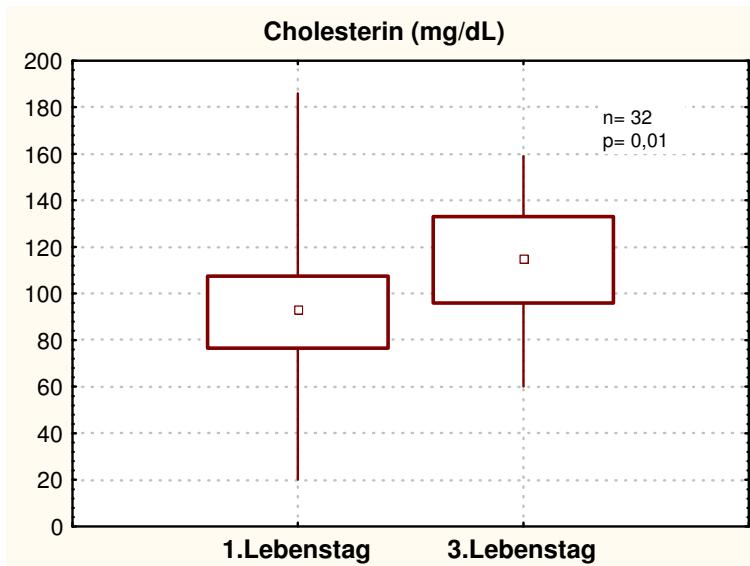


Abbildung 3.7: Cholesterin (mg/dL) im Vergleich 1. zu 3. Lebenstag im ersten Kollektiv.

Vitamin E, unterschieden in alpha- und gamma-Tocopherol zeigte im Vergleich erster zu drittem Lebenstag einen signifikanten Anstieg.

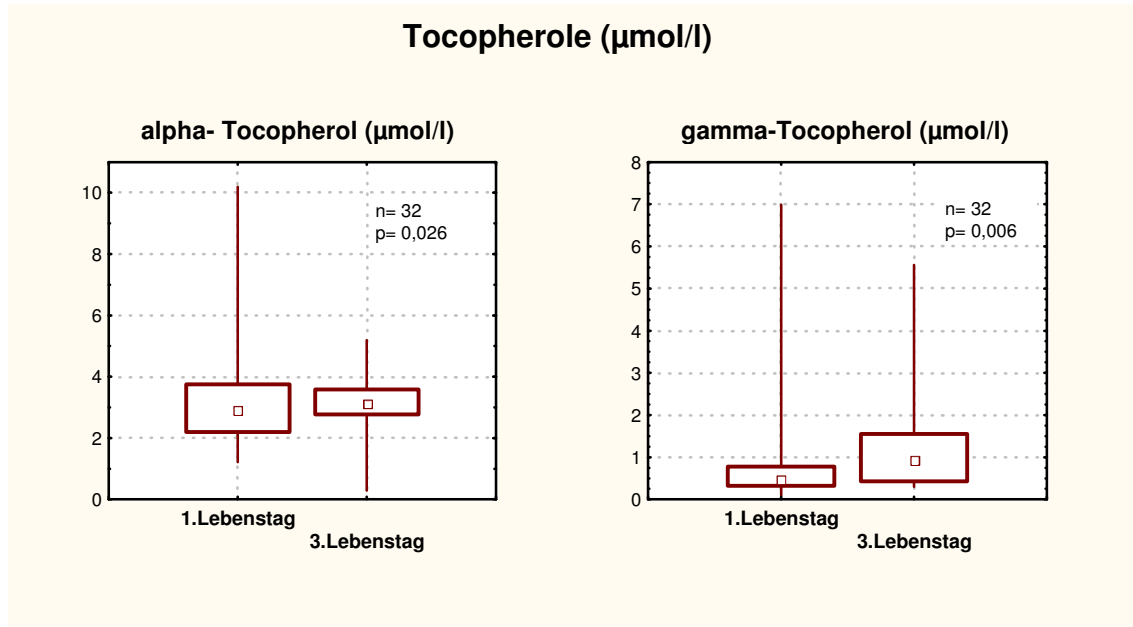


Abbildung 3.8: Alpha- und gamma-Tocopherol im Vergleich 1. und 3. Lebenstag im ersten Kollektiv.

Bei der quantitativen Bestimmung des Coenzym Q10 gab es keine signifikante Differenz zwischen dem ersten und dritten Lebenstag innerhalb des ersten Kollektivs, ebenso bei der qualitativen Differenzierung zwischen der oxidierten und reduzierten Form.

3.1.3 Graphische Darstellung der Scores SNAP und NTISS in signifikanter Korrelation zu den ermittelten pro-/antioxidativen Parametern im ersten Kollektiv

Es zeigt sich bei der Betrachtung der gemessenen antioxidativen Parameter eine negative Korrelation zu den klinischen Scores SNAP und NTISS am ersten und dritten Lebenstag.

Mit steigendem Bilirubinspiegel kam es zu einem signifikanten Abfall des NTISS-Scores am 1. und 3. Lebenstag. Das Gleiche gilt für den SNAP-Score am 1. Lebenstag, der 3. Lebenstag zeigte keine rechnerische Relevanz.

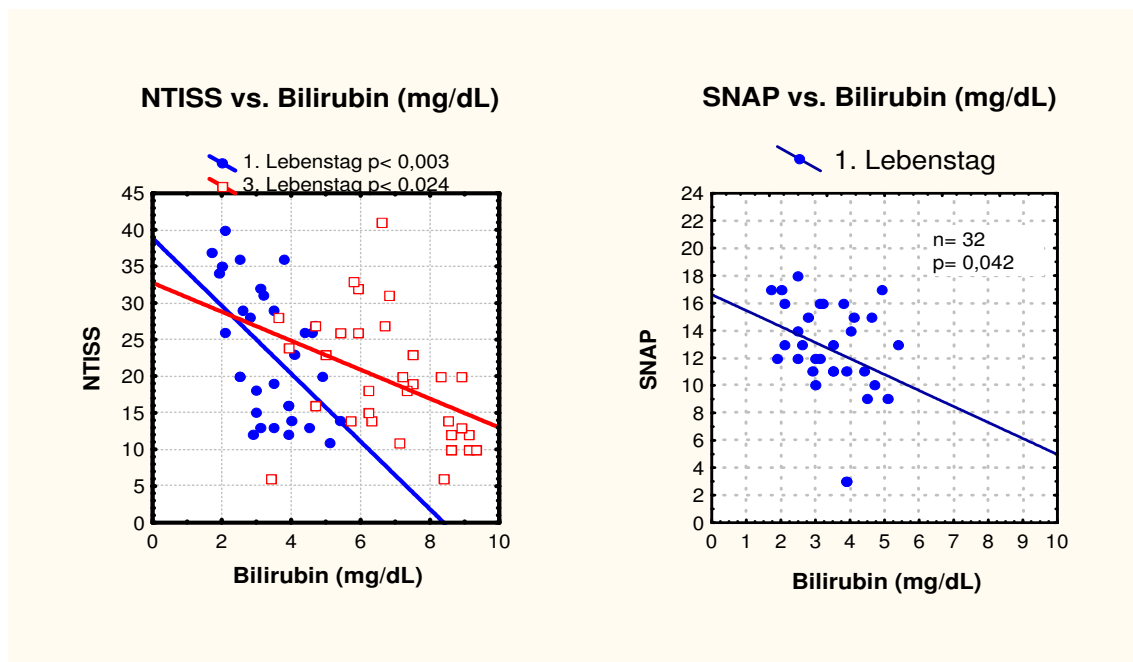


Abbildung 3.9: Signifikanter Abfall von NTISS und SNAP mit steigendem Bilirubinspiegel am 1. Lebenstag, sowie von NTISS am 3. Lebenstag im ersten Kollektiv.

Mit steigendem Hämatokrit kommt es am 1. und 3. Lebenstag zu einem signifikanten Abfall des NTISS-Scores. Der SNAP-Score zeigt hier keine rechnerische Relevanz.

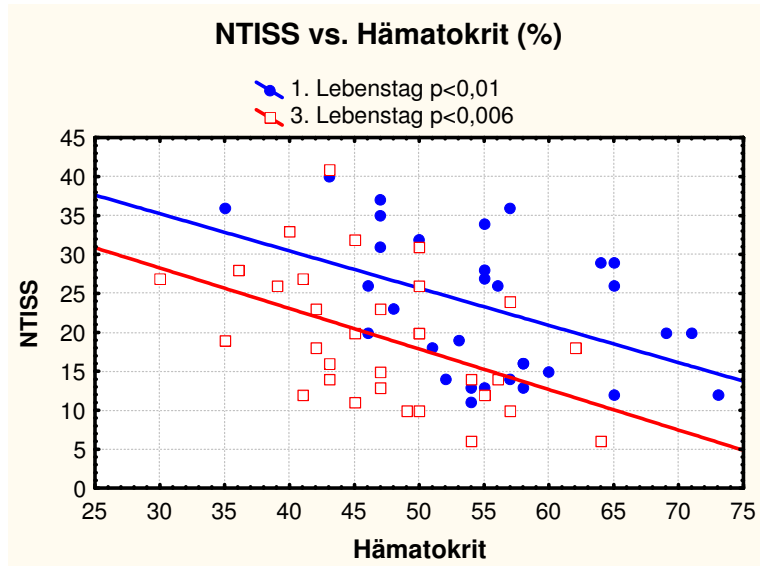


Abbildung 3.10: Abfall des NTISS mit steigendem Hämatokrit (%) am 1. und 3. Lebenstag im ersten Kollektiv.

Am ersten Lebenstag boten die Patienten mit einem höheren Cholesterinspiegel einen signifikant niedrigeren SNAP-Score, als die Patienten mit niedrigem Cholesterinspiegel. Der 3. Lebenstag blieb hier ohne rechnerische Relevanz.

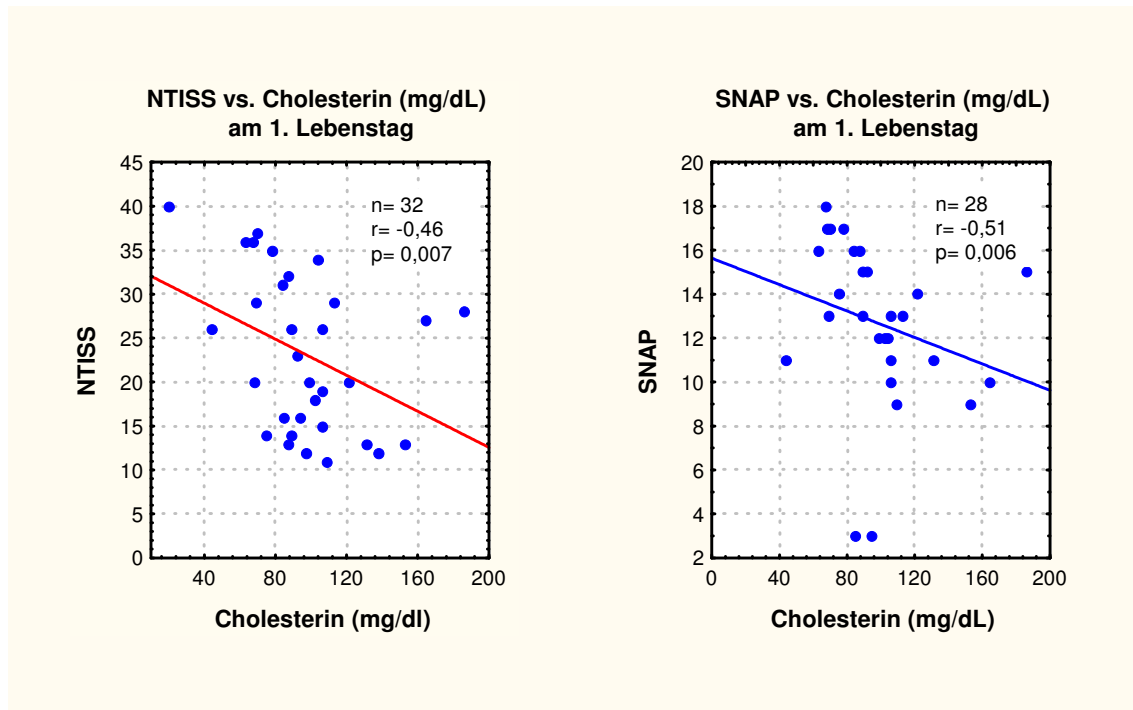


Abbildung 3.11: Signifikanter Abfall des SNAP- und NTISS-Scores mit steigendem Cholesterinspiegel am 1. Lebenstag im ersten Kollektiv.

Bei Betrachtung des Coenzym 10 bot sich am 3. Lebenstag ein abfallender NTISS-Score mit steigendem Coenzym Q10-Spiegel, sowohl des gesamt detektierten Coenzym Q10, als auch in der Berechnung auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin. Der erste Lebenstag blieb ohne rechnerische Relevanz.

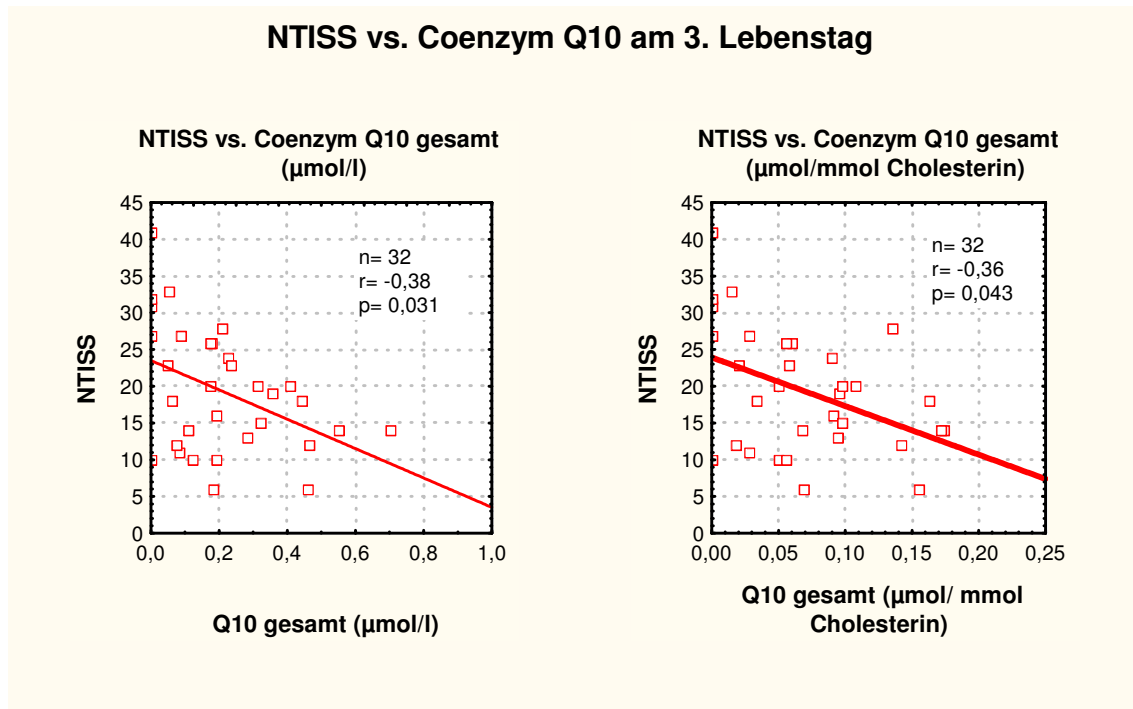


Abbildung 3.12: Signifikanter Abfall des NTISS-Scores mit steigenden Coenzym Q10-Werten am 3. Lebenstag im ersten Kollektiv.

Des Weiteren bot sich am ersten Lebenstag ein signifikanter Abfall SNAP-Scores bei steigenden Coenzym Q10-Werten. Hier blieb der 3. Lebenstag ohne rechnerische Relevanz.

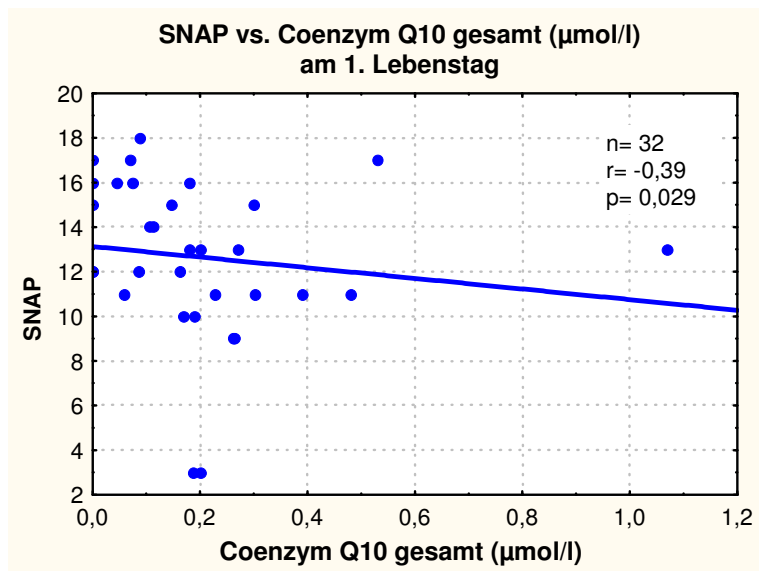


Abbildung 3.13: Signifikanter Abfall des SNAP-Scores bei steigenden Coenzym Q10-Werten am 1. Lebenstag in der Gruppe 1.-3. Lebenstag.

Bei Betrachtung des reduzierten Coenzym Q10-Anteils zeigte sich ein Abfall des SNAP und NTISS-Scores am ersten Lebenstag mit steigendem Coenzym Q10-Level. Dies gilt für den gesamten Anteil Coenzym Q10, sowie in der Berechnung auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin.

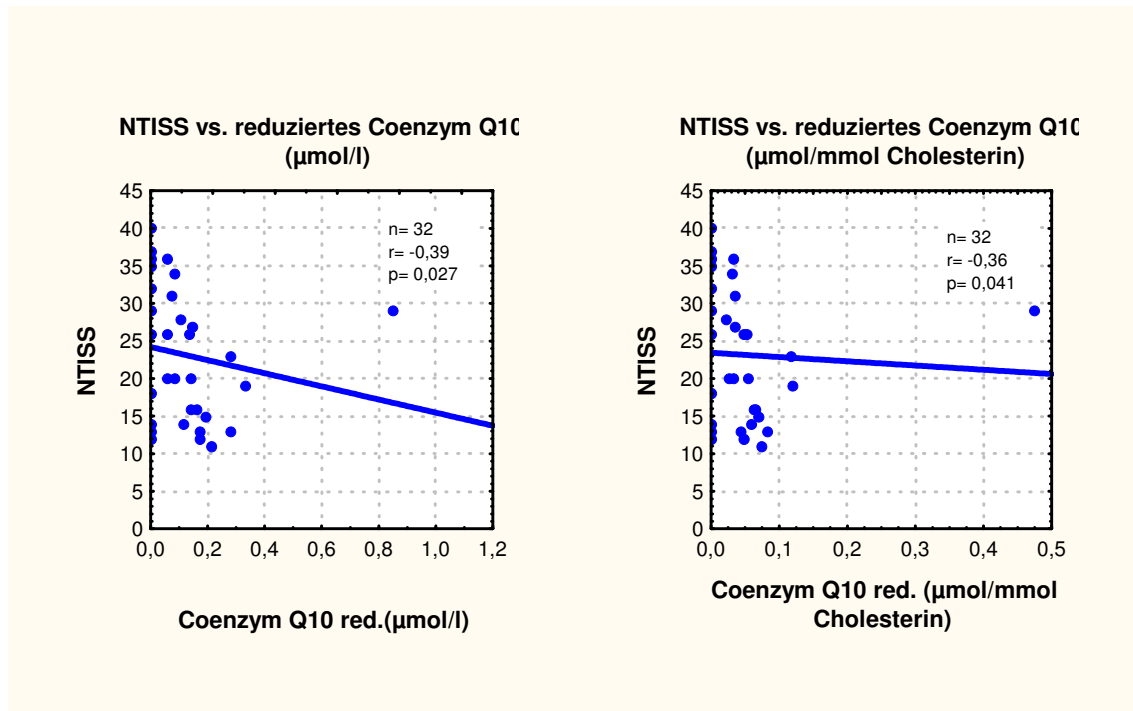


Abbildung 3.14: Signifikanter Abfall von NTISS am 1. Lebenstag bei steigendem reduziertem Anteil Coenzym Q10 gesamt, sowie bezogen auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin im ersten Kollektiv.

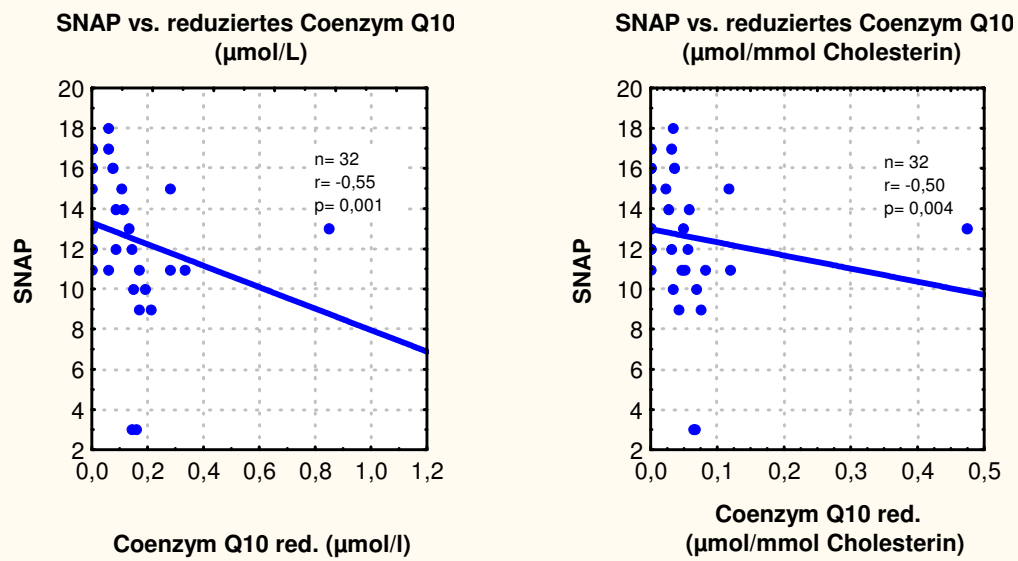


Abbildung 3.15: Signifikanter Abfall von SNAP am 1. Lebenstag bei steigendem reduziertem Anteil Coenzym Q10 gesamt, sowie bezogen auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin im ersten Kollektiv.

Am 3. Lebenstag zeigte sich bei Betrachtung des reduzierten Anteil Coenzym Q10, prozentual gesehen, ein signifikanter Abfall des SNAP mit steigender Prozentzahl. Der 1. Lebenstag blieb rechnerisch ohne Relevanz.

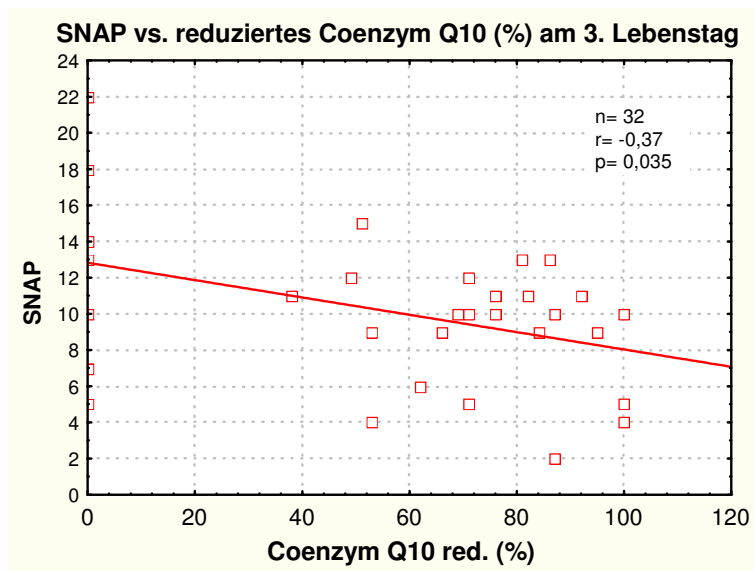


Abbildung 3.16: Signifikanter Abfall von SNAP am 3. Lebenstag mit steigendem reduziertem Anteil Coenzym Q10 (%) im ersten Kollektiv.

Am ersten Lebenstag boten die Patienten mit einem höheren Spiegel an alpha-Tocopherol einen signifikant niedrigeren SNAP-Score. Hier blieb der 3. Lebenstag rechnerisch irrelevant.

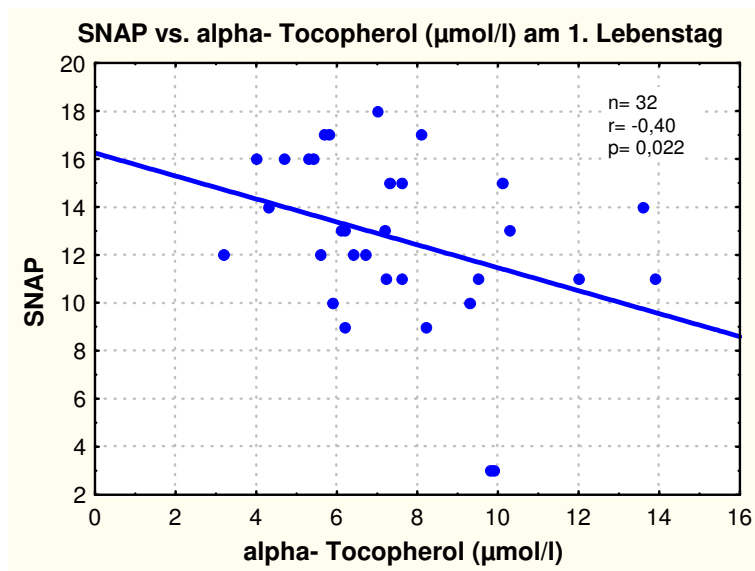


Abbildung 3.17: Abfallender SNAP-Score mit steigendem alpha-Tocopherol-Spiegel am 1. Lebenstag im ersten Kollektiv.

3.1.4 Zusammenhang der klinischen Scores NTISS und SNAP mit Geburtsgewicht und Gestationsalter im zweiten Kollektiv

Beim NTISS-Score konnten wir wie bereits zuvor im ersten Kollektiv (1.-3. Lebenstag) an allen untersuchten Tagen einen signifikanten Abfall bei zunehmender Reife, sowie bei steigendem Geburtsgewicht der Patienten beobachten.

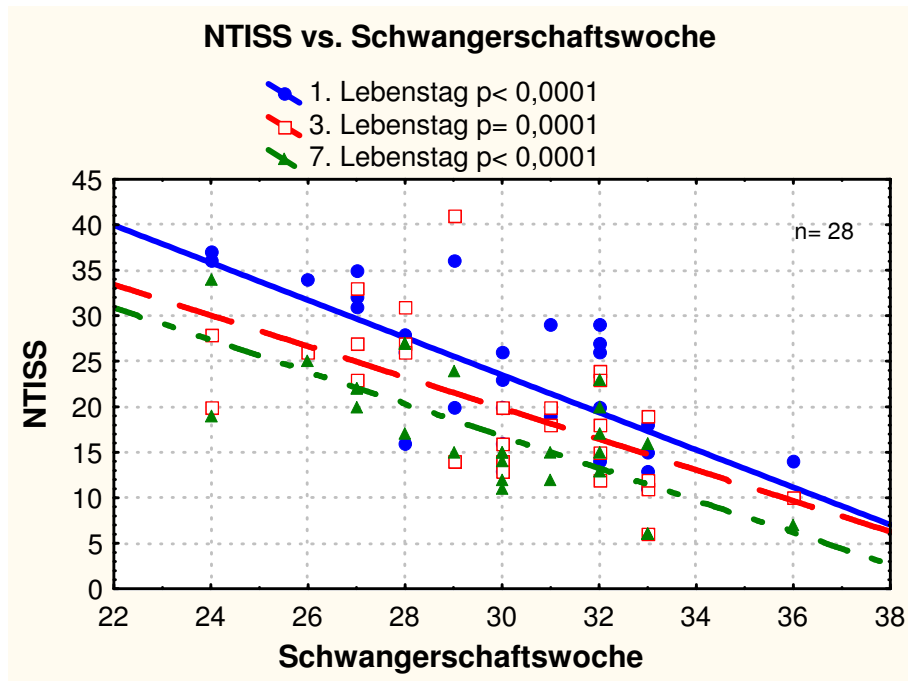


Abbildung 3.18: NTISS-Score und Schwangerschaftswoche am 1., 3. und 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.

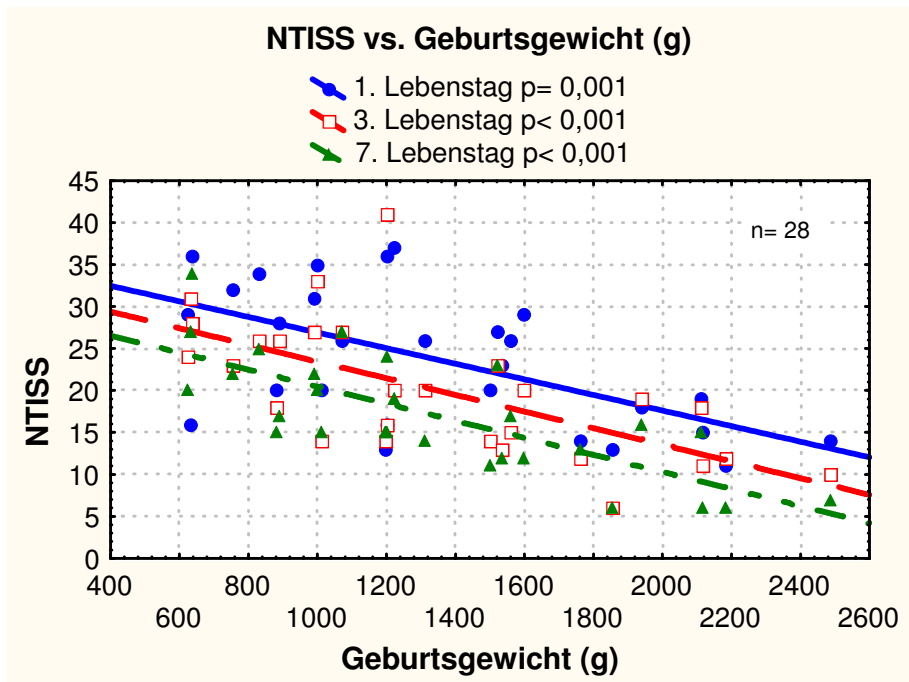


Abbildung 3.19: NTISS-Score und Geburtsgewicht am 1., 3. und 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.

Des Weiteren kam es am 3. und 7. Lebenstag zu einem signifikanten Abfall des SNAP-Scores mit steigendem Gestationsalter sowie einen signifikanten Abfall mit steigendem Geburtsgewicht am 7. Lebenstag.

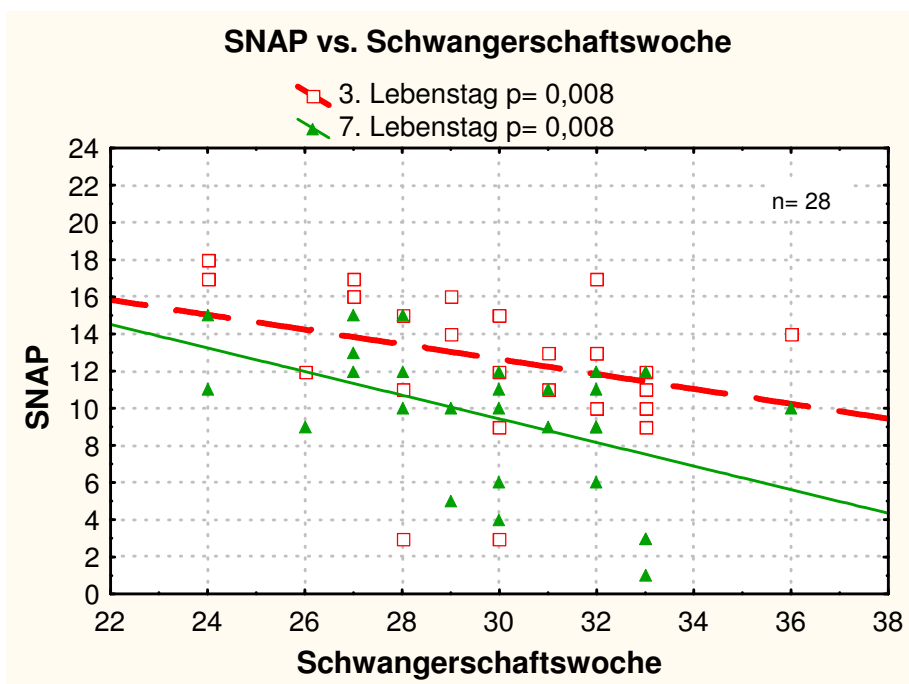


Abbildung 3.20: SNAP-Score und Schwangerschaftswoche am 3. und 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.

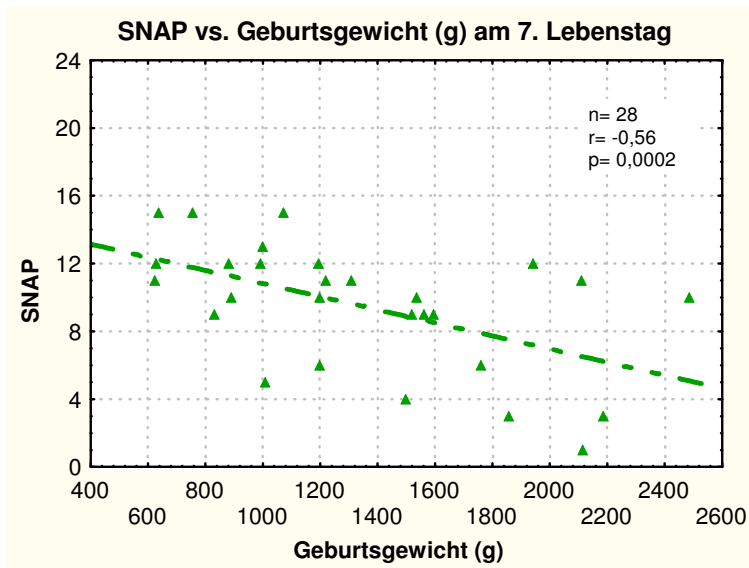


Abbildung 3.21: SNAP-Score und Geburtsgewicht am 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.

3.1.5 Darstellung der pro-/ antioxidativen Parameter im Verlauf im zweiten Kollektiv

Der Hämatokrit zeigte an allen 3 untersuchten Lebenstagen einen signifikanten Abfall.

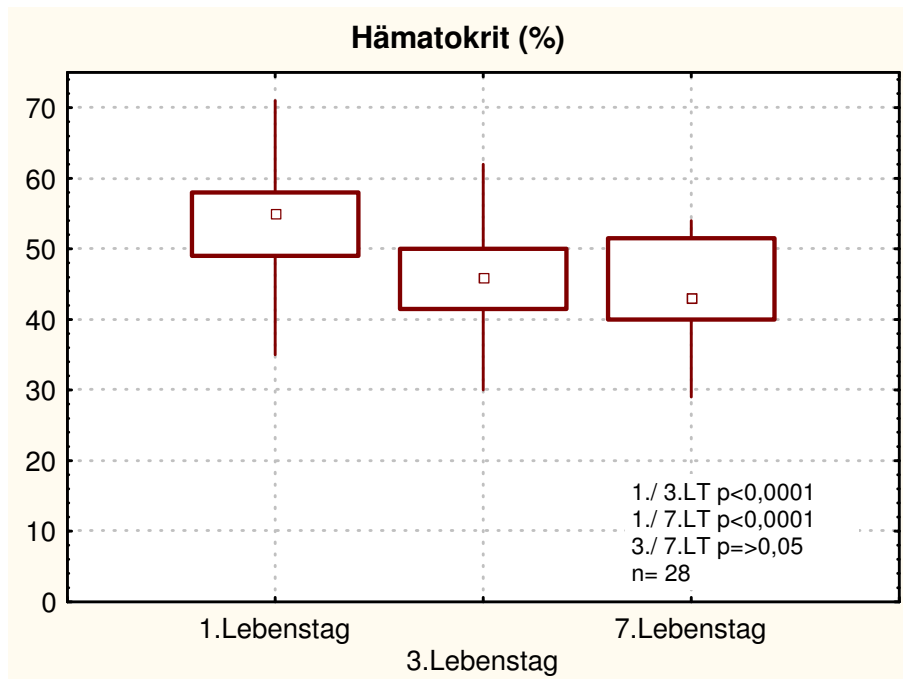


Abbildung 3.22: Hämatokrit (%) am 1., 3. und 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.

Der Bilirubinwert (mg/dL) stieg am 3. und 7. Lebenstag im Vergleich zum 1. Lebenstag signifikant an. Der 3. Lebenstag bot keinen signifikanten Unterschied zum 7. Lebenstag.

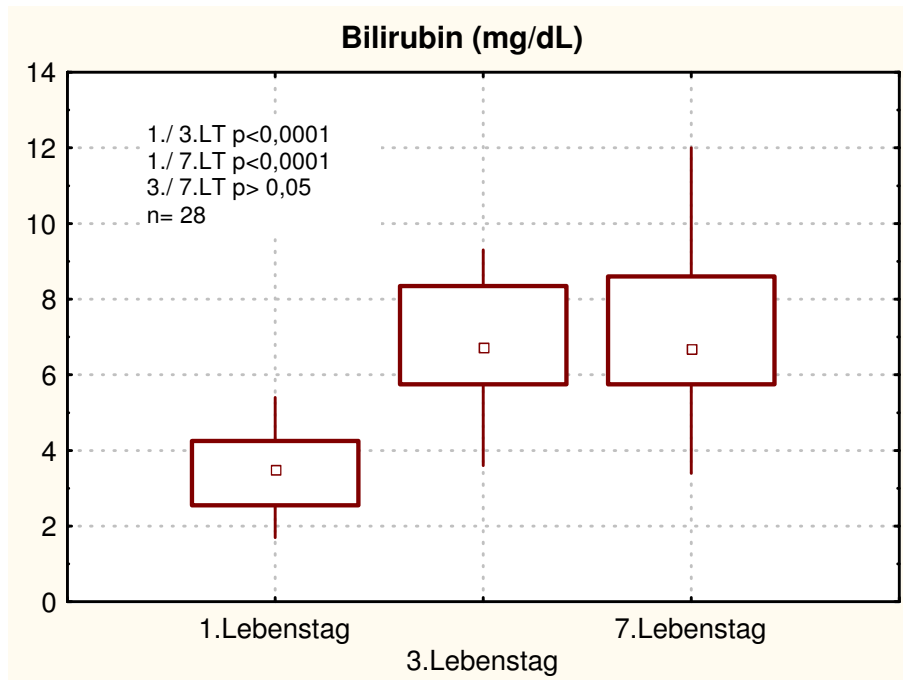


Abbildung 3.23: Bilirubin am 1., 3. und 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.

Die Radikalresistenz der Erythrozyten im ABAP-Hämolysetest nahm am 7. Lebenstag im Vergleich zum 1. und 3. Lebenstag signifikant zu. Der 3. Lebenstag bot keinen rechnerisch signifikanten Unterschied zum 1. Lebenstag.

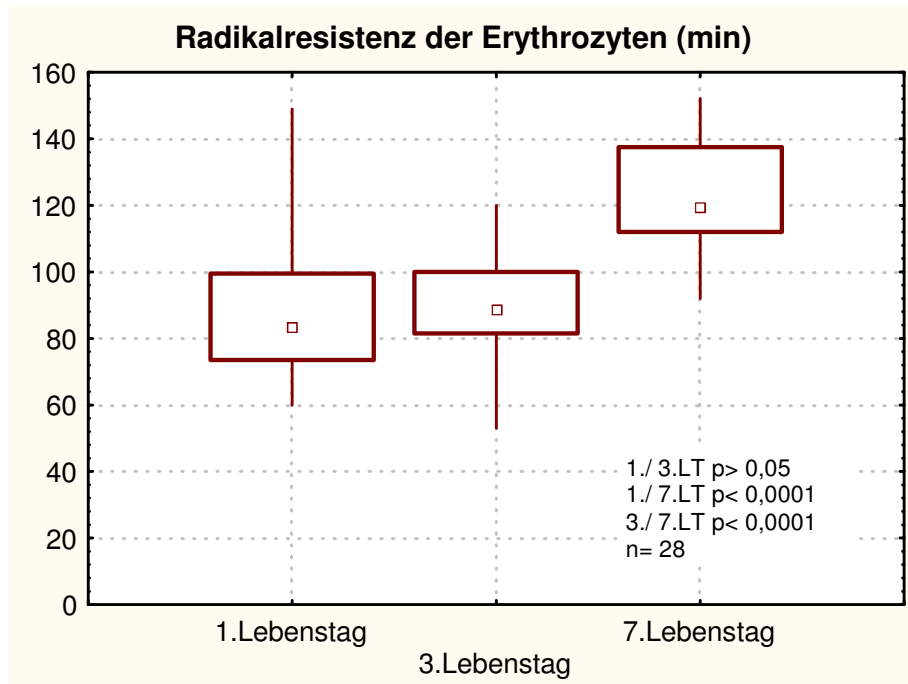


Abbildung 3.24: Radikalresistenz der Erythrozyten am 1., 3. und 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.

Das akute-Phase-Protein Coeruloplasmin (mg/dl) bot am 3. und 7. Lebenstag einen rechnerisch signifikanten Anstieg im Vergleich zum ersten Lebenstag. Der Vergleich 3. zum 7. Lebenstag blieb rechnerisch irrelevant.

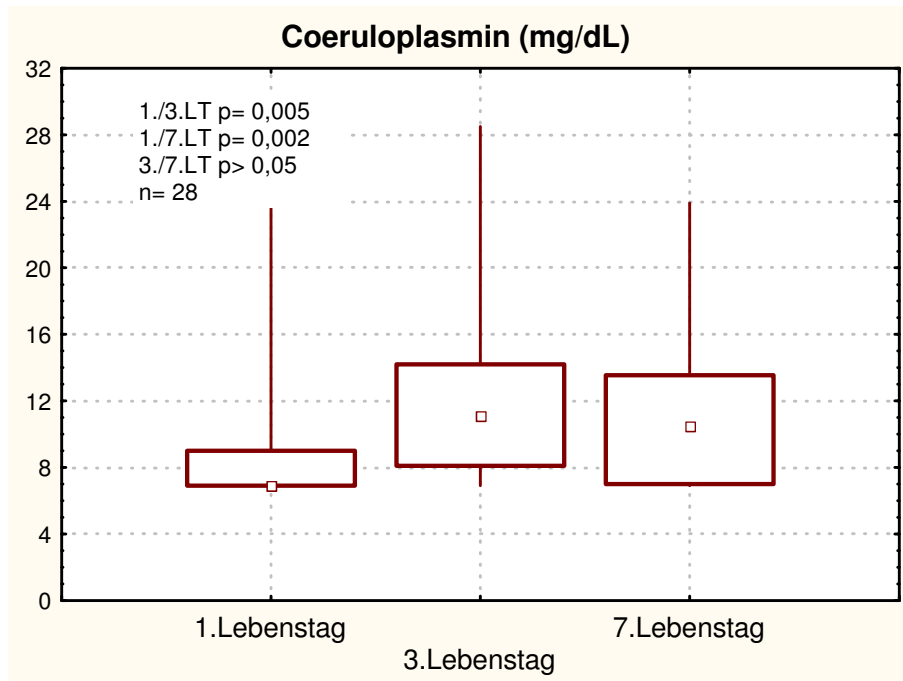


Abbildung 3.25: Coeruloplasmin am 1., 3. und 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.

Die Cholesterinwerte stiegen mit zunehmendem Alter der Patienten signifikant an.

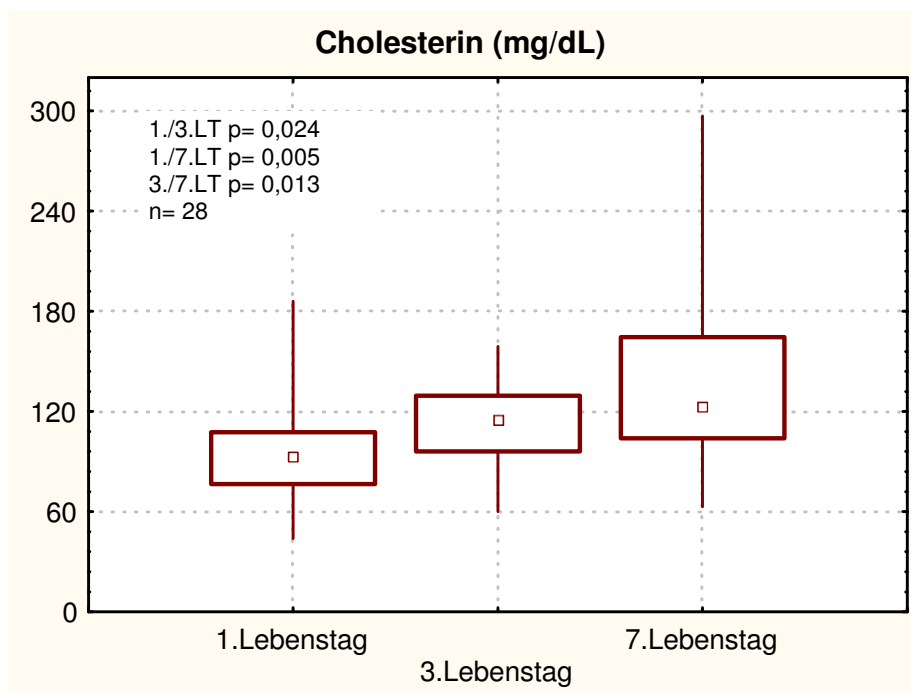


Abbildung 3.26: Cholesterinspiegel am 1., 3. und 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.

Bei Betrachtung des alpha-Tocopherols in der Gesamtmenge ($\mu\text{mol/l}$) zeigte sich ein signifikanter Anstieg an allen untersuchten Lebenstagen. Bezogen auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin ($\mu\text{mol/mmol Cholesterin}$) bot der 7. Lebenstag signifikant höhere Spiegel im Vergleich zum 1. und 3. Lebenstag. Der Vergleich erster zu 3. Lebenstag war rechnerisch nicht relevant.

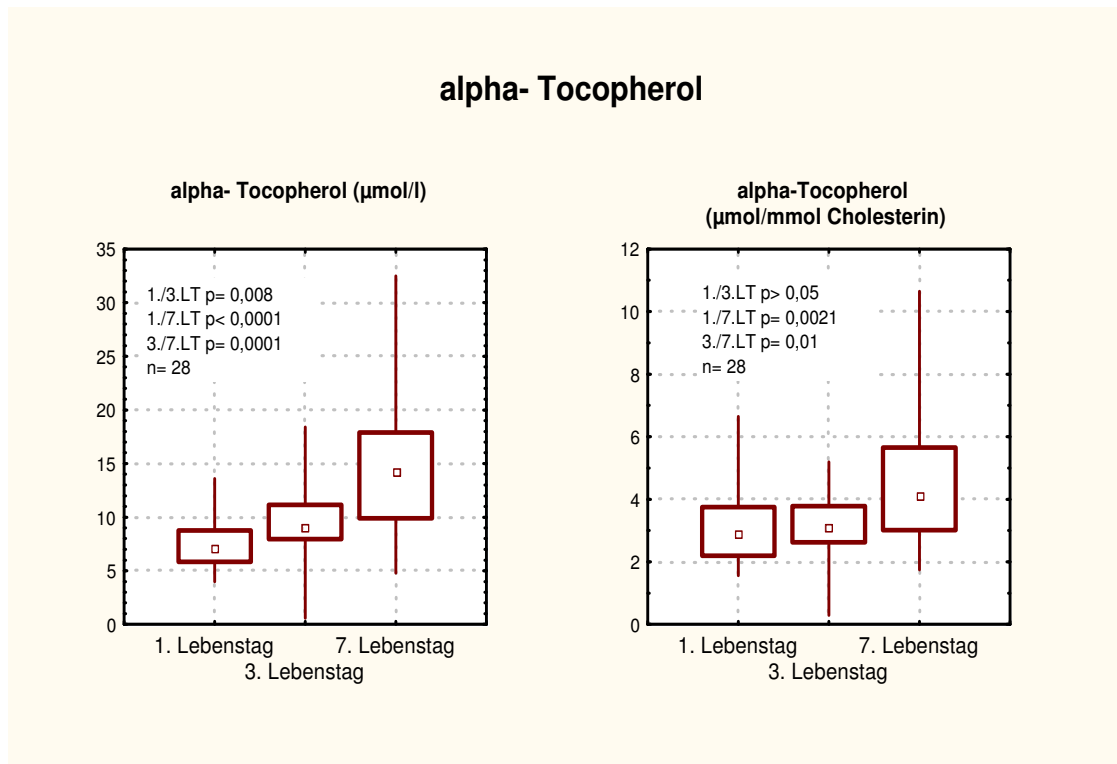


Abbildung 3.27: alpha-Tocopherolspiegel als Gesamtmenge und berechnet auf die entsprechende Cholesterinmenge am 1., 3. und 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.

Die gleichen Ergebnisse bot das gamma-Tocopherol: Die Betrachtung der Gesamtmenge zeigte einen signifikanten Anstieg an allen 3 untersuchten Lebenstagen, sowie bezogen auf das Cholesterin einen signifikanten Anstieg am 7. Lebenstag im Vergleich zum 1. und 3. Lebenstag, wogegen der erste und 3. Lebenstag im Gruppenvergleich rechnerisch keinen Unterschied ergab.

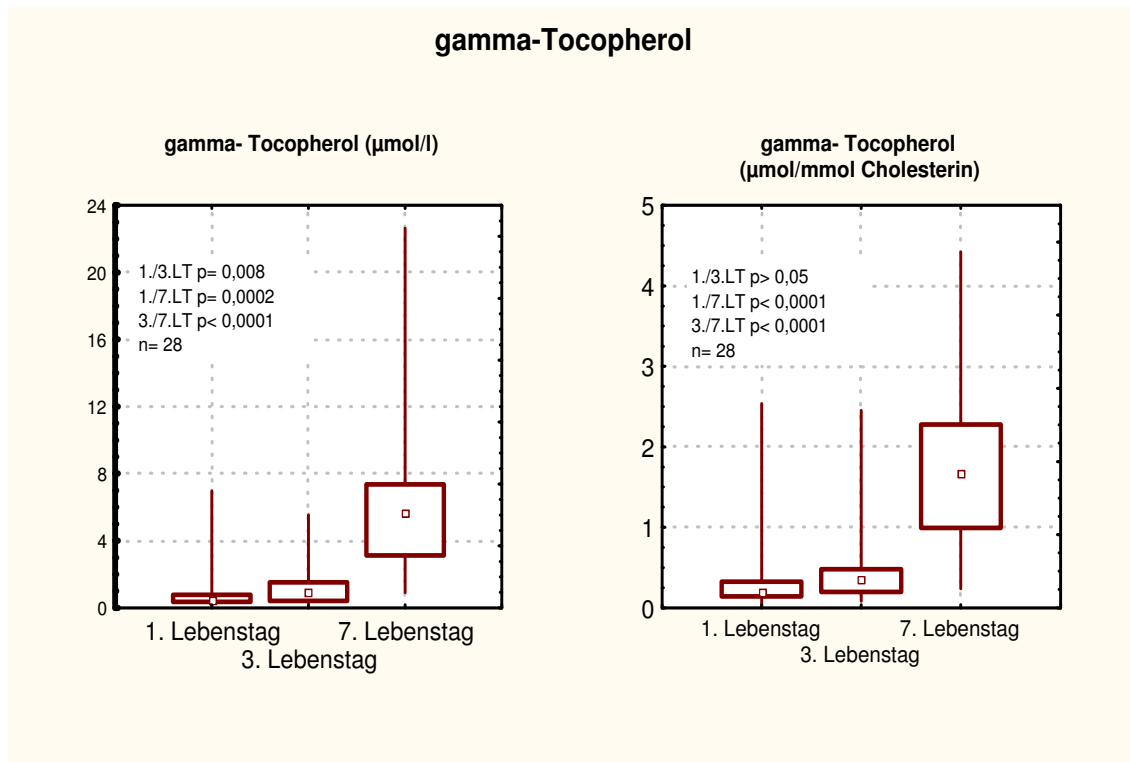


Abbildung 3.28: gamma-Tocopherol in der Gesamtmenge, sowie bezogen auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin am 1., 3. und 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.

Das Coenzym Q10 zeigte in der Gesamtmenge, sowie in der Berechnung auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin einen signifikanten Anstieg vom 1. zum 7. Lebenstag, sowie vom 3. zum 7. Lebenstag.

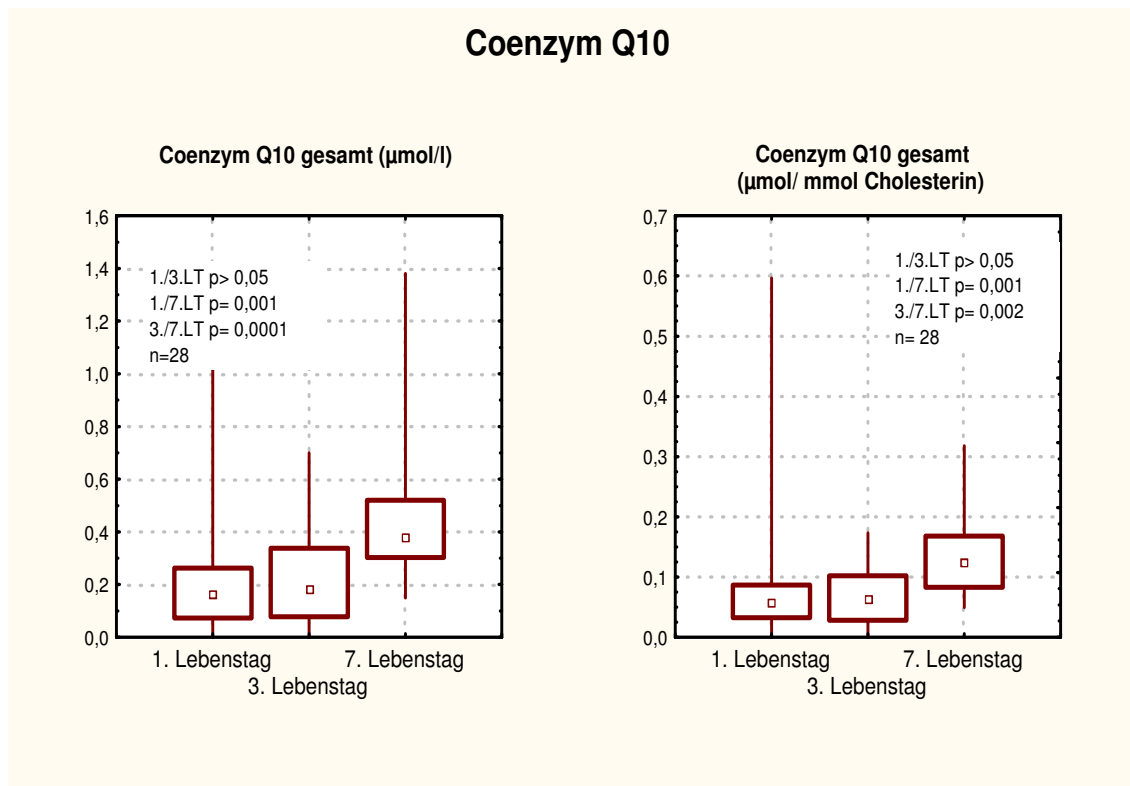


Abbildung 3.29: Coenzym Q10-Levels bezogen auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin am 1., 3. und 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.

Entsprechendes gilt für die Betrachtung des reduzierten Coenzym Q10-Anteils.

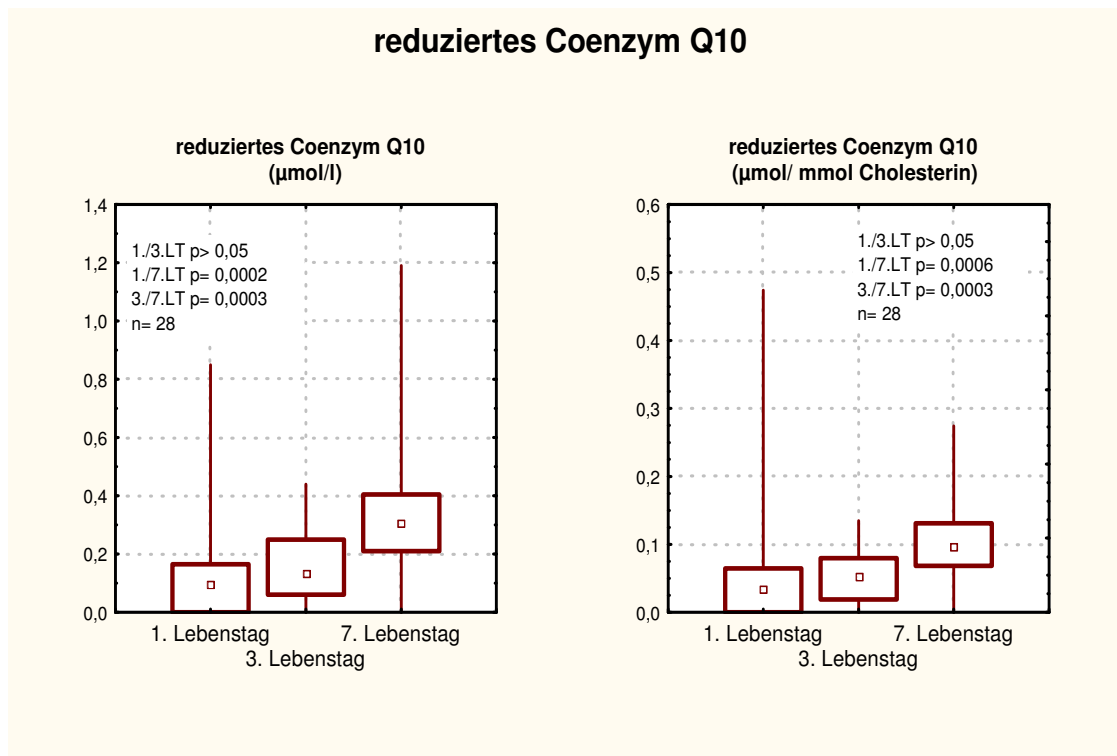


Abbildung 3.30: Reduzierter Anteil der Coenzym Q10-Levels bezogen auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin am 1., 3. und 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.

Der oxidierte Anteil des Coenzym Q10 ergab im Verlauf keine signifikante Korrelation.

3.1.6 Graphische Darstellung der Scores SNAP und NTISS in signifikanter Korrelation zu den pro-/ antioxidativen Parametern im zweiten Kollektiv

An allen drei untersuchten Lebenstagen zeigte sich ein abfallender NTISS-Score bei steigendem Bilirubinspiegel in der untersuchten Gruppe.

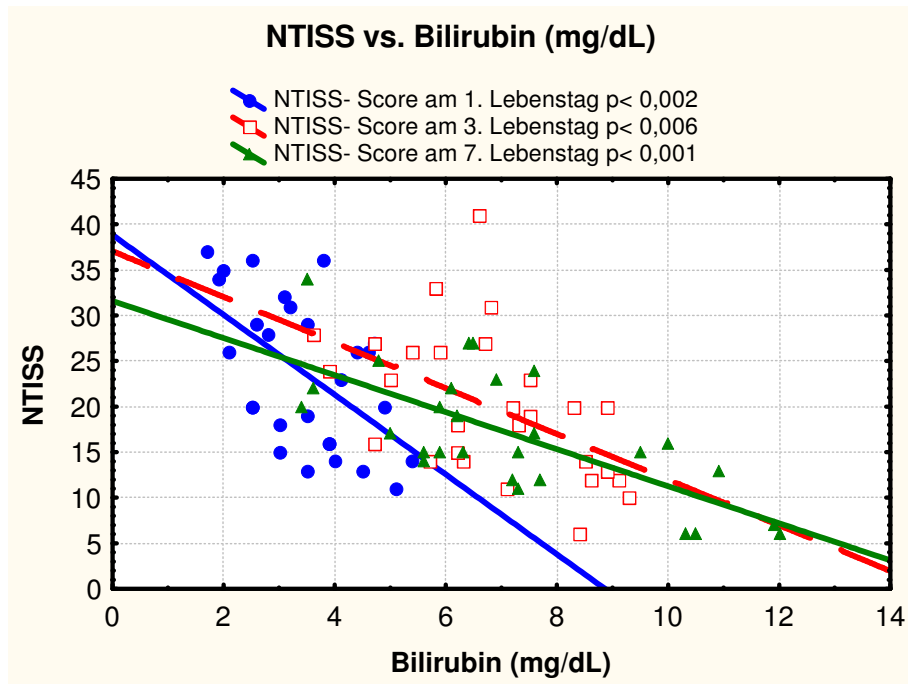


Abbildung 3.31: NTISS-Score und Bilirubinspiegel im zweiten Kollektiv.

Bei Betrachtung des Hämatokrits (%), bot sich am 7. Lebenstag ein signifikanter Abfall des NTISS-Score bei steigendem Hämatokrit. Der erste und 3. Lebenstag zeigte keinen rechnerisch relevanten Zusammenhang.

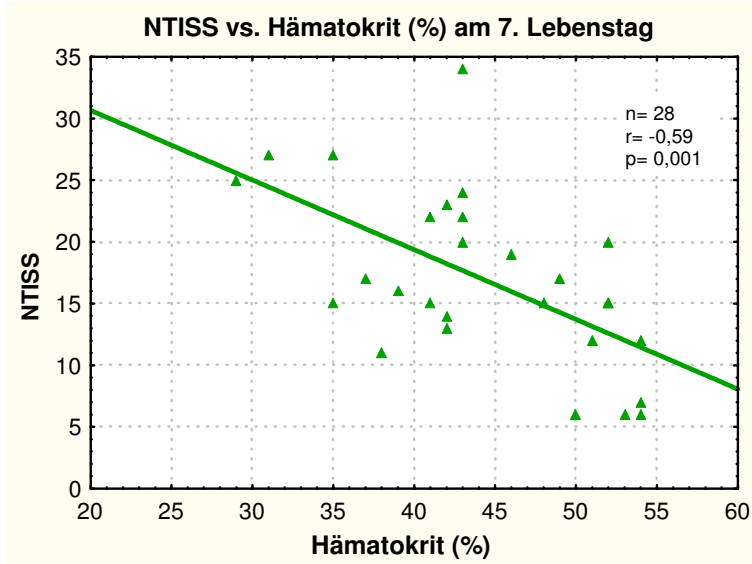


Abbildung 3.32: NTISS-Score und Hämatokrit (%) am 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.

Bezüglich des Cholesterins (mg/dL) zeigte sich ein abfallenden SNAP-Score mit steigendem Cholesterinspiegel am ersten Lebenstag. Der 3. und 7. Lebenstag blieben ohne rechnerische Relevanz.

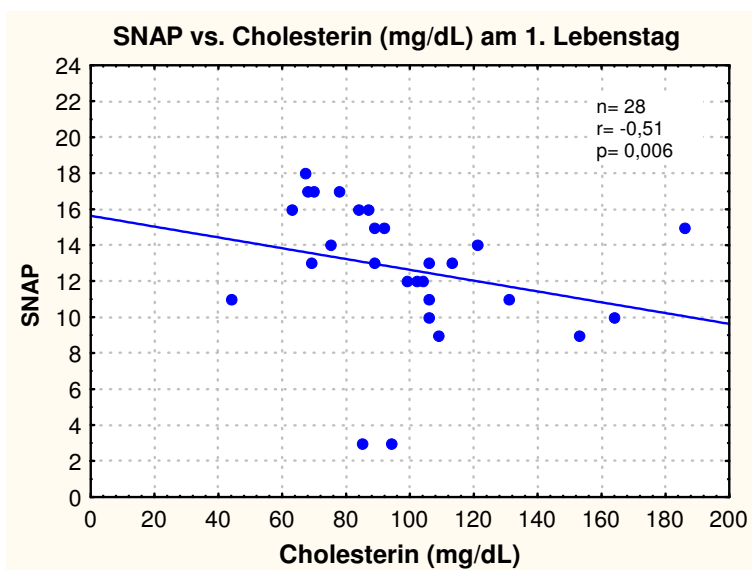


Abbildung 3.33: SNAP-Score und Cholesterin (mg/dL) am 1. Lebenstag im zweiten Kollektiv.

Mit steigenden Coenzym Q10-Werten zeigte sich am 3. und 7. Lebenstag ein abfallender NTISS-Score. Der erste Lebenstag blieb ohne rechnerische Relevanz.

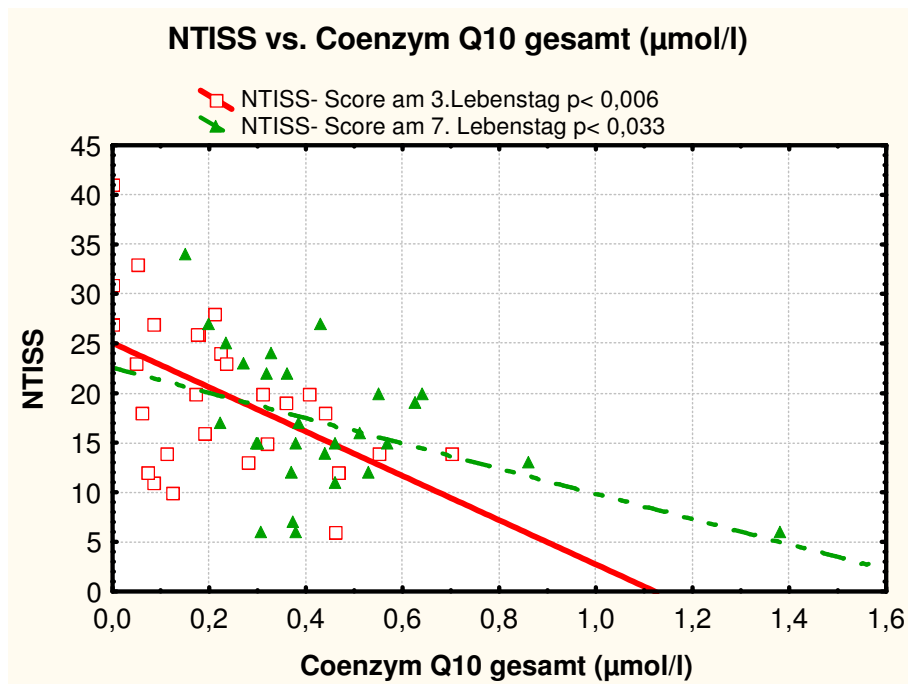


Abbildung 3.34: NTISS-Score und Coenzym Q10-Level am 3. und 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.

Ebenfalls bot sich ein abfallender SNAP-Score mit steigendem Coenzym Q10-Spiegel am ersten Lebenstag. Hier blieben der 3. und der 7. Lebenstag ohne rechnerische Relevanz.

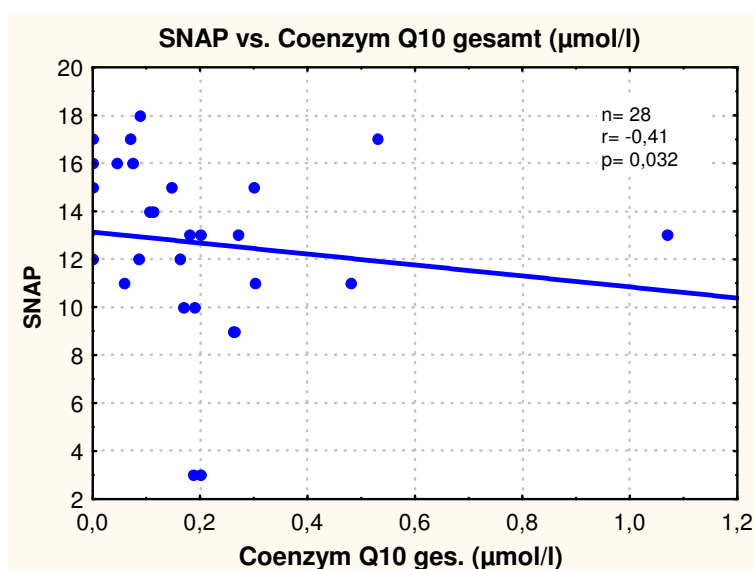


Abbildung 3.35: SNAP-Score und Coenzym Q10 gesamt (µmol/l) am 1. Lebenstag im zweiten Kollektiv.

Einen fallenden NTISS-Score mit steigendem CoenzymQ10-Spiegel am 3. und 7. Lebenstag ergab die Berechnung auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin.

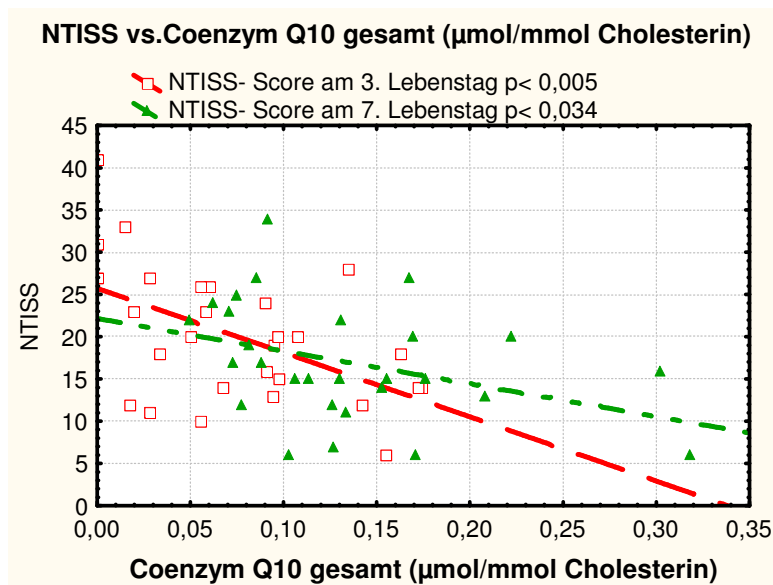


Abbildung 3.36: NTISS-Score und Coenzym Q10 bezogen auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Cholesterin) am 3. und 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.

Mit steigendem Anteil reduzierten Coenzym Q10 beobachteten wir am ersten und 3. Lebenstag einen signifikanten Abfall des NTISS-Scores.

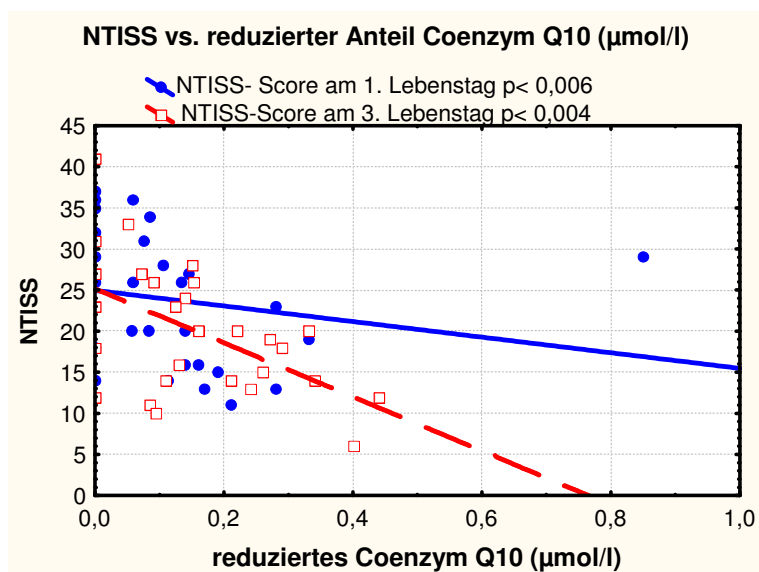


Abbildung 3.37: NTISS-Score und reduzierter Anteil des Coenzym Q10 am 1. und 3. Lebenstag im zweiten Kollektiv.

Der SNAP-Score zeigte am ersten Lebenstag einen signifikanten Abfall mit steigendem Anteil des reduzierten Coenzym Q10 in der Gesamtmenge ($\mu\text{mol/l}$), sowie berechnet auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin ($\mu\text{mol/mmol Cholesterin}$). Der 3. und 7. Lebenstag blieben ohne rechnerische Relevanz.

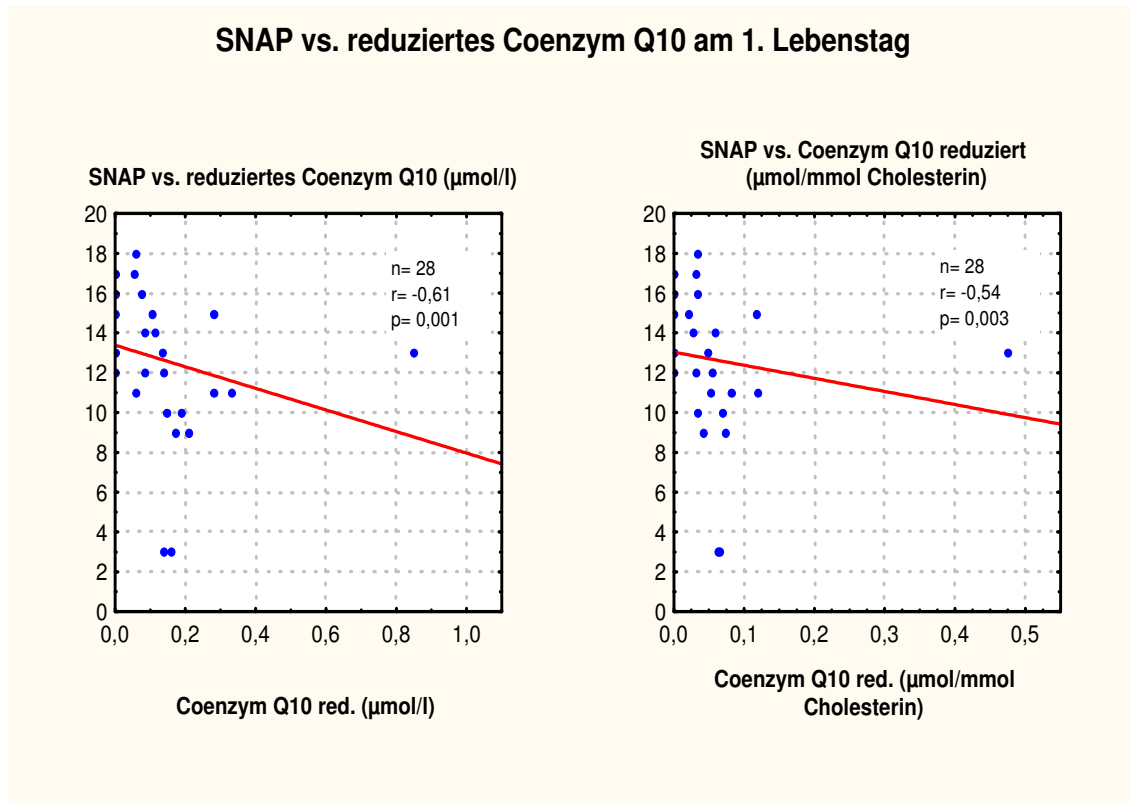


Abbildung 3.38: SNAP-Score und reduziertes Coenzym Q10 in der Gesamtmenge ($\mu\text{mol/l}$), sowie berechnet auf den Cholesterinspiegel ($\mu\text{mol/mmol Cholesterin}$) am 1. Lebenstag im zweiten Kollektiv.

Auch der NTISS-Score bot einen signifikanten Abfall bei steigendem Anteil des reduzierten Coenzym Q10 bezogen auf die lipophile Größe Cholesterin am ersten Lebenstag. Der 3. und 7. Lebenstag blieben ohne rechnerische Relevanz.

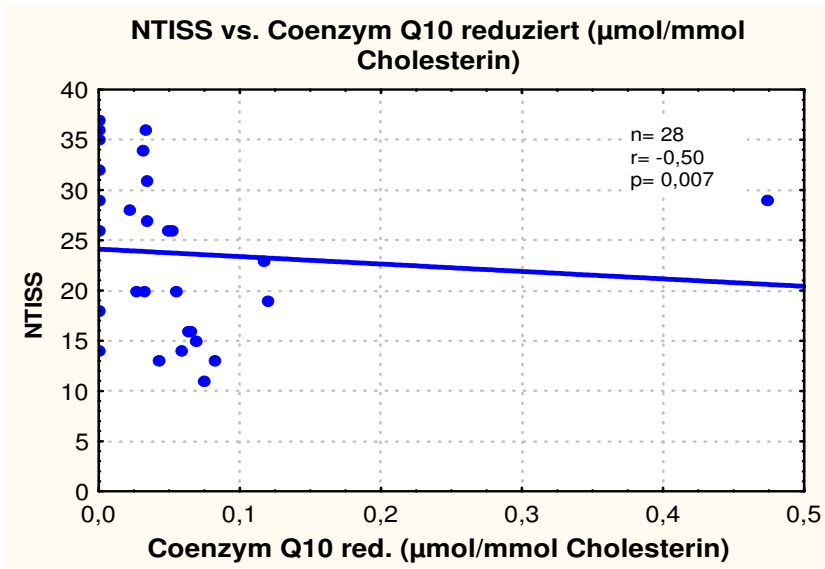


Abbildung 3.39: NTISS-Score und reduziertes Coenzym Q10-Level in bezug auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin (µmol/mmol Cholesterin) am 1. Lebenstag im zweiten Kollektiv.

Eine rechnerische Relevanz bot ein abfallender SNAP-Score hinsichtlich eines steigenden Anteils reduzierten Coenzym Q10 (%) gerechnet am 3. Lebenstag.

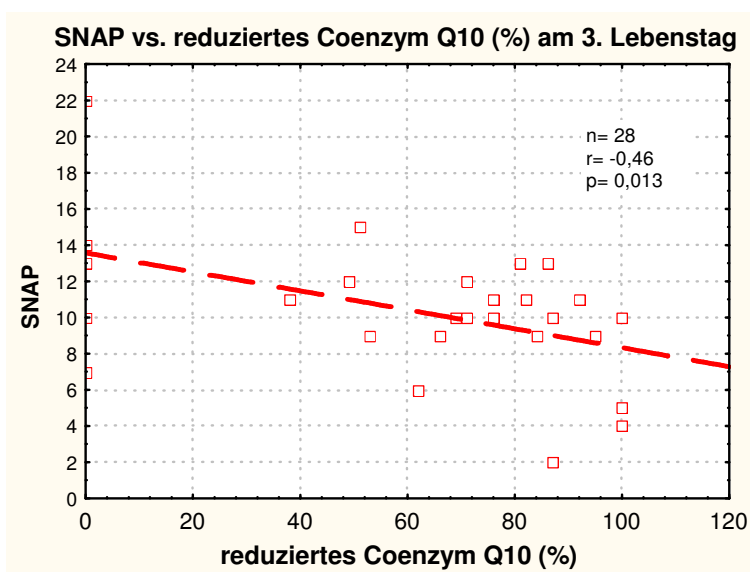


Abbildung 3.40: SNAP-Score und reduziertes Coenzym Q10 (%) am 3. Lebenstag im zweiten Kollektiv.

Einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem oxidierten Anteil des Coenzym Q10 in dieser Gruppe wies lediglich der NTISS-Score am 7. Lebenstag auf. Es zeigt mit steigendem oxidierten Anteil Coenzym Q10 bezogen auf die Bezugsgröße Cholesterin einen abfallenden NTISS-Score.

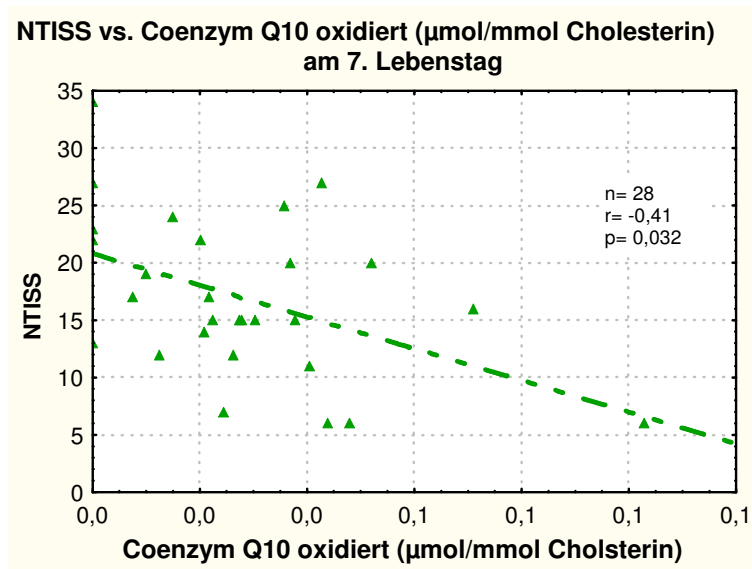


Abbildung 3.41: NTISS-Score und oxidierter Anteil des Coenzym Q10-Levels am 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.

Bei Betrachtung des alpha-Tocopherols zeigte sich am 7. Lebenstag ein signifikanter Abfall des SNAP- und des NTISS-Scores bei steigendem alpha-Tocopherolspiegel. Der erste und 3. Lebenstag blieben ohne rechnerische Relevanz.

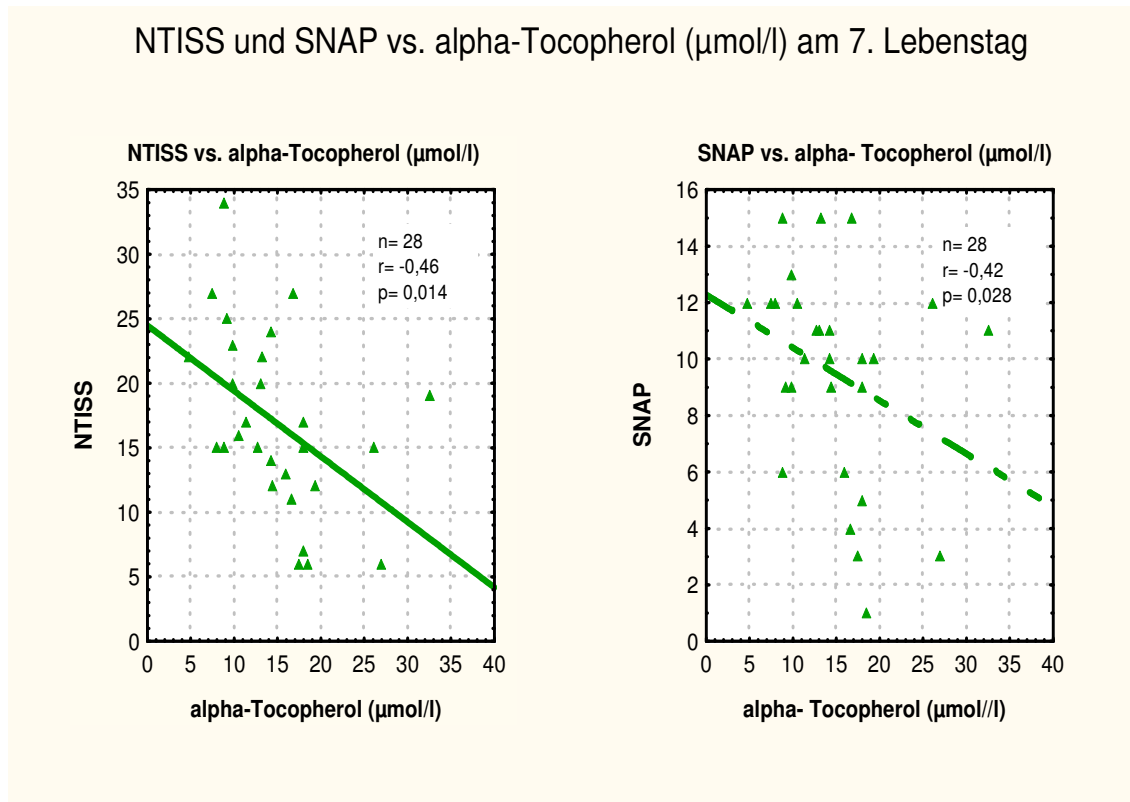


Abbildung 3.42: NTISS- und SNAP-Score und alpha-Tocopherol ($\mu\text{mol/l}$) am 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.

Des Weiteren zeigte sich eine Signifikanz bezüglich des NTISS-Scores und dem alpha-Tocopherol bezogen auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin am 7. Lebenstag. Der erste und 3. Lebenstag blieben auch hier ohne rechnerische Relevanz.

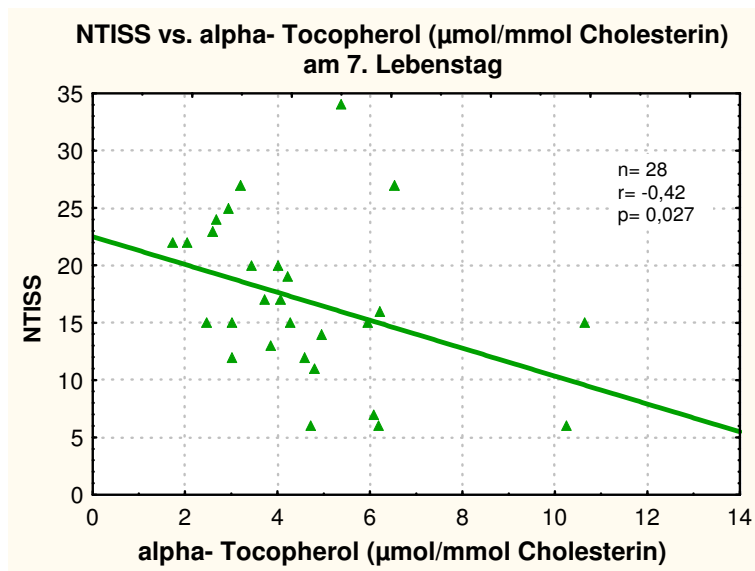


Abbildung 3.43: NTISS-Score und alpha-Tocopherol am 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.

Bei Betrachtung des gamma-Tocopherols bot sich am 7. Lebenstag ein signifikanter Anstieg des SNAP-Scores bei steigendem gamma-Tocopherolspiegel, bezogen auf Cholesterin ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Cholesterin), sowie im absoluten Wert ($\mu\text{mol}/\text{l}$). Der erste und 3. Lebenstag blieben ohne rechnerische Relevanz.

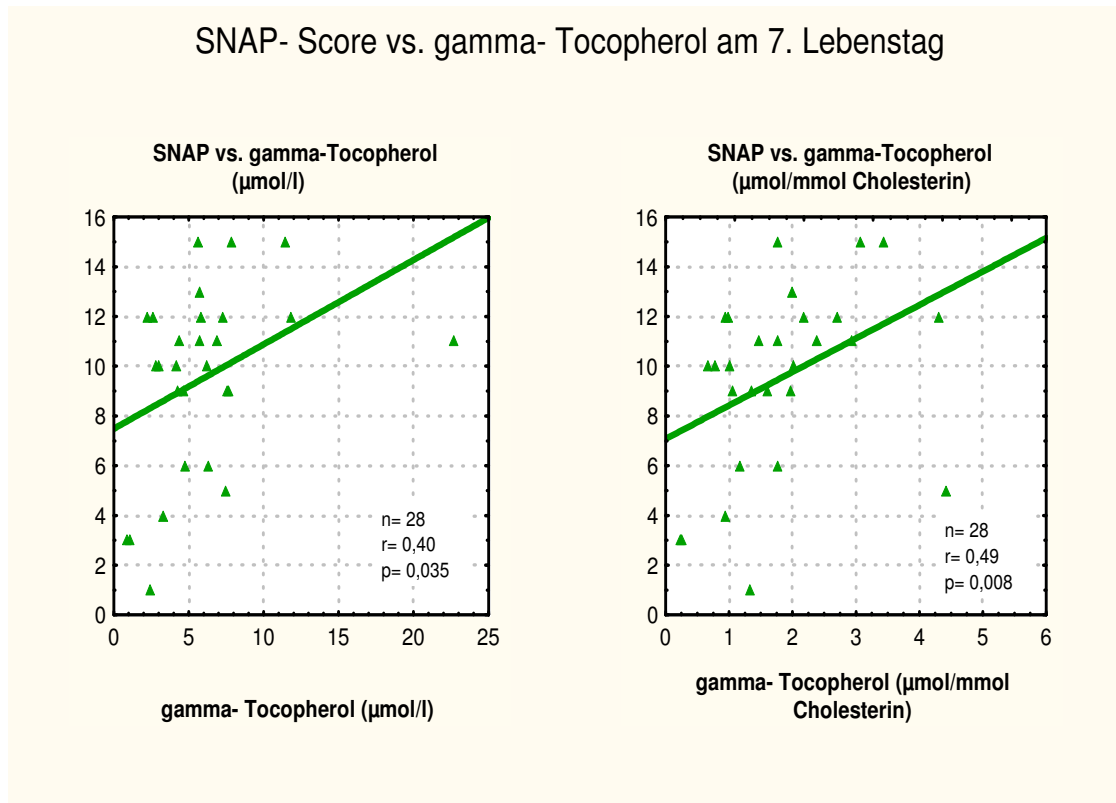


Abbildung 3.44: SNAP-Score und gamma-Tocopherol absolut ($\mu\text{mol}/\text{l}$) sowie bezogen auf den Cholesterinspiegel ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Cholesterin) am 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.

3.1.7 Zusammenhang der klinischen Scores NTISS und SNAP mit Geburtsgewicht und Gestationsalter im 3. Kollektiv

Im kleineren Kollektiv kam es an allen untersuchten Tagen zu einem abnehmenden NTISS-Score mit zunehmender Reife der Patienten.

Dies galt für den SNAP-Score nur am 7. und 14. Lebenstag, der erste und dritte Lebenstag blieb ohne rechnerische Signifikanz.

Der NTISS-Score zeigte ebenfalls einen Abfall bei steigendem Geburtsgewicht am 3., 7. und 14. Lebenstag. Diese Beobachtung konnte für den SNAP-Score lediglich am 14. Lebenstag gemacht werden. Auch hier blieben die weiteren untersuchten Tage ohne rechnerische Relevanz.

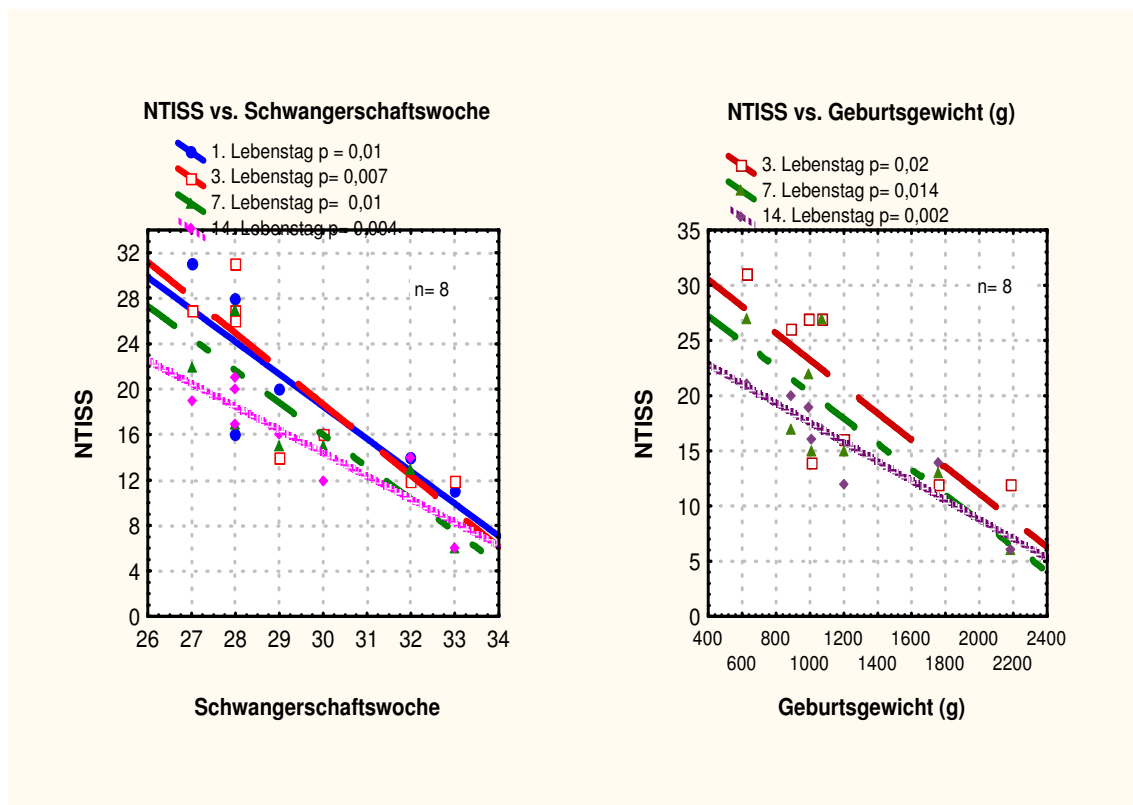


Abbildung 3.45: NTISS-Score mit zunehmender Reife des Kollektives, sowie zunehmendem Geburtsgewicht im dritten Kollektiv.

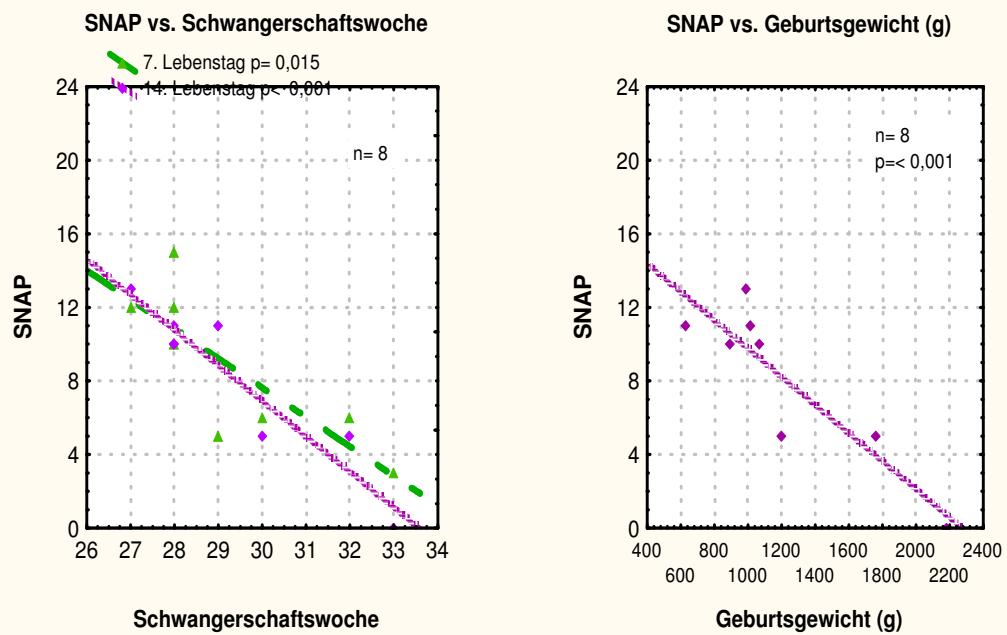


Abbildung 3.46: SNAP-Score mit zunehmender Reife der Patienten und zunehmendem Geburtsgewicht.

3.1.8 Graphische Darstellung der Scores sowie der weiteren erfassten pro-/ antioxidativen Parameter im Verlauf beim dritten Kollektiv

Bei Betrachtung des SNAP- und des NTISS-Scores im Gruppenvergleich fiel auf, dass der SNAP-Score am 14. Lebenstag signifikant niedriger als am 1. Lebenstag ausfiel. Der SNAP-Score zeigte hier die im Mittel höchste Punktzahl am 1. Lebenstag, wie auch in den anderen untersuchten Kollektiven. Der NTISS-Score fiel am 14. Lebenstag signifikant niedriger aus, als am 3. Lebenstag und hat die höchste mittlere Punktzahl am 3. Lebenstag in diesem Kollektiv.

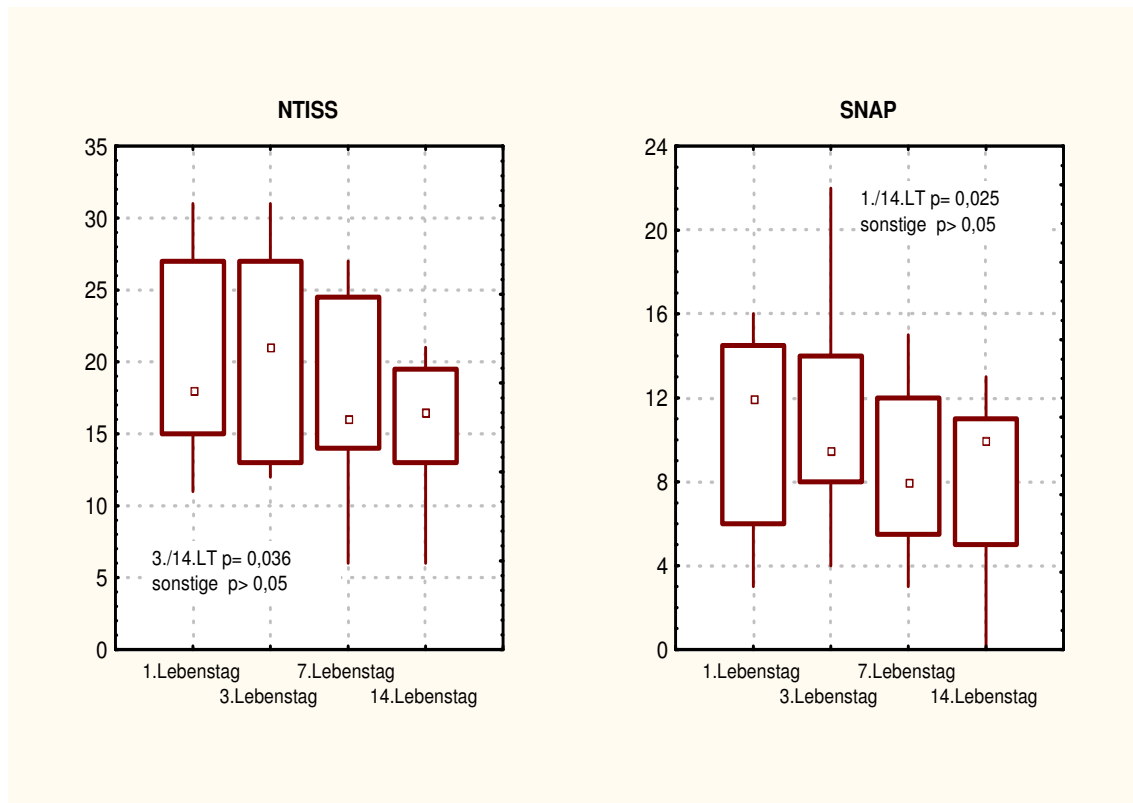


Abbildung 3.47: NTISS- und SNAP-Score an allen 4 untersuchten Lebenstagen im dritten Kollektiv.

Bei Betrachtung des antioxidativen Parameters Bilirubin zeigt sich im Rahmen der physiologischen postnatalen Umstellungsprozesse ein entsprechender signifikanter Anstieg des Bilirubins am 3., 7. und 14. Lebenstag im Vergleich zum 1. Lebenstag, sowie ein signifikanter Abfall des Bilirubins am 14. Lebenstag im Vergleich zum 7. Lebenstag.

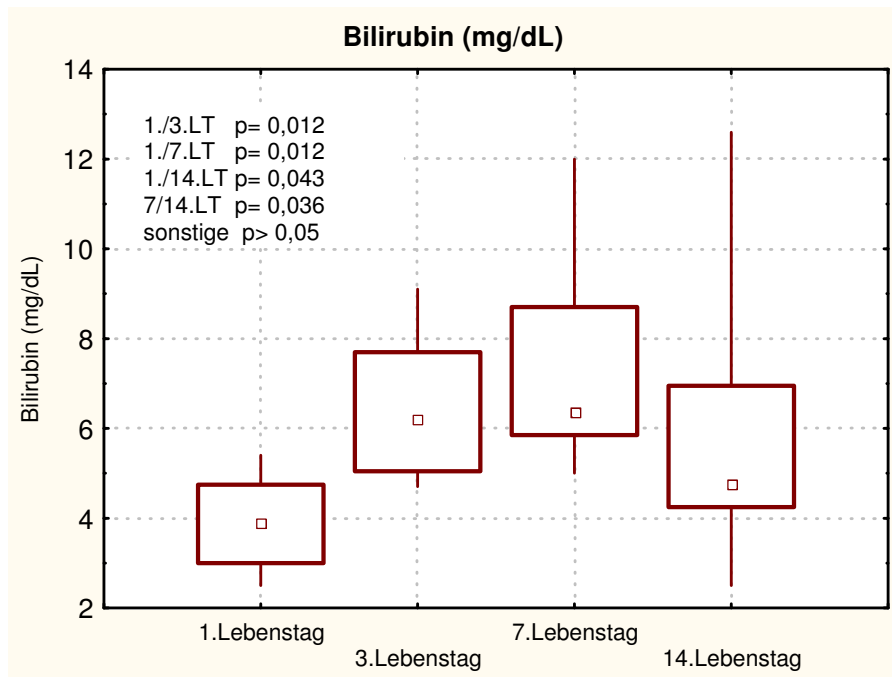


Abbildung 3.48: Bilirubin (mg/dL) am 1., 3., 7. und 14. Lebenstag im dritten Kollektiv.

Der Hämatokrit (%) zeigte einen Abfall am 3., 7. und 14. Lebenstag verglichen mit dem ersten Lebenstag, sowie einen signifikanten Abfall vom 7. zum 14. Lebenstag.

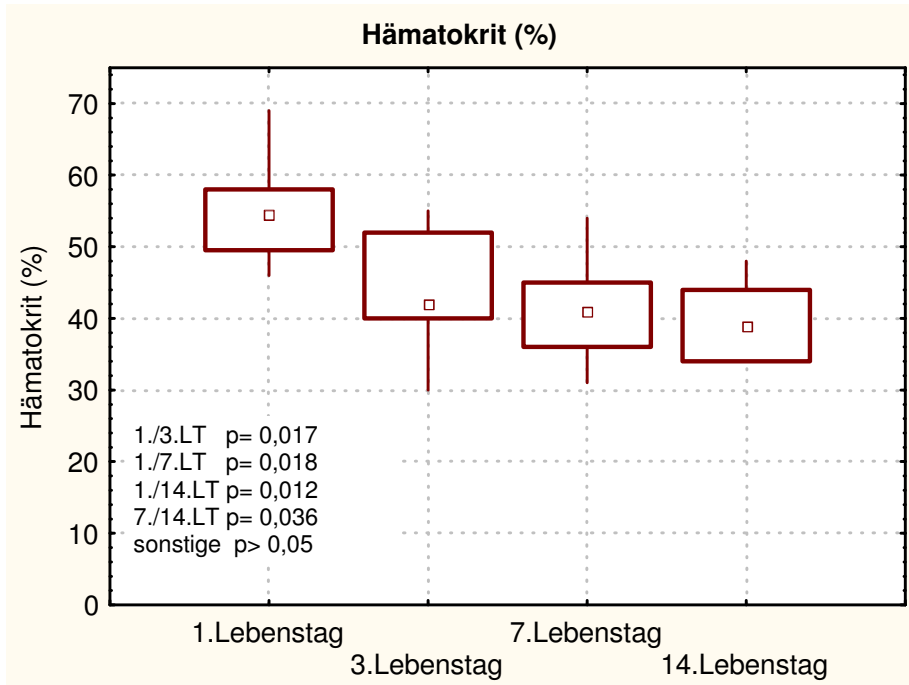


Abbildung 3.49: Hämatokrit (%) am am 1., 3., 7. und 14. Lebenstag im dritten Kollektiv.

Die Radikalresistenz des Erythrozyten, gemessen im ABAP-Hämolyse Testverfahren bot eine signifikant höhere Radikalresistenz der Erythrozyten am 7. und 14. Lebenstag, verglichen mit der Radikalresistenz am ersten und 3. Lebenstag.

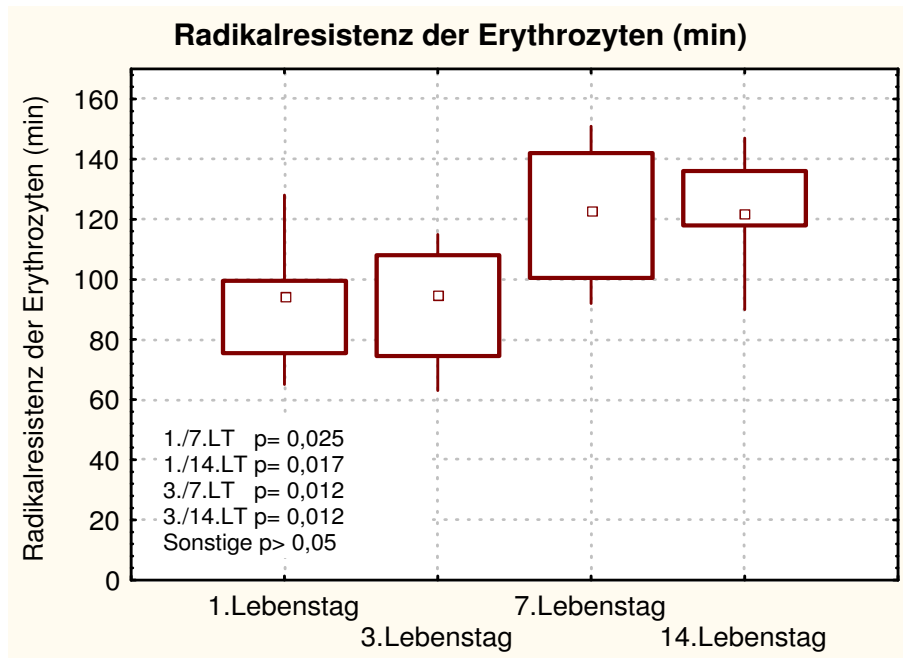


Abbildung 3.50: Radikalresistenz der Erythrozyten (min) am 1., 3., 7. und 14. Lebenstag im dritten Kollektiv.

Coeruloplasmin, als akute-Phase-Protein mit antioxidativer Eigenschaft, bot am 7. und 14. Lebenstag signifikant höhere Spiegel im Vergleich zum ersten Lebenstag. Des Weiteren kam es zu signifikant höheren Spiegeln am 14. Lebenstag, verglichen mit dem 7. Lebenstag.

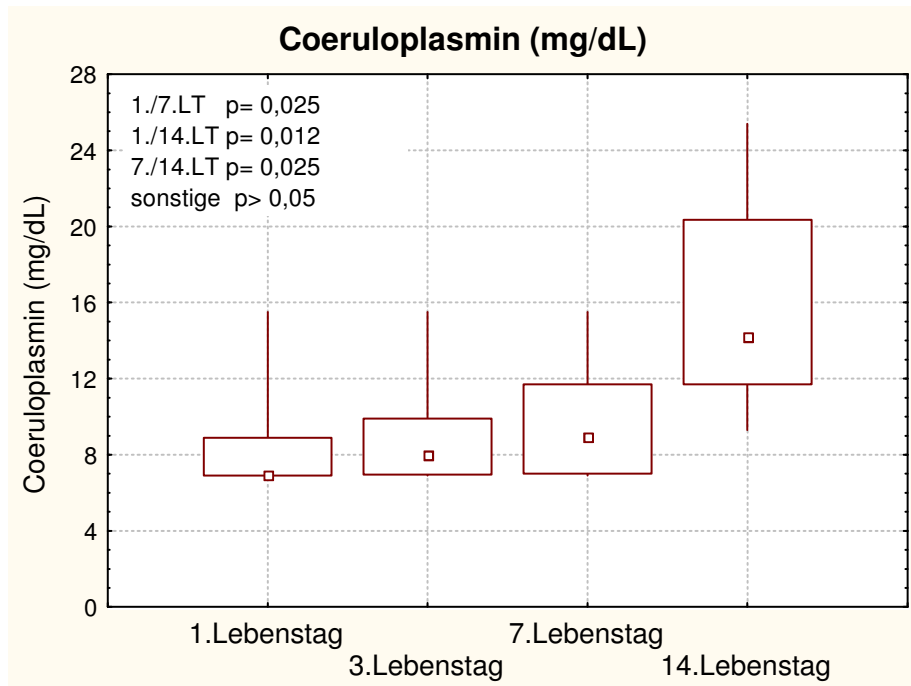


Abbildung 3.51: Coeruloplasmin-Werte (mg/dL) am 1., 3., 7. und 14. Lebenstag im dritten Kollektiv.

Bei Betrachtung des alpha-Tocopherols bezogen auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Cholesterin) zeigte sich ein signifikanter Anstieg vom ersten und 3. Lebenstag zum 14. Lebenstag.

alpha-Tocopherol in der Gesamtmenge ($\mu\text{mol}/\text{l}$) bot einen signifikanten Anstieg vom ersten Lebenstag zum 14. Lebenstag, sowie vom 3. Lebenstag zum 7. und 14. Lebenstag und vom 7. zum 14. Lebenstag.

Beide Vergleichsparameter zeigten am 3. Lebenstag den niedrigsten mittleren alpha-Tocopherolspiegel ($3,2 \mu\text{mol}/\text{mmol}$ Cholesterin und $9,1 \mu\text{mol}/\text{l}$).

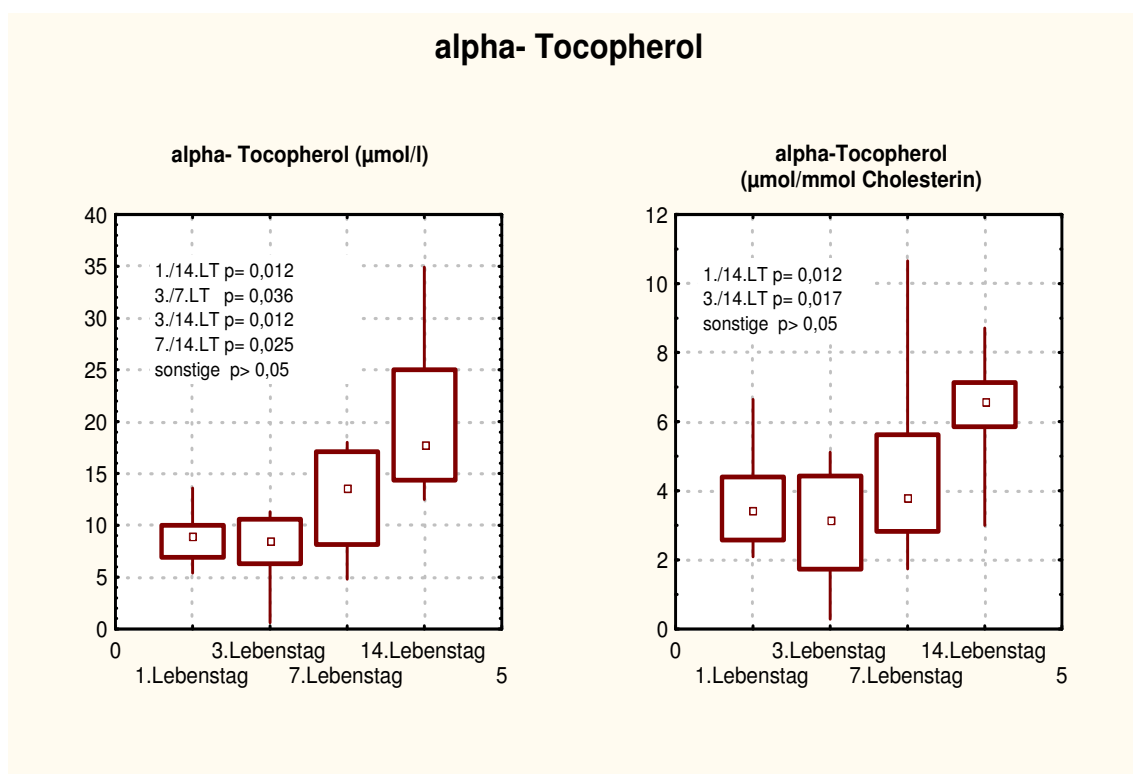


Abbildung 3.52: alpha-Tocopherol ($\mu\text{mol}/\text{l}$), sowie alpha-Tocopherol bezogen auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Cholesterin) im dritten Kollektiv.

Bei Betrachtung des gamma-Tocopherols bezogen auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Cholesterin) bot sich am 7. und 14. Lebenstag ein signifikanter Anstieg im Vergleich zum ersten Lebenstag, sowie am 14. Lebenstag ein signifikanter Anstieg im Vergleich zum 3. Lebenstag.

Das gamma-Tocopherol in der Gesamtmenge stieg mit dem Lebensalter der Patienten signifikant an allen 4 untersuchten Lebenstagen (1., 3., 7. und 14. Lebenstag) an.

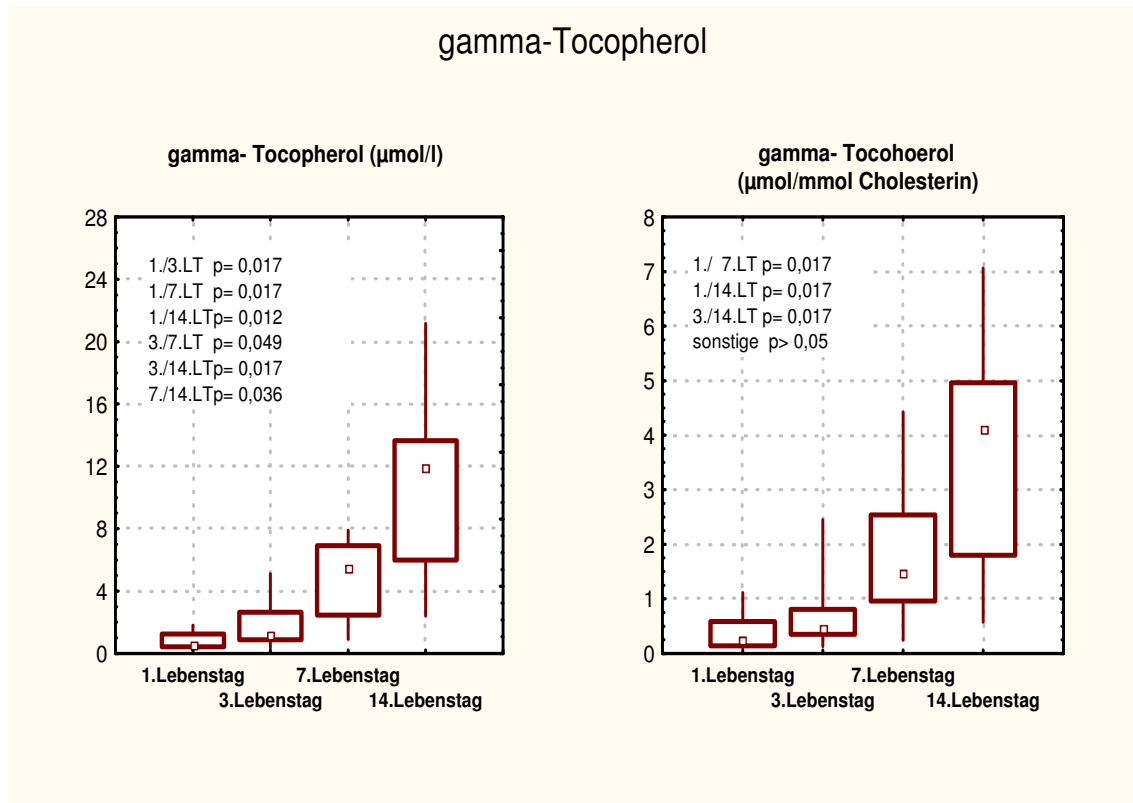


Abbildung 3.53: gamma-Tocopherol ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Cholesterin und $\mu\text{mol}/\text{l}$) im dritten Kollektiv.

Coenzym Q10 gesamt ($\mu\text{mol/l}$) zeigte im Vergleich zum ersten und 3. Lebenstag am 7. und 14. Lebenstag einen signifikanten Anstieg.

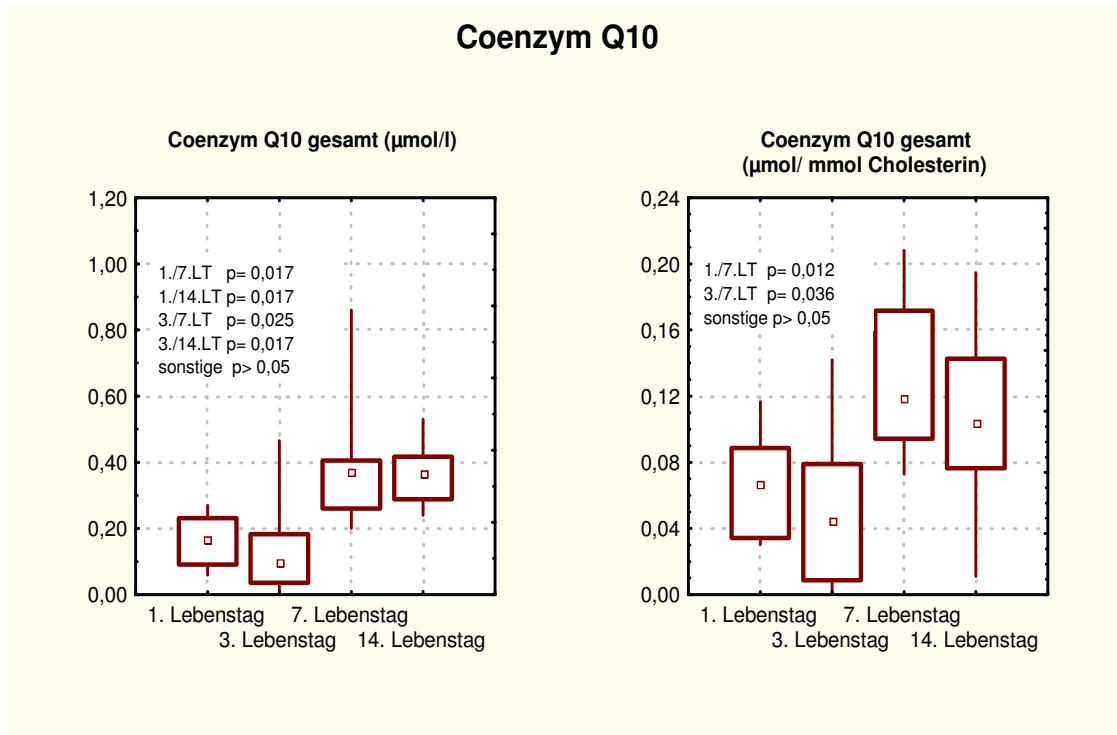


Abbildung 3.54: Coenzym Q10 in der Gesamtmenge ($\mu\text{mol/l}$), sowie bezogen auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin ($\mu\text{mol/mmol Chol.}$) im dritten Kollektiv.

Bei weiterer Betrachtung des Coenzym Q10 (%) bot sich ein signifikanter Anstieg des oxidierten Anteils vom 7. auf den 14. Lebensstag und ein signifikanter Abfall des reduzierten Anteils vom 7. auf den 14. Lebensstag. Weitere Gruppenvergleiche blieben ohne rechnerische Relevanz.

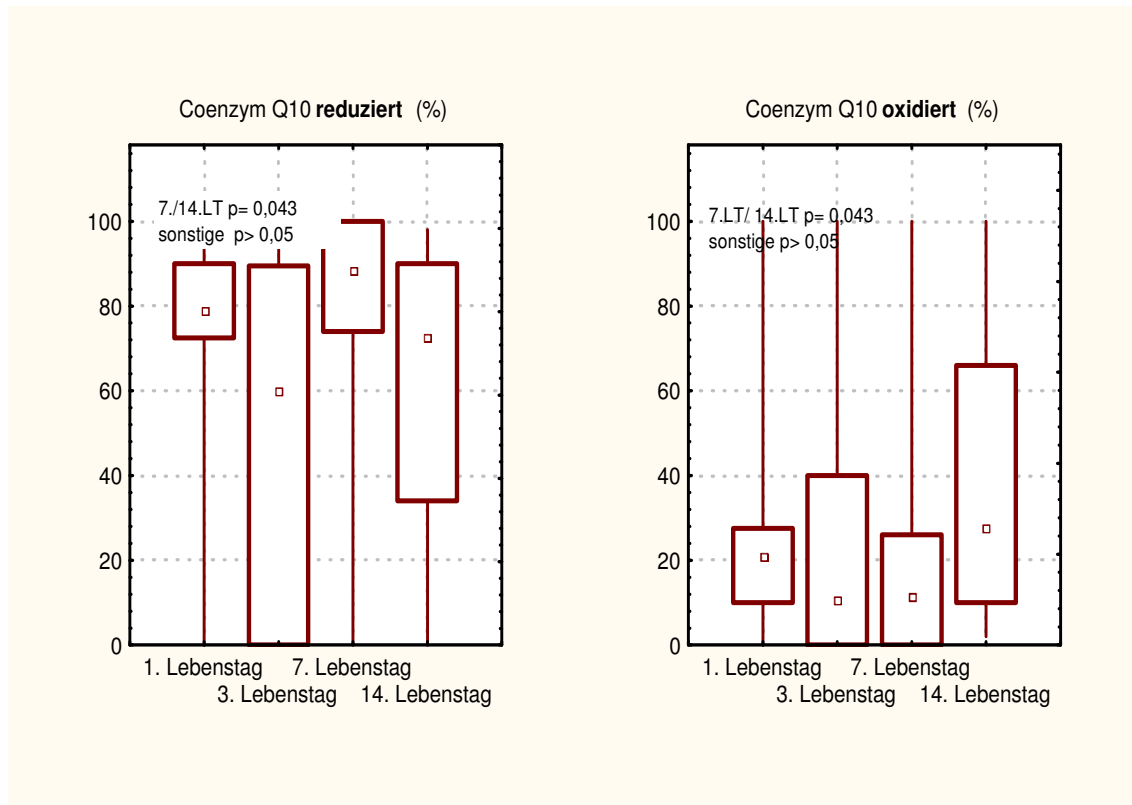


Abbildung 3.55: Oxidiertes und reduziertes Coenzym Q10 (%) im dritten Kollektiv.

3.1.9 Graphische Darstellung der Scores SNAP und NTISS in signifikanten Korrelationen zu den pro-/antioxidativen Parametern im 3. Kollektiv

Mit steigendem Hämatokrit (%) imponierte ein signifikanter Abfall des SNAP-Scores am 7. und 14. Lebenstag. Ebenso bot der NTISS-Score am 14. Lebenstag einen signifikanten Abfall mit steigendem Hämatokrit. Der SNAP blieb am 1. und 3. Lebenstag ohne rechnerische Relevanz, ebenfalls der NTISS am 7. Lebenstag.

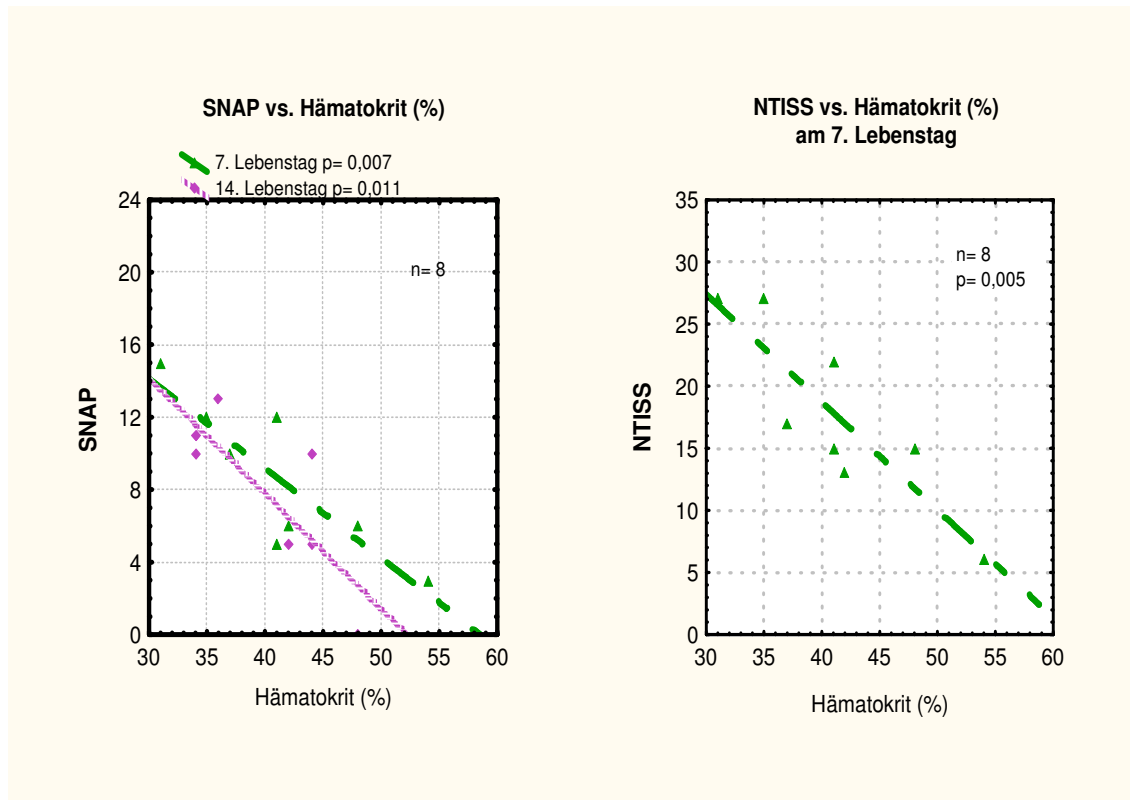


Abbildung 3.56: SNAP- und NTISS-Score und Hämatokrit (%) im dritten Kollektiv.

Am 14. Lebenstag boten die Patienten mit hohem Cholesterinspiegel signifikant niedrigere SNAP- und NTISS-Scores als die, mit niedrigem Cholesterinspiegel. Der 1.-7. Lebenstag blieb hier ohne rechnerische Relevanz.

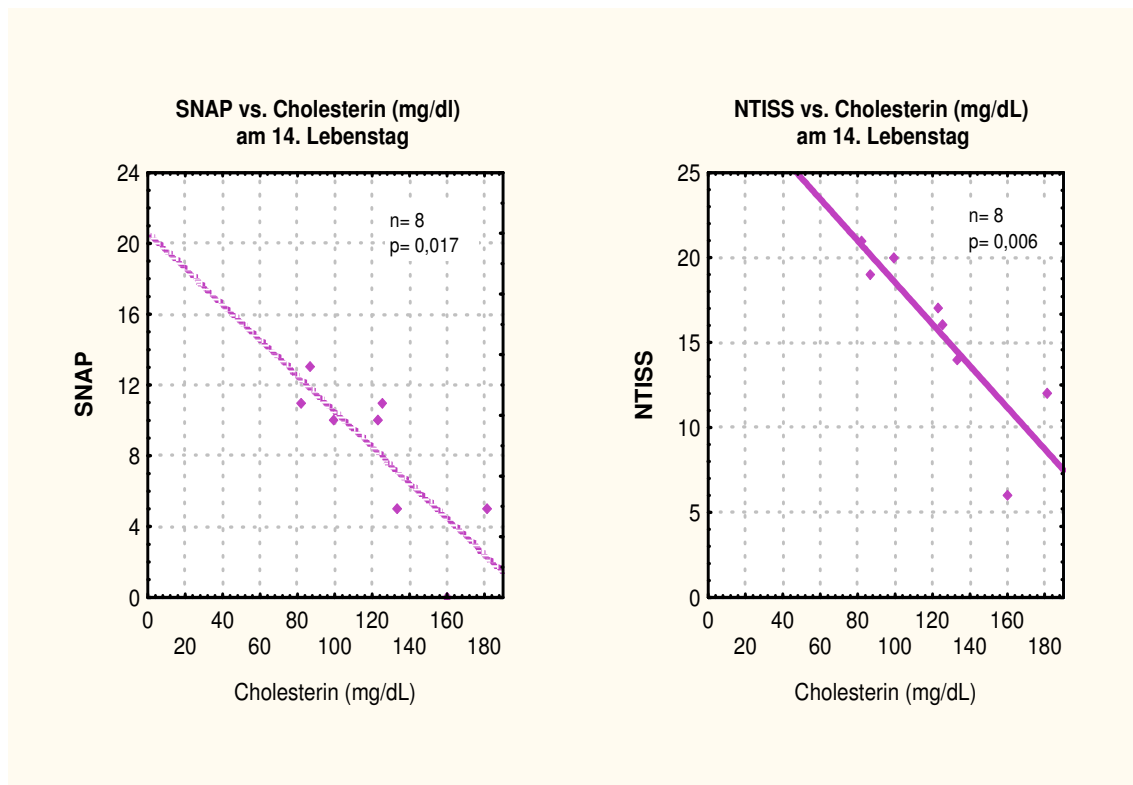


Abbildung 3.57: SNAP- und NTISS-Score und Cholesterin (mg/dl) am 14. Lebenstag im dritten Kollektiv.

Bei Betrachtung des Coenzym Q10 in der Gesamtmenge, sowie bezogen auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin, zeigte sich mit steigendem Spiegel ein signifikanter Abfall des NTISS am ersten Lebenstag.

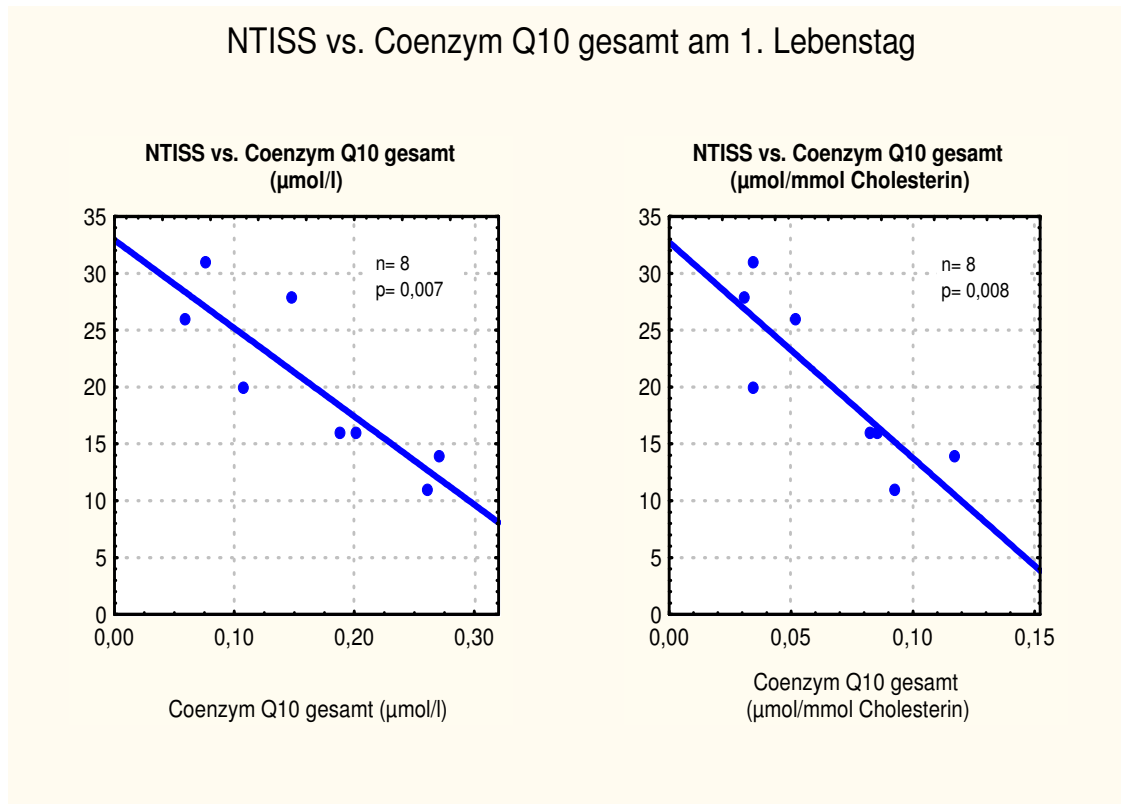


Abbildung 3.58: NTISS-Score und Coenzym Q10 am 1. Lebenstag im dritten Kollektiv.

Des Weiteren boten die Patienten mit höherem reduzierten Anteil von Coenzym Q10, bezogen auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin, einen signifikant niedrigeren SNAP-Score am 1. Lebenstag.

Hier blieben der 3.-14. Lebenstag ohne rechnerische Relevanz.

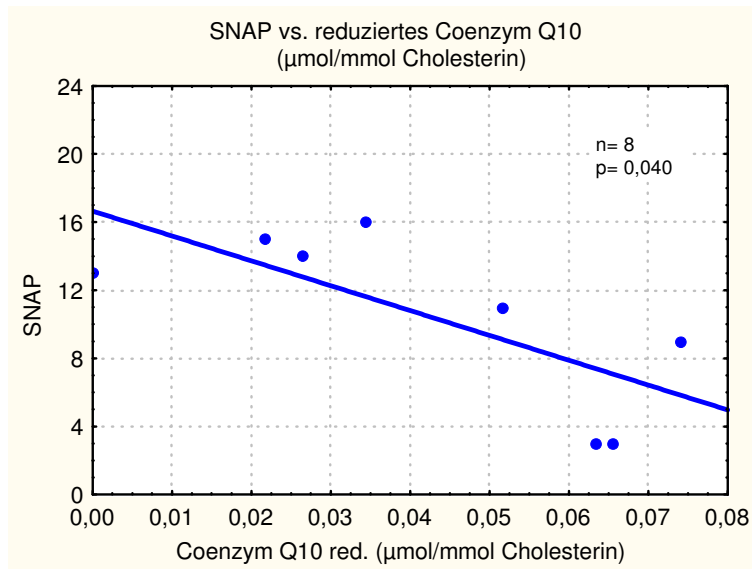


Abbildung 3.59: Abfallender SNAP-Score mit steigendem reduziertem Coenzym Q10, berechnet auf den Cholesterinspiegel, am 1. Lebenstag in der Gruppe 1.-14. Lebenstag.

Ein hoher Spiegel des reduzierten Anteils Coenzym Q10 (%) bot am 14. Lebenstag einen signifikant höheren SNAP-und N-TISS-Score.

Umgekehrt proportional kam es mit höherem Anteil oxidierten Coenzym Q10 (%) am 14. Lebenstag zu einem signifikant niedrigeren SNAP-und N-TISS-Score.

Hier blieb der 1.-7. Lebenstag ohne rechnerische Relevanz.

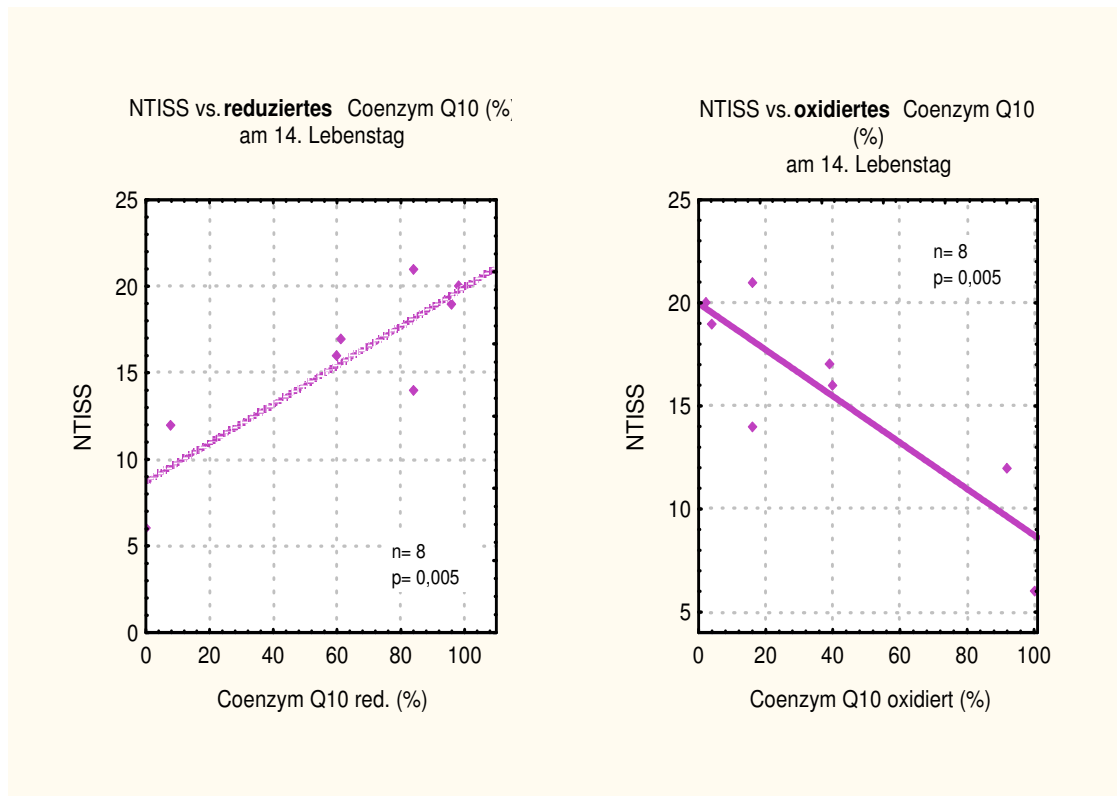


Abbildung 3.60: Am 14. Lebenstag zeigt sich ein Anstieg des N-TISS-Scores mit steigendem Anteil an reduziertem Coenzym Q10 (%), sowie ein Abfall des N-TISS-Scores mit höherem Anteil an oxidiertem Coenzym Q10.

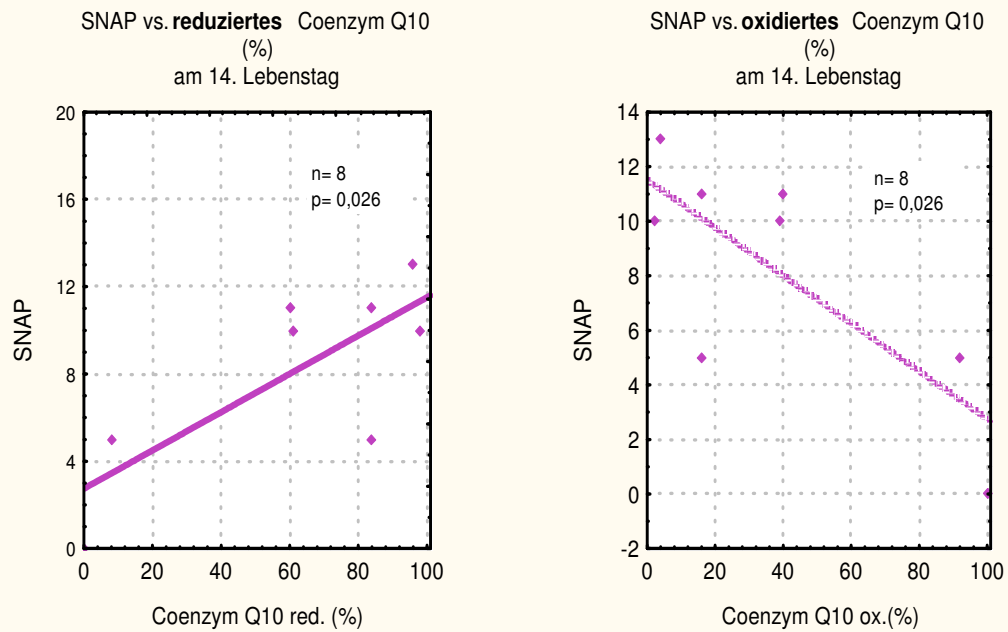


Abbildung 3.61: Am 14. Lebensstag zeigt sich ein Anstieg des SNAP-Scores mit steigendem Anteil an reduziertem Coenzym Q10 (%), sowie ein Abfall des SNAP-Scores mit höherem Anteil an oxidiertem Coenzym Q10.

Ein höherer alpha-Tocopherol Spiegel am 14. Lebenstag zeigte einen rechnerisch signifikant höheren SNAP-Score. Der 1.-7. Lebenstag blieb ohne rechnerische Relevanz.

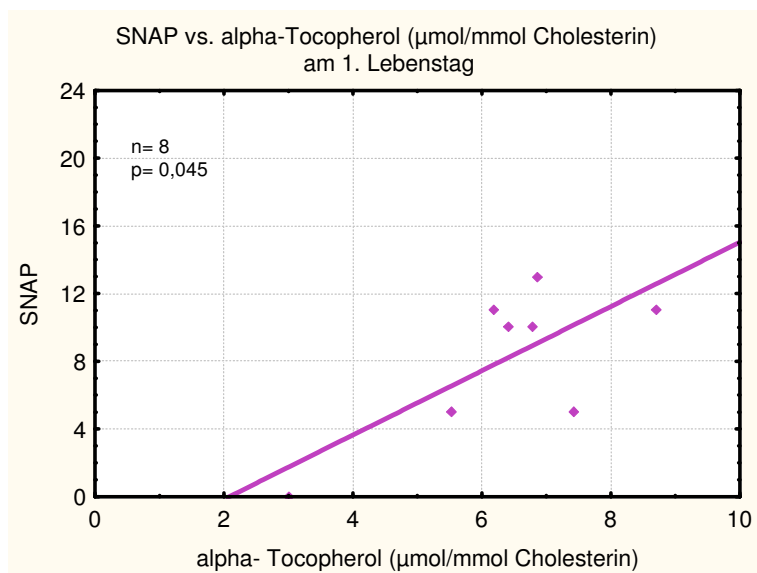


Abbildung 3.62: SNAP-Score und alpha-Tocopherol ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Cholesterin) am 14. Lebenstag im dritten Kollektiv

Ein hoher gamma-Tocopherol-Spiegel bot am 14. Lebenstag einen signifikant höheren NTISS-Score im Vergleich zu niedrigen gamma-Tocopherol-Spiegeln. Die 1.-7. Lebenstage blieben ohne rechnerische Relevanz.

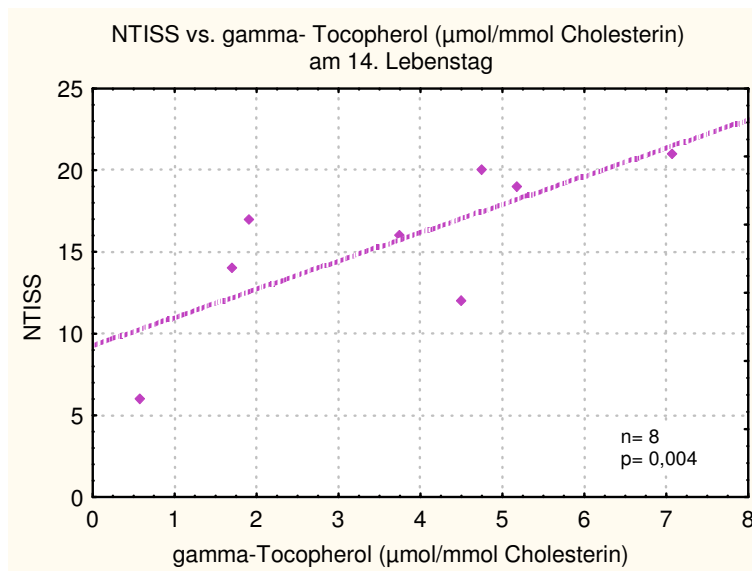


Abbildung 3.63: NTISS- Score und gamma-Tocopherol ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Cholesterin) am 14. Lebenstag im dritten Kollektiv.

3.2 Darstellung der Ergebnisse des 2. Studienteils mit Bestimmung von Nicht-Transferrin-gebundenen Eisens(NTBI $\mu\text{mol/l}$) mit Bezug auf die pro- und antioxidativen Parameter

In nicht zu erwartender Anzahl fanden wir bei den untersuchten 49 Proben einen erhöhten Plasmaspiegel Nicht-Transferrin-gebundenen Eisens (NTBI $\mu\text{mol/l}$).

Die Detektionsgrenze der angewandten Methodik liegt bei 0,4 $\mu\text{mol/l}$ und ist in der folgenden Darstellung durch eine rote Linie gekennzeichnet.

Eine orale Eisensupplementation bei den reiferen Kindern ($\blacklozenge$), meist ehemaligen Frühgeborenen, ergab keinen signifikanten Hinweis auf einen Zusammenhang mit dem Vorkommen freien Eisens.

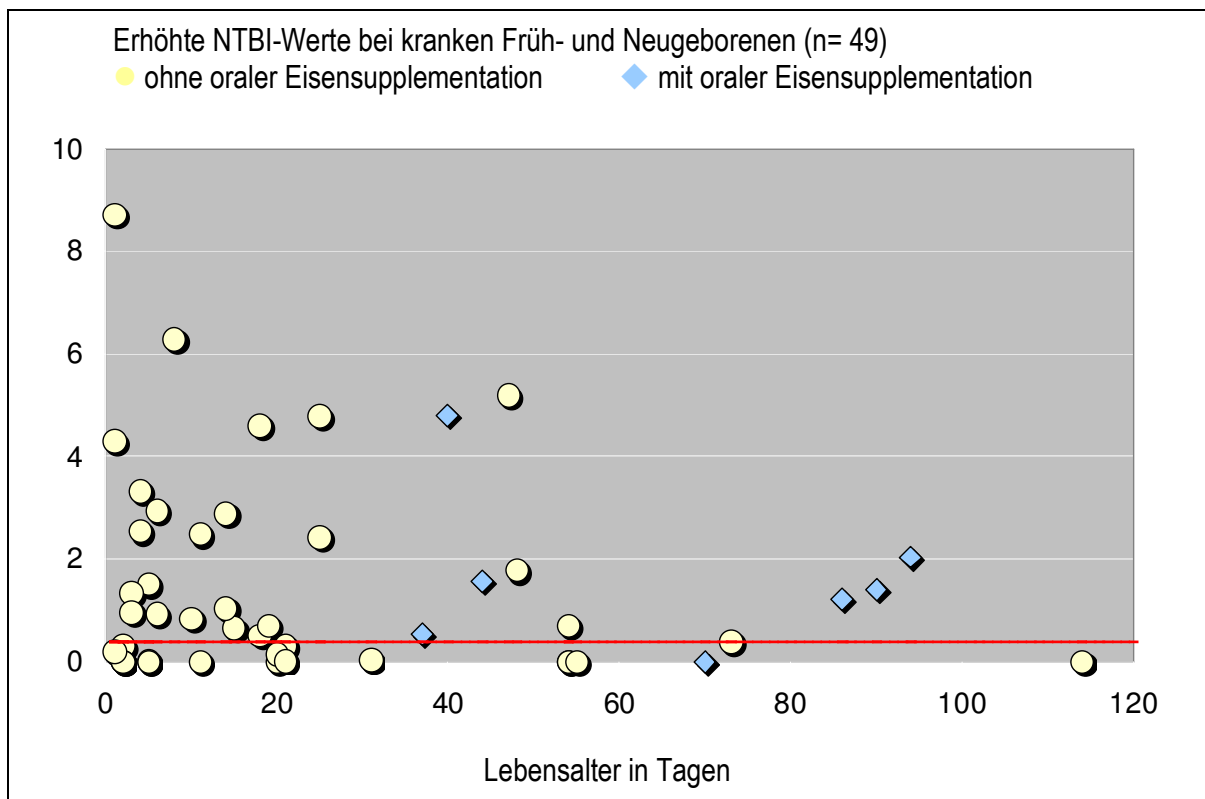


Abbildung 3.64: Darstellung des NTBI ($\mu\text{mol/l}$) in Bezug auf das Lebensalter (Tage) bei partiell oraler Eisensupplementation.

Bei Betrachtung der Radikalresistenz der Erythrozyten im ABAP-Hämolyse-Test zeigte sich eine signifikante Abnahme der Resistenz mit steigenden NTBI-Werten.

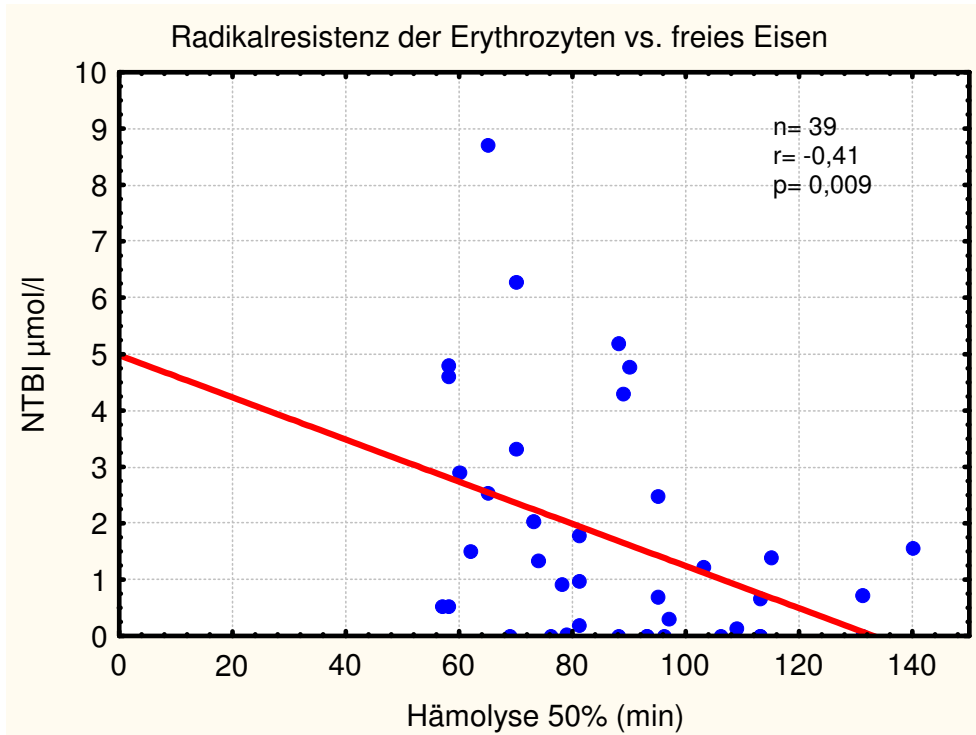


Abbildung 3.65: Radikalresistenz der Erythrozyten und NTBI (µmol/l).

Das Malondialdehyd ($\mu\text{mol/l}$), als Produkt der Lipidperoxidation, bot einen signifikanten Anstieg der Spiegel mit steigendem NTBI-Spiegel ($\mu\text{mol/l}$).

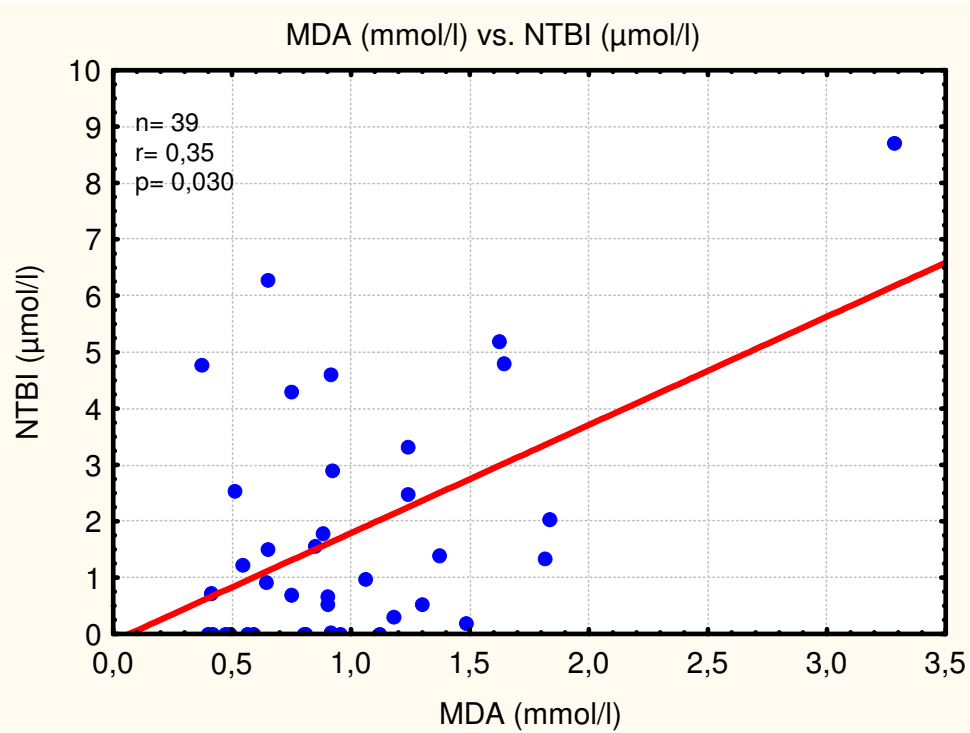


Abbildung 3.66: Malondialdehyd ($\mu\text{mol/l}$) und NTBI ($\mu\text{mol/l}$).

Die Betrachtung des NTBI in 2 Gruppen, NTBI positiv (Werte $> 0,4 \mu\text{mol/l}$) und NTBI negativ (Werte $< 0,4 \mu\text{mol/l}$), ergab ebenfalls signifikant höhere MDA-Werte in der Gruppe mit nachweisbarem NTBI.

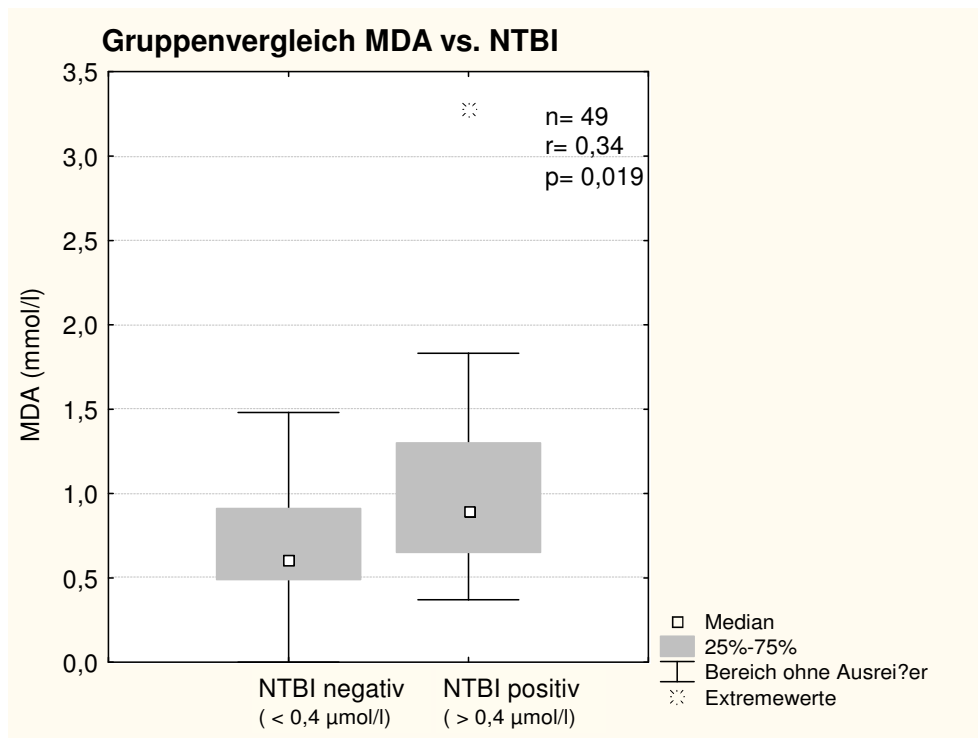


Abbildung 3.67: NTBI ($\mu\text{mol/l}$) und Malondialdehyd (mmol/l).

Weitere untersuchte Parameter wie Gesamteisen, Cholesterin, Coeruloplasmin, Tocopherole, sowie Coenzym Q10 boten keinen rechnerisch signifikanten Zusammenhang.

Ebenfalls gab es keinen rechnerischen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von sogenannten Frühgeborenenenerkrankungen wie NEC, BPD, RPM oder ICH, deren Genese in Zusammenhang mit der Wirkung freier Radikale auf den Organismus diskutiert wird, mit dem Vorkommen freien Eisens.

Retrospektiv gab es keinen Anhalt für einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten freien Eisens und der Ernährungsformen (oral/ parenteral), der Gabe von Erythrozytentransfusionen in der Verlaufshistorie oder dem Gestationsalter der Patienten bei Abnahme der Blutprobe.

4 Diskussion

Wir haben in dieser Studie versucht einen möglichen Zusammenhang zwischen dem klinischen Verlauf und dem parallel untersuchten pro-/antioxidativen System des untersuchten Frühgeborenenkollektiv darzustellen.

Hierzu verglichen wir die gemessenen Parameter des pro-/antioxidativen Systems mit den zeitgleich erhobenen Daten aus den klinischen Scores SNAP und NTISS.

Unsere Hypothese, dass Frühgeborene mit einem hohen klinischen Score und damit objektiv ermittelt schlechtem klinischen Zustand eine reduzierte antioxidative Abwehrlage und/oder eine erhöhte Produktion freier Radikale aufweisen, galt es zu überprüfen.

Des Weiteren widmeten wir uns der Fragestellung ob freies nicht-Transferrin-gebundenes Eisen bei kranken Früh- und Neugeborenen vorkommt und in wie weit hier ein Zusammenhang mit der antioxidativen Abwehrlage besteht.

4.1 Methodenkritik

4.1.1 Kollektivauswahl und Probensammlung

In der Gruppe der Frühgeborenen, die jeweils wieder in drei Einzelgruppen unterteilt wurden, variiert die Reife der Patienten zwischen der 24. und 34. Schwangerschaftswoche

Es wurde keine weitere Unterscheidung zwischen unreifen und sehr unreifen Frühgeborenen vorgenommen, wie es Finckh et al. 2003, bei der Zusammenführung der Daten dieser Studie mit der vorherigen Pilotstudie machte. Wie es in Bezug auf das Gestationsalter Unterschiede in der Organreife und der Reife des Immunsystems gibt, ist es möglich, dass es Unterschiede in der Ausreifung des antioxidativen Systems gibt, die nicht erfasst wurden.

Die gleiche Problematik stellt sich für das Neu- und Frühgeborenenkollektiv der Eisenstudie, da das Lebensalter von 1-114 Tagen variiert.

4.1.2 Antioxidative Parameter

Alle Blutproben wurden nach Entnahme und Zentrifugation dunkel bei 4°C gelagert und binnen 24 Stunden verarbeitet, um weitere oxidative Vorgänge zu minimieren. Dies gilt

sowohl für die Kapillarblutproben, als auch für die Citratblutproben zur Bestimmung des NTBI (non transferrin bound iron).

Auf eine Nüchternblutentnahme musste aufgrund der Zweckgebundenheit der Entnahme verzichtet werden. Daher sind alimentäre Einflüsse, sowie lagerungsbedingte kleine Abweichung bei den Messergebnissen nicht auszuschließen.

4.1.3 Bestimmung von Malondialdehyd, MDA

Die früher häufig verwendete Methode nach Naidoo und Knapp (1992) zur Bestimmung Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen ist nicht ausreichend spezifisch für Malondialdehyd, da andere Substanzen, wie z.B. oxidierte Lipide oder Aminosäuren auch mit Thiobarbitursäure Komplexe bilden, die bei derselben Wellenlänge photometrisch messbar sind.

Die mit dieser Methode erhaltenen Ergebnisse sind daher nur eingeschränkt beurteilbar.

Die hier angewandte Methode zur Bestimmung von MDA ist durch den Einsatz der HPLC und der Fluoreszenzdetektion sehr spezifisch.

Da sämtliche Glasgeräte leicht durch Spülmittelreste mit Aldehyden kontaminiert sind, wurde ausschließlich mit Einwegplastikmaterial gearbeitet um Fehlbestimmungen zu vermeiden.

4.1.4 Bestimmung von NTGE

Die bisher in den meisten Studien verwendete Methode nutzt die schwache Eisenbindungskapazität des Zytostatikums Bleomycin (Gutteridge et al. 1987). Durch diese Eisen-Bleomycin-Komplexe können in Gegenwart von Ascorbinsäure in Desoxiribonucleinsäuren (DNS) Einzel- und Doppelstrangbrüche entstehen (Aruoma et al. 1988). Gemessen werden dann Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen, die bei der DNS-Schädigung auf oxidativem Weg entstehen. Es handelt sich also um eine indirekte Bestimmung des niedermolekularen Eisens. Da die Messung von einem Redoxprozess abhängig ist, sind die Ergebnisse möglicherweise durch im Serum enthaltene Oxidantien und Antioxidantien zu beeinflussen.

Die in der vorgelegten Arbeit angewandte Methode zur Bestimmung von Nicht-Transferrin-gebundenem Eisen beruht auf der Eigenschaft von Nitrilessigsäure (NTA), als Eisenchelator zu fungieren.

Die erhaltenen Fe-NTA-Komplexe wurden ultrafiltriert und mittels Atomabsorptionsspektrometrie gemessen. Es handelt sich also hier um eine direkte

Bestimmung des freien Eisens, die von in der Probe vorhandenen redoxaktiven Substanzen unabhängig ist. Die Konkurrenz um an Transferrin gebundenes Eisen scheint weitgehend ausgeschlossen werden zu können, da die Eisenbindungsaffinität von NTA um etwa 20-fach geringer ist. Bei der Erhebung eines Kontrollkollektives von 23 gesunden Kindern im Alter von 3-18 Jahren (Kim et al. 1999) fanden sich im Serum jedoch geringe Mengen von NTGE. Bei der hohen Bindungsaffinität von Transferrin und einer nur 20-50% Sättigung der Eisenbindungskapazität wird in der Literatur heute davon ausgegangen, dass NTGE bei gesunden Personen nicht existiert.

Es ist daher anzunehmen, dass es sich hierbei um eine Kontamination durch in den Blutentnahmeröhrchen enthaltenem Eisen handelt, die nicht eisenfrei gewaschen wurden.

Bei Früh- und Neugeborenen ist jedoch eine variable Transferrinsättigung bis zu 100% beschrieben worden. Dazu kommt, dass Transferrin keine konstante Bindungsaffinität besitzt, sondern bei Frühgeborenen die latente Eisenbindungskapazität geringer ist als bei reifen gesunden Neugeborenen (Lentjes et al. 1995).

Daher ist bei entsprechenden Patientenkollektiven ein Auftreten freien Eisens trotz unauffälliger Klinik durchaus denkbar.

Diese Vermutung wird durch Ergebnisse gestützt, dass bei Frühgeborenen, im Rahmen der Erythropoitintherapie, mit einem iatrogen verursachten Eisenmangel mit erhöhtem Bedarf, kein NTGE nachzuweisen war (Finckh et al. 2000).

Bei der weiteren Verarbeitung wurde streng auf möglichst eisenfreies Milieu geachtet (siehe Methodik).

Gosriwatana et al. zeigten 1999, dass bei unvollständiger Transferrin-Sättigung NTA-Eisen an freie Bindungsstellen des Transferrins gebunden wird. Durch vorherige Absättigung des Transferrins mit Kobalt wurden signifikant höhere Konzentrationen Nicht-Transferrin-gebundenen Eisens gemessen. Es ist daher nicht auszuschließen, dass in unserer Studie zum Teil zu niedrige NTGE-Werte gemessen wurden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 SNAP und NTESS in Bezug auf Reife und Geburtsgewicht

Mit dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass bei dem Kollektiv mit der höchsten Fallzahl, 1. und 3. Lebenstag, mit steigendem Geburtsgewicht und zunehmender Reife am 1., wie auch am 3. Lebenstag der NTESS als auch der SNAP signifikant niedriger war.

Dies spiegelt den Umstand wieder, dass reifere Frühgeborene entsprechend weniger physiologische Probleme aufweisen und daher weniger therapeutische Intervention erfordern.

Des Weiteren ließ sich ein signifikanter Abfall beider Scores vom ersten zum dritten Lebenstag festhalten.

Dies lässt vermuten, dass das Kollektiv nach 72 Lebensstunden klinisch stabiler war mit weniger therapeutischem Interventionsbedarf.

Dieses Ergebnis ließ sich in Bezug auf den NTISS-Score im Kollektiv 1.-7. Lebenstag, sowie 1.-14. Lebenstag eindrucksvoll reproduzieren. Es fehlt lediglich die Signifikanz vom 1. zum 3. Lebenstag in der Gruppe 1.-14. Lebenstag, was wir durch eine in dieser Gruppe sehr kleine Fallzahl (n=8) erklären.

Dieses Ergebnis ließ sich für den SNAP-Score in der Gruppe 1.-7. Lebenstag, sowie 1.-14. Lebenstag nicht darstellen.

Möglicherweise kann dies bedeuten, dass das Gestationsalter, sowie das Geburtsgewicht im Verlauf einer intensivmedizinischen Betreuung zwar eine gewichtige Ausgangssituation vorgibt, jedoch im Verlauf an Relevanz verliert, da sich neue gravierendere Bedingungen wie Infektionen u.ä. ergeben, die den Verlauf beherrschen.

Entsprechende Beobachtung bezüglich des SNAP-Scores machte Meadow et al. 2002 der bei dem Versuch den SNAP-Score im Verlauf zur Vorhersage der Mortalität zu validieren feststellte, dass die größte Signifikanz am 1. Lebenstag besteht und im Verlauf abnimmt.

Des Weiteren ist eine Abhängigkeit des SNAP-Scores am ersten Lebenstag vom Geburtsgewicht beschrieben worden, wobei der Score in den ersten 12 Stunden post natum den größten Vorhersagewert bezüglich der Mortalität hatte. Der Score in den folgenden 12 Stunden spiegelt eher die Effektivität der Therapie wieder (Petridou et al. 1998).

Maiya et al. untersuchten 2001 die Vorhersagekraft des SNAP für die Krankheitsschwere und neonatale Mortalität bei Neugeborenen. Die Ergebnisse zeigten, dass hier der SNAP-Score dem Geburtsgewicht oder dem Gestationsalter in der Vorhersagekraft überlegen war.

Unsere Beobachtung einer negativen Korrelation zwischen den klinischen Scores und der Reife der Kinder, ausgedrückt in Schwangerschaftswochen deckt sich mit den in der Literatur beschriebenen Daten (Gray et al. 1992, Richardson et al. 1993).

Eine partiell fehlende Reproduzierbarkeit in den kleineren Kollektiven führen wir auf die geringere Fallzahl zurück.

4.2.2 SNAP und NTISS in Bezug auf das pro-/antioxidative Gleichgewicht

Unter der Vorstellung, dass sich das pro-/antioxidative Gleichgewicht im klinischen Outcome wieder spiegeln könnte, erfolgte die Betrachtung der einzelnen Parameter mit dem entsprechenden klinischen Score.

4.2.2.1 Bilirubin

Bilirubin, als niedermolekulares Endprodukt des Haem-Abbaus, wird in vitro eine antioxidative Funktion nachgesagt, indem es pro Molekül zwei Radikale z.B. Peroxylradikale und singulären Sauerstoff zu binden vermag (Neuzil et al. 1993). Es ist fest an Albumin gebunden. So werden sowohl Proteine, als auch an Albumin gebundene Fettsäuren vor der Oxidation durch freie Radikale geschützt. Dieser Effekt konnte in in vitro Studien belegt werden, in vivo ist dies bis dato nicht gelungen (Dani et al. 2004, Hammermann et al. 1998, Yigit et al. 1999).

Unsere Arbeit zeigt, dass in der Gruppe 1. und 3. Lebenstag, als auch in der Gruppe 1.-7. Lebenstag mit steigenden Bilirubinspiegeln ein signifikanter Abfall der NTISS und SNAP-Scores zu verzeichnen ist.

Eine hier mögliche protektive Auswirkung des Bilirubin ist jedoch von zwei physiologischen Effekten überlagert. Zum einen, steigt das Bilirubin postnatal beim Neugeborenen unabhängig von der Schwere der Erkrankung und des therapeutischen Interventionsbedarfes, zum anderen spiegeln NTISS und SNAP-Score im Verlauf, wie bereits in Kapitel 4.2.1 erläutert, den Erfolg der intensivmedizinischen Behandlung wieder.

Im Gruppenvergleich zeigte sich über den Untersuchungszeitraum ein signifikanter Anstieg des Bilirubins und dann ein Stagnieren, was auf die klinische Handhabung zurückzuführen ist. Es handelt sich hierbei um eine permissive Hyperbilirubinämie die dem Gewicht und Gestationsalter angepasst ist und bei überschreiten der definierten Bilirubingrenze nach den aktuellen Empfehlungen (Gomella 2003) therapiert wird.

Möglicherweise profitieren die Kinder von der antioxidativen Wirkung erhöhter Bilirubinspiegel was zu signifikant niedrigeren SNAP und NTISS-Scores führt.

Hier ist jedoch zu beachten, dass es bei der Bildung von Bilirubin über die Haemoxygenase zu Freisetzung prooxidativen Eisens kommt und dass das Haem selbst

eine prooxidative Wirkung besitzt, sodass es sich hier um ein empfindliches Gleichgewicht handeln kann.

Hinzu kommt, dass Bilirubin in der unkonjugierten Form neurotoxisch ist, zu Kernikterus führen kann und Apoptosis (Oh et al. 2003) auslöst, sowie im Rahmen einer Phototherapie Singulett-Sauerstoff gebildet werden kann (Halliwell 1999, Rodriguez et al. 2002). Hohe Bilirubinkonzentrationen könnten daher auch als Marker oxidativen Stresses interpretiert werden (Hidalgo et al. 1990).

4.2.2.2 Hämatokrit

In unserer Arbeit fiel in der Gruppe 1. und 3. Lebenstag ein Abfall des NTISS mit steigendem Hämatokrit auf.

Die gleiche negative Korrelation ließ sich in der Gruppe 1.-7. Lebenstag am 7. Lebenstag reproduzieren.

In der Gruppe 1.-14. Lebenstag zeigte sich ein signifikant niedriger SNAP mit steigendem Hämatokrit am 7. und 14. Lebenstag.

Perinatal ist bei Neugeborenen ein transkapillärer Plasmaverlust ins Interstitium beschrieben, der dazu führt, dass der HKT im Schnitt von ca. 44% auf ca. 55% steigt und das zirkulierende Blutvolumen um ca. 14% sinkt (Polin, Fox, Abman, Fetal and Neonatal Physiology 2004).

Bei fehlender Blutungsquelle z.B. ICH könnte dies indirekt die klinische Stabilität des Patienten und damit ausbleibenden gesteigerten iatrogenen Blutverlust widerspiegeln.

Anders betrachtet birgt ein ausreichend hoher Hämoglobingehalt mit entsprechender Anzahl Erythrozyten ein erhöhtes antioxidatives Potential, da Erythrozyten Wasserstoffperoxyd aufnehmen und das umliegende Gewebe vor oxidativen Prozessen schützt (Winterbourn et al. 1987).

Im Erythrozyten sorgt die Glutathionperoxidase für den schadlosen Abbau des Wasserstoffperoxyd zu Wasser, und mit Hilfe der Glutathionreduktase wird das oxidierte Glutathion zurückreduziert (Halliwell 1999).

Das in den Erythrozyten vorkommende Glutathion als Cofaktor der GPX-Familie (Glutathionperoxidasefamilie) chellatiert zudem Cu-Ionen, die wie Eisen Radikalbildung katalysieren können (Halliwell 1999).

Fetale Erythrozyten enthalten vorwiegend Hämoglobin F, haben eine kürzere Lebensdauer und enthalten zwar mehr ungesättigte Fettsäuren, aber weniger alpha-

Tocopherol, Gluthationperoxidase, Katalase und möglicherweise weniger Superoxiddismutase als Erythrozyten Erwachsener (Berger et al. 1995).

Daher könnte ein durch Transfusion von erwachsenen Spendern entsprechend hoher Hämatokrit zu einer verbesserten antioxidativen Abwehrlage und konsekutiv zu einem besseren klinischen Zustand der Patienten führen.

Dani et al. beschrieben 2004 eine signifikant erhöhtes Auftreten von prooxidativem niedermolekularem Eisen (NTBI) direkt nach Erythrozytentransfusion bei gesunden Frühgeborenen, konnten jedoch keine Zeichen eines erhöhten oxidativen Stresses nachweisen.

Möglicherweise nihiliert sich eine prooxidativ förderliche Situation durch Transfusion mit erhöhtem Vorkommen freien Eisens und Haem-Komplexen durch die intracellulär vorkommenden antioxidativ wirkenden Enzyme der transfundierten Erythrozyten.

In der Literatur ist jedoch mehrfach ein erhöhtes Risiko für das Auftreten einer BPD im Zusammenhang mit gehäuften Transfusionen beschrieben (Gerber et al. 1999, Silvers et al. 1998, Cooke et al. 1997, Collard et al. 2006). In keiner dieser Studien konnte ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten freien niedermolekularen Eisens mit gesteigertem oxidativen Stress nachgewiesen werden, jedoch beschrieb Hirano et al. 2001 signifikant niedrigere Coeruloplasminspiegel und Feroxidaseaktivität nach Transfusionen mit parallel steigenden Spiegel an freiem Eisen, Bleomycin Detectable Iron (BDI).

Im Gruppenvergleich zeigte sich in dieser Studie, dass der Hämatokrit vom ersten zu den folgenden untersuchten Tagen signifikant abnahm.

Allein vom 3. zum 7. Lebenstag ist kein signifikanter Abfall zu dokumentieren, was auf die klinische Handhabung zurückzuführen ist. Mit jeder Lebenswoche wird ein niedrigerer Hämatokrit/ Hämoglobingehalt toleriert und im Verlauf werden Transfusionen restriktiver gehandhabt.

Bis dato gibt es keine einheitliche Transfusionsrichtlinie für Frühgeborene. Die Belastung mit Eisen und Abbauprodukten durch Transfusion und bislang undurchschaubaren Folgen steht einer verbesserten Sauerstoffversorgung gegenüber.

4.2.2.3 Vitamin E

In der Gruppe 1.-3. Lebenstag zeigte sich am ersten Lebenstag ein abfallender SNAP-Score mit steigendem alpha-Tocopherolspiegel.

Gleiches ließ sich in der Gruppe 1.-7. Lebenstag am 7. Lebenstag mit dem SNAP- und dem NTISS-Score reproduzieren.

Der NTISS-Score am 7. Lebenstag fiel signifikant mit einem Anstieg des auf das Cholesterin berechneten alpha-Tocopherols.

Auch hier profitieren die Patienten möglicherweise von ausreichenden Vitamin E-Spiegeln im Plasma und damit größerem Schutz vor oxidativem Stress, was sich in entsprechend niedrigen Punktzahlen in den klinischen Scores widerspiegelt.

Im Gruppenvergleich stiegen die alpha-Tocopherolwerte in den untersuchten Gruppen im postnatalen Verlauf an, wobei ein sprunghafter Anstieg vom 1. und 3. Lebenstag zum 7. Lebenstag zu vermerken war, was sicherlich auf die parenterale Supplementation durch die am 4./ 5. Lebenstag begonnene Fettinfusion zurückzuführen ist.

Die Plasma-Tocopherolkonzentrationen, die in dieser Arbeit bestimmt wurden, entsprechen den in der Literatur beschriebenen Daten (Ghebremeskel et al. 1999, Luukainen et al. 1998).

Niedrige alpha- und gamma-Tocopherolkonzentrationen bei Frühgeborenen direkt nach Geburt sind in der Literatur beschrieben (Wu et al. 2001).

Die Patienten unserer untersuchten Kollektive erhielten alle ab dem 4./5. Lebenstag Intralipid® im Rahmen eines standardisierten parenteralen Ernährungaufbaus.

Intralipid wird auf Sojaölbasis hergestellt und enthält 8% alpha-Tocopherol und 69% beta- und gamma-Tocopherol. Nach intravenöser Gabe steigt die Konzentration beider Tocopherole im Plasma (Traber et al. 1993).

Dies erklärt möglicherweise den Anstieg von gamma-Tocopherol bezogen auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin am 7. Lebenstag in der Gruppe 1.-7. Lebenstag mit ebenfalls steigendem SNAP-Score, sowie am 14. Lebenstag in der Gruppe 1.-14. Lebenstag.

Eine Erklärung wäre, dass Patienten, die am 7. Lebenstag und besonders am 14. Lebenstag parenteral Fett erhielten bis dato nicht ausreichend enteral aufgebaut werden konnten. Dies aufgrund klinischer Komplikationen wie z.B. nekrotisierender Enterokolitis (NEC), was den entsprechend erhöhten SNAP erklären würde.

Beim Frühgeborenen ist der alpha-Tocopherolspiegel im Plasma, wie auch der Coeruloplasminspiegel niedriger als beim Erwachsenen (Bracci et al. 1993, Lindeman et al. 1989).

Dies ist möglicherweise auf den insgesamt niedrigen Spiegel an Lipiden im Plasma Frühgeborener zurückzuführen (Kiely et al. 1999). Daher erfolgte unsere Berechnung der Tocopherol-Spiegel zusätzlich auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin.

Alpha-Tocopherol, als am biologisch aktivsten von den weiteren 7 Isomeren (z.B. gamma-Tocopherol), inhibiert als kettenbrechendes Antioxidant die Kettenreaktion. Des Weiteren reagieren Tocopherole mit Singulett Sauerstoff und schützen damit ebenfalls Membrane vor Oxidation.

Vitamin E ist als Ernährungssupplement schon lange bekannt (Halliwell 1999). Die Supplementation im Rahmen der parenteralen Ernährung bei Frühgeborenen ist bereits lange standardisiert und orientiert sich primär an der Energiezufuhr um ein optimales Wachstum der Kinder zu erzielen.

In der Cochrane Metaanalyse von Brion et al. 2003 wird beschrieben, dass bei Frühgeborenen unter der 37. SSW und Geburtsgewicht <2500g bei Supplementation von Vitamin E das Risiko einer ICH I° signifikant sinkt, ebenso sinkt das Risiko einer Retinopathie bei VLBW.

Dagegen birgt die Supplementation von Tocopherolen in beiden Gruppen das Risiko einer Sepsis.

Bei hochdosierter intravenöser Gabe oder bei Tocopherolspiegeln im Serum von >3,5mg/dl steigt das Risiko einer Sepsis und einer ICH I° an.

Daher gibt es bis dato keine Empfehlung einer hochdosierten Supplementation.

4.2.2.4 Coenzym Q10

Coenzym Q10 ist ein komplexes Coenzym, das ubiquitär bei Tier und Mensch vorkommt.

Coenzym Q10 (Ubichinone) spielt eine wichtige Rolle in der mitochondrialen Elektronentransportkette der Atmungskette (Kroger et al. 1973, Mitchell et al. 1991).

Neben den Mitochondrien kommt Coenzym Q10 auch intraplasmatisch und zellmembranständig vor.

In vitro ist es in reduzierter Form (Ubichinol) über eine Redoxfunktion in der Lage, freie Sauerstoffradikale zu binden und damit eine Lipidperoxidation im Plasma, in plasmatischen Low Density-Lipoproteinen und biologischen Membranen zu vermeiden (Ernster et al. 1993). Des Weiteren kann Ubichinol oxidiertes alpha-Tocopherol reduzieren.

Da die antioxidative Potenz des Ubichinols im Sinne eines Abfangens freier Radikale nur 1/10 der antioxidativen Potenz des alpha-Tocopherol beträgt, ist die hauptsächliche antioxidative Funktion im Recyclen des Vitamin E zu sehen (Halliwell 1999).

Die genaue antioxidative Wirkung von Coenzym Q10 in vivo ist noch nicht ganz klar.

Yamashita et al. postulierten 1997 dass der Quotient aus reduziertem zu oxidiertem Coenzym Q10 im Plasma als ein Indikator für das Ausmaß oxidativen Stresses im menschlichen Organismus gesehen werden könnte.

Hara et al. zeigte in einer Studie an asphyktischen Neugeborenen, dass diese einen signifikant höhere Ratio an oxidiertem Coenzym Q10 zur Gesamtmenge an Coenzym Q10 aufwiesen, als eine gesunde Kontrollgruppe.

Coenzym Q10- Spiegel im Plasma steigen postnatal durch diätetische Zufuhr, sowie durch Biosynthese.

In unserer Studie konnten wir in allen Kollektiven im Gruppenvergleich einen signifikanten Anstieg des Coenzym Q10 ab dem 7. Lebenstag verzeichnen.

Dabei lagen die hier gemessenen Coenzym Q10-Konzentrationen während der gesamten ersten Lebenswoche deutlich unterhalb der veröffentlichten Coenzym Q10-Werte für Erwachsene (Sun et al. 1992). In der Arbeit von Boda et al. 1998 wurde die Q10-Konzentration im Plasma bei 11 reifen, gesunden Neugeborenen gemessen. Wenn wir diese Ergebnisse als Grundlage nehmen, erhielten wir in unseren Messungen vergleichsweise niedrige Coenzym Q10-Konzentrationen.

Des Weiteren zeigte sich an den unterschiedlichen Lebenstagen eine negative Korrelation des NTISS-Scores zu Coenzym Q10.

Dies stützt die These, dass Coenzym Q10 in Neugeborenen eine antioxidative Funktion hat, und Coenzym Q10 als Antioxidans im Plasma bei schlechtem klinischem Zustand des Neugeborenen im Rahmen des gesteigerten oxidativen Stresses durch z.B. Inflammation vermindert ist.

Compagnoni et al. demonstrierten 2004 höhere Coenzym Q10-Spiegel in Neugeborenen, die spontan oder per Sectio in Spinalanästhesie geboren wurden im Unterschied zur Sectio in Intubationsnarkose.

Leider waren die Indikationen für den entsprechenden Geburtsmodus nicht ersichtlich.

Einer Sectio in Intubationsnarkose geht klinisch gesehen gehäuft fetaler Distress und Geburtskomplikationen voraus. Im Falle einer hypoxischen Situation für das Neugeborene wäre ein reduziertes Vorkommen von Ubichinol bei Sectio in Intubationsnarkose möglicherweise ebenfalls durch gesteigerten oxidativen Stress zu erklären.

4.2.2.5 Coeruloplasmin

In dieser Studie ließ sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Coeruloplasminspiegel der Patienten und dem SNAP- oder NTISS-Score darstellen.

Die von uns gemessenen Coeruloplasminkonzentrationen entsprechen den in der Literatur beschriebenen Daten (Lackmann et al. 1998).

Im Gruppenvergleich kam es in der Gruppe 1.-3. Lebenstag zu einem signifikanten Anstieg des Coeruloplasmins vom ersten auf den 3. Lebenstag.

Dies ließ sich in der Gruppe 1.-7. Lebenstag reproduzieren, des Weiteren zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Coeruloplasmins vom ersten zum 7. Lebenstag.

In der Gruppe 1.-14. Lebenstag zeigte sich ein weiterer signifikanter Anstieg des Coeruloplasmins vom 7. auf den 14. Lebenstag.

Coeruloplasmin ist eine Akut-Phase Protein, das in der Leber gebildet wird. Es verfügt über eine Ferroxidaseaktivität und ist in der Lage prooxidatives Eisen in Form von Fe(II) zu Fe (III) zu oxidieren und damit eine Bindung an Transferrin zu ermöglichen (Lackmann et al. 1996).

Bei Frühgeborenen sind signifikant niedrigere Coeruloplasminspiegel, sowie eine reduzierte Feroxidaseaktivität mit steigendem nicht proteingebundenem Eisen beschrieben (Evans et al. 1992, Silvers 1998 et al., Hirano et al. 2001, Galinier et al. 2005), sowie insgesamt niedrige Spiegel im Vergleich zu gesunden Erwachsenen (Lindeman et al., Houdkamp et al. 1992, Pittkänen et al. 1992).

Der Coeruloplasminspiegel beim Frühgeborenen steigt postnatal an, unterliegt jedoch möglicherweise einer großen Variabilität, da Coeruloplasmin als Akut-Phase-Protein im Rahmen akuter Inflammation, z.B. neonataler Sepsis vermehrt gebildet wird. Dies führt zu einer erhöhten antioxidativen Abwehr bei inflammatorischen Prozessen.

Dies ließ sich im Rahmen der klinischen Scores nicht abbilden.

4.2.2.6 Radikalresistenz der Erythrozyten

In dieser Studie konnten wir keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Radikalresistenz der Erythrozyten und den klinischen Scores NTISS und SNAP dokumentieren.

Im Gruppenvergleich zeigte sich jedoch eine ausgeprägte Steigerung der Radikalresistenz der Erythrozyten vom ersten auf den 7. und 14. Lebenstag, sowie vom 3. auf den 7. und 14. Lebenstag.

Zwischen dem 7. und dem 14. Lebenstag ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Radikalresistenz nachweisen.

Dieses Phänomen erklären wir durch die im Rahmen der standardisierten parenteralen Ernährung begonnene Supplementation von Vitamin E, hier vornehmlich gamma-Tocopherol, aber auch alpha Tocopherol durch die Infusion von Intralipid ab dem 4./5. Lebenstag.

Wie bereits in 4.2.2.3 abgehandelt verhindern Tocopherole als lipophiles Antioxidans die Oxidation von freien Fettsäuren z.B. in Zellmembranen von Erythrozyten, was eine gesteigerte Resistenz der Zellen auf oxidativ schädigende Einwirkung zur Folge haben könnte.

Ob dies in einer verstärkten Oxidation freier Fettsäuren begründet ist, im Rahmen gesteigerten oxidativen Stresses vorkommt oder an anderen Faktoren liegt, wie z.B. Proteinoxidation, ist bislang nicht geklärt (Boda et al. 1998).

Tatsächlich konnte Boda et al. 1998 in den ersten Lebenstagen eine gesteigerte Hämolyseresistenz bei Frühgeborenen im Vergleich zu reifen Neugeborenen feststellen. Eine derart vermindert erscheinende Vulnerabilität könnte mit einem vergleichsweise geringem Gehalt oxidierbarer Fettsäuren zusammenhängen (Wiedemann et al. 2003).

4.2.2.7 Malondialdehyd

Das Vorkommen des Malondialdehyds als plasmaständiger Marker der Lipidperoxidation zeigte in unserer Studie keinen signifikanten Zusammenhang mit dem im Rahmen des NITSS- und SNAP- Score erfassten klinischen Verlauf.

Die Bestimmung der MDA-Konzentrationen in dieser Arbeit ergibt eine starke Streuung innerhalb der ersten beiden Lebenswochen. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Lebenstagen.

Es gibt Hinweise in der Literatur in der erhöhte MDA-Konzentrationen am 7. Lebenstag sehr unreifer Frühgeborener mit einem schlechten Outcome in Form von Retinopathie oder CLD auftraten. Auch die Dauer der Sauerstofftherapie korrelierte mit hohen MDA-Konzentrationen (Inder et al. 1997).

Dies stützt eine Studie von Buonocore et al. 1998, der signifikant höhere MDA-Konzentrationen im Plasma Frühgeborener verglichen mit reifen Neugeborenen und bei intubierten verglichen mit nicht intubierten Neugeborenen nachweisen konnte.

4.2.3 NTBI und Transferrin

In der Literatur gibt es bereits mehrere Beschreibungen zum Vorkommen freien Eisens. Evans et al. 1992, sowie Lindeman et al. 1992 entdeckten das Vorkommen freien Eisens bei reifen Neugeborenen, die mehrheitlich Transferrinsättigungen von >50 bis zu 100% aufwiesen.

Lentjes et al. stellte 1995 fest, dass die Transferrinbindungskapazität bei Frühgeborenen variabel ist aufgrund einer unterschiedlichen Daltonzahl (76500-100.000 Da) und damit eine kalkulierte Transferrinsättigung oftmals die wirkliche Transferrinsättigung unterschätzt.

Yu et al. demonstrierten 2003 einen signifikanten Anstieg von NTBI bei asphyktischen Neugeborenen begleitet von einem signifikanten Anstieg der Transferrinsättigung und gesteigerter Lipidperoxidation als Resultat erhöhten oxidativen Stresses.

Transferrin, als eines der wichtigsten Bindungsmoleküle für Eisen ist zur Geburt physiologisch niedrig und bleibt es für die ersten 6 Lebenswochen (Lindeman et al. 2000).

Coeruloplasmin, das als Antioxidant in der Lage ist zweiwertiges Eisen (Fe II) ohne die Freisetzung von Sauerstoffradikalen zu dreiwertigem Eisen (Fe III) zu oxidieren und damit dem Redox-System zu entziehen, ist ebenfalls in den ersten 3 Lebenswochen niedrig und steigt erst ab der 3.-6. Lebenswoche (Lindeman et al. 2000).

Damit steht einem vermehrten Abbau fetaler Erythrozyten mit gesteigerter Freisetzung von Eisen in den Eisenpool, keine adäquate Adaptation entgegen, dieses Eisen dem schädigenden Redox-System zu entziehen.

4.2.4 NTBI und Bluttransfusionen

Neugeborene, jedoch besonders Frühgeborene entwickeln in den ersten Lebensmonaten eine Anämie. Der Grund hierfür ist eine insuffiziente Erythropoese bei gleichzeitig raschem Abbau der fetalen Erythrozyten. Bei den Frühgeborenen spielt das rasche Wachstum eine weitere Rolle und besonders, wie auch bei den kranken Neugeborenen, die iatrogenen Blutverluste.

Daher sind Bluttransfusionen gerade bei Frühgeborenen häufig notwendig um die Hämodynamik und die Sauerstoffversorgung zu verbessern.

Bluttransfusionen werden als Risikofaktor für die Entwicklung einer ROP (Dani et al. 2001, Hesse et al. 1997, Inder et al. 1997, Cooke et al. 1993) und CLD (Collard et al. 2005, Silvers et al. 1998, Cooke et al. 1997) bei Frühgeborenen diskutiert.

Mögliche Ursache wäre hierfür eine hohe Eisenbelastung mit konsekutivem Vorkommen freien Eisens und Induktion prooxidativer Mechanismen.

Gerber et al. konnte 1999 im Bronchialsekret beatmeter Frühgeborener mit RDS deutlich höhere Spiegel freien Eisens in der Gruppe der Kinder nachweisen, die eine CLD entwickelten.

Adulte Erythrozyten verfügen über weniger freie Fettsäuren, jedoch mehr zelluläre Antioxidantien als fetale Erythrozyten. Außerdem verfügen sie über eine niedrigere Sauerstoffbindungskurve und sie haben, als Bluttransfusion verabreicht, eine deutlich erniedrigte Halbwertszeit (Bard et al. 1997).

Die prooxidative Wirkung freien Eisens konnte jedoch in vivo bislang nicht eindeutig nachgewiesen werden (Dani et al. 2004).

4.2.5 NTBI und oxidativer Stress

Hirano konnte 2001 zeigen, dass es nach Transfusion von Erythrozyten zum Auftreten, bzw. Anstieg von freiem Eisen kam und parallel dazu der Coeruloplasminspiegel und die Ferroxidaseaktivität signifikant abnahmen. Ebenso das Vitamin C, das oxidiertes Vitamin E wieder reduziert.

Es kommt somit zu einer Schwächung der plasmatischen oxidativen Abwehr mit dem Auftreten freien Eisens.

Dani et al. konnten 2003 in einer Studie ebenfalls ein Auftreten bzw. einen signifikanten Anstieg von NTBI nach Bluttransfusion beschreiben, jedoch konnten sie mit ihren Methoden keine Substratoxidation oder erniedrigte Antioxidationspiegel feststellen.

Cooke et al. konnte 1997 zwar einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Transfusionenanzahl und dem Auftreten einer CLD finden, das Auftreten von freiem Eisen zeigte jedoch keine Bezug zu den parallel bestimmten TBARS und somit keinen nachweisbaren Zusammenhang zwischen dem Auftreten freien Eisens und oxidativen Stresses.

In unserer Pilotstudie zum Vorkommen freien niedermolekularen Eisens bei Frühgeborenen und kranken Neugeborenen fanden wir bei der Mehrzahl der untersuchten Patienten freies Eisen im Plasma.

Aufgrund der Inhomogenität des Kollektives ließ sich kein Bezug zur Ernährungsform, des Gestationsalters oder zur Anzahl der erhaltenen Bluttransfusionen während des stationären Aufenthaltes finden.

Es fiel jedoch auf, dass bei der zeitgleichen Bestimmung der pro-/antioxidativen Situation der Patienten, das Vorkommen freien Eisens mit einem signifikant erhöhten MDA-Spiegel einherging, als Zeichen eines gesteigerten oxidativen Stresses im Sinne einer gesteigerten Lipidperoxidation.

Des Weiteren zeigten die Patienten mit nachweislich freiem Eisen eine verminderte Radikalresistenz der Erythrozyten im Hämolysetest, was ebenfalls als Zeichen eines gesteigerten oxidativen Stresses gedeutet werden kann.

Wir haben mit dem Pilotprojekt einen möglichen Zusammenhang zwischen freiem Eisen und einer reduzierten antioxidativen Abwehrlage darstellen können.

Ob das freie Eisen primär für den antioxidativen Stress verantwortlich ist oder ob das Auftreten freien Eisens ein Resultat oxidativen Stresses ist und als möglicher Indikator für oxidativen Stress fungieren kann, ist bislang unklar und bedarf weiterer prospektiven Studien.

Superoxid als eines der reaktiven Sauerstoffspezies ist z.B. in der Lage Eisen aus dem fest gebundenen Ferritinkomplex zu lösen.

Buoncore et al. postulierten 2003 freies Eisen im Plasma als vorhersagefähigen Marker für das neurologische Outcome bei asphyktischen Neugeborenen.

Die angeführten Studien haben eindeutige Hinweise gezeigt, dass eine Eisenüberladung mit dem Auftreten freien Eisens einhergeht.

Die Eisenhomöostase gilt nach wie vor als komplex und nicht ausreichend verstanden. Besonders Neonaten sind offensichtlich nicht in der Lage die Aufnahme aus dem Intestinaltrakt entsprechend ihres Bedarfes zu regulieren.

Dies gilt sowohl für die Eisenüberladung mit der Gefahr des durch freies Eisen katalysierten Stresses und konsekutiv erhöhter Gefahr für bakterielle Infektionen, als auch für das Eisendefizit mit entsprechend neurologischen Entwicklungsdefiziten, das durch eine Supplementation zu einem späteren Zeitpunkt nicht ausgeglichen werden kann (Collard 2009).

Die bislang genutzten Messverfahren zur Einschätzung der Eisenhomöostase sind defizitär und störanfällig, z.B. durch Infektion und Inflammation (Kaltwasser 1996).

Fayez et al. postulierten 1996 eine mögliche antioxidative Wirkung des Erythropoietins in frühgeborenen Ratten mit der Vorstellung Erythropoietin mobilisiere das vorhandene freie Eisen aus dem Plasma und reduziere damit den oxidativen Schaden.

Aus unserer Arbeitsgruppe gibt es Daten, in denen in einem Kollektiv Frühgeborener unter Therapie mit Erythropoitin kein freies Eisen nachzuweisen war (Finckh et al. 2000).

Ähnliche Ergebnisse sind in weiteren Arbeiten beschrieben (Friel et al. 2005, Fujiu et al. 2004)

4.3 Ausblick

A. Zur Zeit gibt es keine einheitliche Empfehlung wie mit der Problematik der Frühgeborenenanämie umzugehen ist. Die therapeutische Bandbreite liegt zwischen der frühen Erythropoitinsupplementation bis hin zum kompletten Verzicht auf Erythropoitin und dafür Einsatz einer hoch dosierten oralen Eisentherapie.

Kürzel et al. untersuchte 2006 anhand 83 Frühgeborener unter Erythropoitintherapie das Vorkommen freien nicht Transferrin-gebundenen Eisens, sowie weitere Parameter des Eisenmetabolismus. Hier zeigte sich, dass sich unter der Therapie die Eisenspeicher leerten und zu keinem Zeitpunkt freies nicht-Transferrin-gebundenes Eisen auftrat, obwohl eine Eisensupplementation von bis zu 8mg/kg Körpergewicht/ Tag erfolgte.

In Anbetracht der vorhandenen Literatur ließe sich eine antioxidative Therapie durch die Erythropoitinsupplementation diskutieren.

B. Im ersten Teil der Studie haben wir versucht mit der Erhebung der NTISS und SNAP-Scores eine objektive Beurteilung des klinischen Zustandes des Patienten zu erhalten und einen direkten Zusammenhang zwischen der Klinik und der zu diesem Zeitpunkt antioxidativen Abwehrmöglichkeit, bzw. antioxidative Schädigung nachzuweisen.

Hierbei konnte für viele der Antioxidantien eine negative Korrelation zur klinischen Stabilität des Probanden gefunden werden.

Dies gibt einen wichtigen Hinweis in den momentanen klinischen Verlauf der Schwere der Erkrankung und dem möglichen Ausmaß an oxidativem Stress.

Sollten die gefundenen Hinweise über einen direkten Zusammenhang zwischen Klinik und antioxidativer Abwehrkapazität in weiteren Studien verifiziert werden können, könnte dies einen neuen Aspekt in der bestehenden Diskussion um Vor- und Nachteile einer antioxidativen Therapie von Frühgeborenen darstellen (Jankov 2001, Brion 2003, Saugstad 2005).

Bisher angewandte Methoden, die möglicherweise oxidativen Stress im Früh- und Neugeborenen reduzieren sind:

1. Verhaltendes Vorgehen bei der Sauerstoffgabe
2. Erstversorgung asphyktischer Neugeborener mit Raumluft (Gitto et al. 2009)
3. früher enteraler Nahrungsaufbau oder Vitamin E-Supplementation z.B. in Form von Intralipid bei parenteraler Ernährung (Glebremeskel et al. 1999)
4. Therapie mit Erythropoitin nach standardisiertem Protokoll (Kürzel et al. 2006)

Vor einer unkritischen Therapie mit Antioxidantien wird gewarnt (Saugstad 2005, Jankov 2001) und dem schließen wir uns an, da dies ernsthafte und noch immer nicht vorhersehbare Folgen für das Wachstum und die Entwicklung der Kinder haben kann.

5 Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit habe ich den klinischen Zustand schwerkranker Frühgeborener mit unterschiedlichen Krankheiten mittels der publizierten Scoringssysteme NTISS (Neonatal Therapeutic Intervention Scoring System) und SNAP (Score for Neonatal Acute Physiology) objektiv und quantitativ zu beschreiben versucht. Die Brauchbarkeit dieser Methoden zeigte sich dadurch, dass die Resultate des Scorings signifikant mit Reife und Geburtsgewicht korrelierten. Zum selben Zeitpunkt wie bei der Erhebung der klinischen Scores wurden Mikroblutproben auf zahlreiche Parameter des antioxidativen Status untersucht. Dabei zeigte sich eine negative Korrelation zwischen einigen als antioxidative Schutzstoffe geltenden Metaboliten (Bilirubin, Coenzym Q10, Coeruloplasmin und Vitamin E) und der klinischen Stabilität.

Im zweiten Teil der Arbeit habe ich, in Erweiterung der Mikroblutanalysen, bei reifen und unreifen Neugeborenen das Vorkommen von freiem, nicht-Transferrin-gebundenem Eisen (NTBI) im Blut untersucht, das als toxisch gilt und bei gesunden Erwachsenen praktisch nicht vorkommt. Dabei war bei einer überraschend hohen Zahl reifer Neugeborener und ehemaliger Frühgeborener freies Eisen nachweisbar. In denselben Blutproben fand ich signifikant erhöhte Konzentrationen von Malondialdehyd (MDA) und eine verminderte Radikalresistenz der Erythrozyten als Ausdruck von gesteigertem oxidativen Stress bei diesen Kindern.

Meine Ergebnisse stützen die Vorstellung, dass bei Unreife und niedrigem Geburtsgewicht die Vulnerabilität gegenüber oxidativem Stress (und damit wahrscheinlich auch inflammatorischen Prozessen) gesteigert ist. Sie zeigen außerdem, dass selbst bei klinisch gesunden reifen und unreifen Neugeborenen aufgrund des häufigen Nachweises von freiem Eisen und erhöhten Markerstoffen für oxidativen Stress, eine entsprechende Vulnerabilität anzunehmen ist. Die Ergebnisse mahnen zur Vorsicht bei Eisengaben zur Behandlung der Frühgeborenenanämie. Das Zusammenspiel pro- und antioxidativer Stoffe bei Neugeborenen ist immer noch zu komplex und in mancher Hinsicht zu unüberschaubar, um entsprechend wirksame Substanzen ohne sorgfältige Studien therapeutisch einzusetzen.

6 Literaturverzeichnis

- (1) **Aruoma OI, Bomford A, Polson RJ, Halliwell B** (1988) Non-transferrin-bound iron in plasma from hemochromatosis patients: Effect of phlebotomy therapy. *Blood*; 88: 3608-3614.
- (2) **Auhuber A** (2005) Prooxidatives/antioxidatives Gleichgewicht und klinischer Status bei kranken Frühgeborenen: Vergleich biochemischer Parameter in Mikroblutproben und quantifizierter Befunde in den ersten Lebenstagen. Medizinische Dissertation. Universität Hamburg.
- (3) **American Academy of Pediatrics** (1995) Management of hyperbilirubinemia in the healthy term newborn *Pediatrics*; 95: 458.
- (4) **Bany-Mohammed FM, Slivka S, Hallman M** (1996) Recombinant Human Erythropoitin: Possible Role as an Antioxidant in Premature Rabbits. *Pediatr Res*; 40 (3): 381-387.
- (5) **Bard H, Widness JA** (1997) The life span of erythrocytes transfused to preterm infants. *Pediatr Res*; 42: 9-11.
- (6) **Berger HM, Mumby S, Gutteridge JMC** (1995) Ferrous ions detected in iron-overloaded cord blood plasma from preterm and term babies: implications for oxidative stress. *Free Rad Res*; 22 (6): 555-559.
- (7) **Boda V, Finckh B, Dürken M, Commentz J, Hellwege H-H, Kohlschütter A** (1998) Monitoring erythrocyte free radical resistance in neonatal blood microsamples using a peroxyl radical-mediated hemolysis test. *Scand J Clin Lab Invest*; 58: 317-322.
- (8) **Boda V, Finckh B, Commentz J, Hellwege H, Kohlschütter A** (1994) AAPH-Hämolysetest aus Kappilarblutproben: Ein Instrument zum Studium radikalgefährdeter Frühgeborener. 20. Symposium Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin Graz 1994. München, ISBN 3-924057-75-3:232-234.
- (9) **Brion LP, Bell EF, Raghuveer TS** (2003) Vitamin E supplementation for prevention of morbidity and mortality in preterm infants *Cochrane Database Syst Rev* (3): CD003665.
- (10) **Buoncore G, Zani S, Perrone S, Caciotti B, Bracci R** (1998) Intraerythrocyte nonprotein-bound iron and plasma malondialdehyd in the hypoxic newborn. *Free Radical Biology & Medicine*; 25 (7): 766-770.
- (11) **Buoncore G, Perrone S, Longini M, Paffetti P, Vezzosi P, Gatti MG, Bracci R** (2003) Non protein bound iron as early predictive marker of neonatal brain damage. *Brain*; 126 (5): 1224-1230.

- (12) **Cammack R, Weinert JH** (1990) Electron paramagnetic resonance spectroscopic characterization of dimethyl sulfoxide reductase of *Escherichia coli*. *Biochemistry*; 29 (36): 8410-6.
- (13) **Cheeseman KH, Slater TF** (1993) An introduction to free radical Biochemistry. *Br Med Bull*; 49 (3): 481-493.
- (14) **Clyman RI, Saugstad OD, Mauray F** (1989) Reactive oxygen metabolites relax the lamb ductus arteriosus by stimulating prostaglandin production. *Circ Res*; 64: 1-8.
- (15) **Collard KJ, Godeck S, Holley JE** (2005) Blood transfusion and pulmonary lipid peroxidation in ventilated premature babies. *Pediatr Pulmonol*.39 (3):257-261.
- (16) **Collard KJ** (2009) Iron Homeostasis in the Neonate. *Pediatrics* 123; 1208-1216
- (17) **Cooke RWI, Clark D, Nickey-Dwyer M** (1993) The apparent role of blood transfusion in the development of retinopathy of prematurity. *Eur J Pediatr*; 152: 833-6.
- (18) **Cooke RWI, Drury RA, Yoxall CW, James C** (1997) Blood transfusion and chronic lung disease in preterm infants. *Eur J Pediatr*; 156: 47-50.
- (19) **Compagnoni G, Lista G, Giuffre B, Mosca F, Marini A** (2004) Coenzym Q10 Levels in Maternal Plasma and Cord Blood: Correlations with Mode of Delivery. *Biol Neonate*; 86: 104-107.
- (20) **Dani C, Reali MF, Bertini G** (2001) The role of blood transfusions and iron intake on retinopathy of the prematurity. *Early Hum Dev*; 62: 57-63.
- (21) **Dani C, Martelli E, Bertini G, Buoncore G, Rubaltelli FF** (2003) Effects of blood transfusions on oxidative stress in preterm infants. *Ach Dis Child Fetal Neonatal Ed*; 89: F 408-411.
- (22) **Dani C, Martelli E, Bertini G, Pezzali M, Rosetti M, Buoncore G, Paffetti P, Rubaltelli FF** (2004) Effect of blood transfusions on oxidative stress in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.*, Sept. 89; (5): F 408-411.
- (23) **Dani C, Masini E, Buonocore G, Rubaltelli F** (2004) Role of Heme Oxygenase and Bilirubin in Oxidative Stress in Preterm Infants. *Pediatr Res*; 56: 873-877.
- (24) **Ernster L, Forsmar-Andree P** (1993) Ubiquinol: An endogenous antioxidant in aerobic organism. *Clin Investig*; 71: 60-65.
- (25) **Evans HE, Rosenfeld W, Jhaveri R, Concepcion L, Zabaleta I** (1986) Oxidant-mediated lung disease in newborn infants. *J Radic Biol Med*; 2: 369-372.
- (26) **Evans PJ, Evans R, Kovar IZ, Holton AF, Halliwell B** (1992) Bleomycin detectable iron in the plasma of premature and full-term neonates. *FEBS-Lett*; 303 (2,3): 210-212.

- (27) **Finckh B, Kontush A, Commentz J, Hübner C, Burdelski M, Kohlschütter A** (1995) Monitoring of ubiquinol-10, ubiquinone-10, carotenoids and tocopherols in neonatal plasma microsamples using HPLC with colorimetric electrochemical detection. *Anal Biochem*; 232: 210-216.
- (28) **Finckh B, Daniel K, Fischer R, Schemmel B, Kohlschütter A, Hellwege HH** (2000) Non-transferrin-bound iron in plasma of premature infants treated with erythropoietin and iron. *Pediatr Crit Care Med*; 1: 83 (Poster) 3rd World Congress of on Pediatric Intensive Care, Montreal, Canada.
- (29) **Frank L, Sosenko IRS** (1991) Failure of premature rabbits to increase antioxidant enzymes during hyperoxic exposure: Increased susceptibility to pulmonary oxygen toxicity compared with term rabbits. *Pediatric Res*; 29 (3): 292-296.
- (30) **Friel JK, Aziz K, Andrews WL, Serfass RE** (2005) Iron absorption and oxidative stress during erythropoietin therapy in very low birth weight premature infants: a cohort study. *BMC Pediatr*. 5:29.
- (31) **Fujiu T, Maruyama K, Koizumi T** (2004) Oral iron supplementation in preterm infants treated with erythropoietin. *Pediatr Int*.46 (6): 635-639.
- (32) **Fukunaga K, Suzuki T, Takama K** (1993) Highly sensitive high-performance liquid chromatography for the measurement of malondialdehyde in biological samples. *Journal of Chromatography*; 621: 77-81.
- (33) **Gerber CE, Bruchelt G, Stegmann H, Schweinsberg F, Speer CP** (1999) Presence of bleomycin detectable free Iron in the Alveolar System of Preterm Infants. *BBRC*; 257: 218-222.
- (34) **Ghebremeskel K, Burns L, Coeteloe K, Burden TJ, Harbig L, Thomas B, Temple E** (1999) Plasma Vitamin A and E in preterm babies fed on Breast milk of formula milk with or without long-chain fatty acids. *Internat J Vit Nutr Res*; 69 (2): 83-91.
- (35) **Gitto E, Pellegino S, D'Arrigo S, Baberi I, Reiter RJ** (2009) Oxidative stress in resuscitation and in ventilation of newborns *Eur Respir J* 34:1461-1469.
- (36) **Gosriwatana I, Loreal O, Lu S, Porter J, Hider RS** (1999) Quantification of non-transferrin-bound iron in the presence of unsaturated transferrin. *Anal Biochem*. Sep.10; 273 (2): 212-220.
- (37) **Groneck P, Gotze-Speer B, Oppermann M, Eiffert H, Speer CP** (1994) Association of pulmonary inflammation and increased microvascular permeability during development of BPD: a sequential analysis of inflammatory mediators in respiratory fluids of high risk preterm neonates. *Pediatrics*; 93(5): 712-718.

- (38) **Grojean S, Koziel V, Vert P, Daval J-L** (2000) Bilirubin induces apoptosis via NMDA receptors in developing rat brain neurons. *Exp Neurol*; 166: 334-341.
- (39) **Gutteridge JM, Stocks J** (1981) Caeruloplasmin: physiological and pathological perspectives. *Crit Rev Clin Lab-Sci*; 14 (4): 257-329.
- (40) **Gutteridge JMC, Rowley DA, Halliwell B** (1981) Superoxide-dependend formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts. Detection of “free” iron in biological systems by using bleomycin-dependend degradation of DNA. *Biochem J*; 199: 263-265.
- (41) **Halliwell B, Gutteridge JMC** (1990) Role of free radicals ad catalytic metal ions in human disease: An overview. *Meth Enzymol*; 186: 1-85.
- (42) **Halliwell B, Gutteridge JMC** (1999) Free radicals in biology and medicine, 3rd Edition, Oxford University Press.
- (43) **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 (12): 2551-2553.
- (44) **Hara K, Yamashita S, Fujisawa A, Yamamoto Y** (1999) Oxidative Stress in newbron with and without asphyxia as measured by plasma antioxidants and free fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun*; 257: 244-248.
- (45) **Henle ES, Stuart L** (1997) Formation, prevention and repair of DANN damage by iron/ hydrogen peroxide. *J Biol Chem*; 272: 19095-19098.
- (46) **Hentze MW, Kuhn LC** (1996) Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxid and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93: 8175-8182.
- (47) **Hirano K, Mornobu T, Kim H** (2001) Blood transfusions increases radical promoting non-transferrin-bound iron in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*; 84: F 188-193.
- (48) **Hesse L, Eberl W, Schlaud M, Poets CF** (1997) Blood transfusion. Iron load and retinopathy of prematurity. *Eur J Pediatr*; 156: 465-470.
- (49) **Hidalgo FJ, Zamora R, Dillard CJ Tappel AL** (1990) Can serum bilirubin be an index of in vivo oxidative stress? *MedHypotheses*; 33 (3): 207-211.
- (50) **Hilderbrand DC, Fahim Z, James E, Fahim M** (1974) Coeruloplasmin and alkaline phosphatase levels in cord serum of term, preterm and physiologically jaundiced neonates. *Am J Obstet Gynecol*; 118: 950-954.
- (51) **Hershko C, Graham G, Bates GW, Rachmilewitz EA** (1978) Non-specific serum iron in idiopathic hemochromatosis: an abnormal serum iron fraction of potential toxicity. *Br J Haematol*; 40: 225-263.

- (52) **Hübner C, Linder SG, Stern M, Clausen M, Kohlschütter A** (1988) Membrane fluidity and lipid composition of rat small intestinal brush border membranes during postnatal maturation. *Biochem Biophys Acta*; 939: 145-150.
- (53) **HynesRL, Folkerth RD, Keefe RJ, Sung I, Swzeda LI, Rosenberg PA, Volpe JJ, Kinney HC** (2003) Nitrosaktive and oxidative injury to premyelinating oligodendrocytes in periventricular leukomalazia. *J Neuropath Exp Neurol*; 62: 441-450.
- (54) **Inder TE, Clemett RS, Austin NC** (1997) High iron status in low birth weight infants is associated with an increased risk of retinopathy of prematurity. *J Pediatr*; 131: 541-544.
- (55) **Jain SK, Wise R** (1995) Relationship between elevated lipid peroxides, vitamin E deficiency and hypotension in preeclampsia. *Mol Cell Biochem* 1995; 151: 33-38.
- (56) **Jankov P, Negus A, Tanswell AK** (2001) Antioxidants as therapy in the newborn: some words of caution *Pediatr Res*; 50: 681-687.
- (57) **Kaltwasser JP, Gottschalk R** (1999) Erythropoietin and iron. *Kidney International*; 55 (69): 49-56.
- (58) **Kelly MJ** (1990) The pharmacology of Vitamin E. *Prog-Med-Chem* ; 25: 249-90.
- (59) **Kling PJ, Sullivan TM, Leftwich ME, Roe DJ** (1997) Score for neonatal acute physiology and Phlebotomy blood loss predict erythrocyte transfusion in premature infants. *Arch Pediatr Adolesc. Med* 1997; 151: 27-31.
- (60) **Kohlschütter A, Agbenu J** (1995) Antioxidantienstatus in Kapillarblutproben: ein Instrument zum Studium radikal-gefährdeter Frühgeborener. *Oxidativer Stress in der Kinderheilkunde*. H. Böhles. Berlin, Springer; 45-55.
- (61) **Kiely M, Morrissey PA, Cogan PF, Kearney PJ** (1999) Low molecular weight plasma antioxidants and lipid peroxidation in maternal and cord blood. *Eur J Clin Nutr*; 53: 861-864.
- (62) **Kim S** (2001) Nicht –Transferrin-gebundenes Eisen und Parameter oxidativen Stresses während der Chemotherapie bei Kindern mit Akuter Lymphatischer Leukämie. *Medizinische Dissertation*. Universität Hamburg.
- (63) **Kürzel D** (2006) Behandlung der Frühgeborenenanämie mit rh-Erythropoitin und hochdosierter Eisensubstitution unter klinischer Prüfung der Entstehung von toxischem, freien Eisen im Plasma. *Medizinische Dissertation*. Universität Hamburg.
- (64) **Lackmann GM, Hesse L, Töllner U** (1996) Reduced iron-associated antioxidants in premature newborns suffering intracerebral hemorrhage. *Free Radic Biol Med*; 20 (3): 407-409.

- (65) **Lackmann GM, Schnieder C, Bohner J** (1998) Gestational age-depend reference values for iron and selected proteins of iron metabolism in serum of premature human neonates. *Biol Neonate*; 74: 208-213.
- (66) **Lentjes EGWM, Lindeman JHN, van de Bent W, Berger HM** (1995) Measured versus calculated latent iron binding capacity in plasma of newborns. *Ann Clin Biochem* 32:95/174/1-95/174/4.
- (67) **Lindeman JHN, van Zoeren-Grobbe D, Schrijver J, Speek AJ, Poorthuis BJHM, Berger HM** (1989) The total free radical trapping ability of cord blood plasma in preterm and term babies. *Pediatr Res*; 26: 20-24.
- (68) **Lindeman JHN, Lentjes EGWM, E Houdkamp, van Zoeren-Grobbe D, Schrijver J, Berger HM** (1992) Effect of exchange transfusion on Plasma Antioxidants in the Newborn. *Pediatrics* 90 (2): 200-203.
- (69) **Lindeman JHN, Lentjes EG, van Zoeren-Grobbe D, Berger HM** (2000) Postnatal Changes in Plasma Ceruloplasmin and Transferrin Antioxidant Activities in Preterm Babies. *Biol Neonate*; 78: 73-76.
- (70) **Lozoff B, Jimenez E, Hagen J, Mollen E, Wolf AW** (2000) Poorer Behavioral and developmental outcome more than 10 years after treatment for iron deficiency in infancy. *Pediatrics*; 105: E 51.
- (71) **Lucesoli F, Caliuri M, Roberti MF, Perazzo JC, Fraga CG** (1999) Dose-dependent increase of oxidative damage in the testes of rats subjected to acute iron overload. *Arch Biochem Biophys*; 372: 37-43.
- (72) **Luukainen P, Aejmelaeus R, Alho H, Metsä-Ketelä T, Ikonen SR, Salo MK** (1998) Plasma chain-breaking antioxidants in preterm infants with good and poor short-term outcome. *Free Radic Res*; 30 (3): 189-197.
- (73) **Maiya PP, Nagashree S, Shaik MS** (2001) Role of score for neonatal acute physiology (SNAP) in predicting neonatal mortality. *Indian J Pediatr*; 68 (9): 829-34.
- (74) **Mc Cord JM** (1998) Iron, Free Radicals and Oxidative Injury Seminars in Hematology; 35 (1): 5-12.
- (75) **Meadow W, Frain L, Ren Y, Lee G, Soneji S, Lantos J** (2002) Serial assessment of mortality in the neonatal intensive care unit by algorithm and intuition: certainty, uncertainty and informed consent. *Pediatrics*; 109: 878-886.
- (76) **Moison RMW, van Hoof EJHA, Clahsen PC, van Zoeren-Grobbe D, Berger HM** (1996) Influence of plasma preparations and donor red blood cells on the antioxidant capacity of blood from newborn babies. *Acta Paediatr*; 85: 220-224.

- (77) **Naidoo R, Knapp ML** (1992) Studies of lipid peroxidation products in cerebrospinal fluid and serum in multiple sclerosis and other conditions. *Clin Chem*; 38: 2449-2454.
- (78) **Neuzil J, Stocker R** (1993) Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Lett*; 331 (3): 281-284 .
- (79) **Niki E, Komuru E, Takahashi M, Urano S, Ito E, Terao K** (1988) Oxidative hemolysis of erythrocytes and its inhibition by free radical scavengers. *J Biol Chem*; 263 (36): 19809-19814.
- (80) **Ogihara T, Kitagawa M, Miki, M, Tamai H, Yasuda H, Okamoto R, Mino M** (1991) Suceptibility of neonatal lipoproteins to oxidative stress. *Pediatr Res*; 37: 219-226.
- (81) **Oh W, Tyson JE, Fanaroff AA, Vohr BR, Perritt R, Stoll BJ, Ehrenkranz RA, Carlo WA, Shankaran S, Poole K, Wright LL** (2003) Association between peak serum bilirubin and neurodevelopmental outcomes in extremely low birth weight infants. *Pediatrics*; 112: 733-779.
- (82) **Oski FA** (1992): Iron deficiency in infancy and childhood. *N Engl J Med*; 329: 190-193.
- (83) **Ostrea EM, Balun JE, Winkler R, Porter T** (1986) Influence of breast-feeding on the restoration of the low serum concentration of vitamin E and β -carotene in the newborn infant. *Am J Obstet Gynecol*; 154: 1014-17.
- (84) **Palta M, Gabbert D, Weinstein MR, Peters ME** (1991) Multivariate assesment of traditional risk factors for chronic lung disease in very low birth weight neonates. The newborn lung project. *J Pediatr*; 199 (2): 285-92.
- (85) **Petridou E, Richardson DK, Dessypris N, Trichopoulos D** (1998) Outcomeprediction in Greek Neonatal Intensive Care Units Using a Score for Neonatal Acute Physiology (SNAP) *Pediatrics*; 101 (6): 1037-1044.
- (86) **Polin, Fox, Abman** (2004) *Fetal and Neonatal Physiology* 3rd Edition, Elsevier
- (87) **Ponka P** (1999) Cellular iron metabolism *Kidney-Int-Suppl*; 69: 2-11.
- (88) **Ponka P, Beaumont C, Richardson DR** (1998) Function and regulation of transferring and ferritin. *Semin-Hematol*; 35 (1): 35-54.
- (89) **Ponka P** (1997) Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanism in erythroid cells. *Blood*; 89 (1): 1-25.
- (90) **Pittkänen OM** (1992) Peroxidation of lipid emulsions: A hazard fort he premature infant receiving parenteral nutrition? *Free Radic Biol Med*; 13: 239-245.

- (91) **Ripalda MJ, Rudolph N, Wong SL** (1989) Developmental patterns of antioxidant defense mechanisms in human erythrocytes. *Pediatr Res*; 26: 366-369.
- (92) **Rodrigues CMP, Sola S, Brites D** (2002) Bilirubin induces apoptosis via the mitochondrial pathway in developing rat brain neurons. *Hepatology*; 35: 1186-1195.
- (93) **Richardson DK, Gray JE, McCormick MC, Workman K, Goldman DA** (1993) Score for neonatal Acute Physiology: A Physiologic Severity Index for Neonatal Intensive Care Pediatrics; 91 (3): 617-623.
- (94) **Richardson DR, Ponka P** (1997) The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochem Biophys acta*; 1331: 1-40.
- (95) **Richardson DK, Gray JE, McCormick MC, Workman K, Goldmann DA** (1993) Score for Neonatal Acute Physiology: A Physiologic Severity Index for Neonatal Intensive Care. *Pediatrics*; 91 (3): 617-623.
- (96) **Saugstad OD** (1996) Mechanisms of tissue injury by oxygen radical: implications for neonatal disease. *Acta Paediatr*; 85: 1-4.
- (97) **Saugstad OD** (2001) Update on oxygen radical disease in neonatology. *Curr Opin Obstet Gynecol*; 13 (2): 147-153.
- (98) **Saugstad OD** (2003) Bronchopulmonary dysplasia-oxidative stress and antioxidants. *Semin Neonatol*; 8: 39-49.
- (99) **Saugstad OD** (2005) Oxidative Stress in the newborn-A 30-Year Perspective. *Biol Neonate*; 88: 228-236.
- (100) **Schmidt H, Grune T, Müller R, Siems WG, Wauer RR** (1996) Increased levels of lipid peroxidation products malondialdehyde and 4-hydroxynonenal after perinatal hypoxia. *Pediatr Res*; 40: 15-20.
- (101) **Silver KM, Gibson AT, Russell JM** (1998) Antioxidant activity, packed cell transfusions and outcome on premature infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*; F 214-219.
- (102) **Skikne B, Baynes RD** (1994) Iron Absorption. In: Halliday JW, Piipard MJ, Powell LW (ed) *Iron metabolism in health and disease*, 1st edn., W.B. Saunders Co., London.
- (103) **Slater TF, Cheeseman KH, Davies MJ, Proudfoot K, Xin W** (1987) Free radical mechanisms in relation to tissue injury. *Proc Nutr Soc*; 46: 1-12.
- (104) **Sullivan JL** (1988) Iron, plasma antioxidants and the oxygen radical "disease of the prematurity". *AJDC*; 142.

- (105) **Sun IL, Sun EE, Crane FL, Morre DJ, Lindgren A, Löw H** (1992) Requirement for coenzyme Q in plasma membrane electron transport. *Proc Natl Acad Sci USA*; 89: 11126-11130.
- (106) **Theil EC** (1987) Ferritin: structure, gene regulation and cellular functions in animals, plants and microorganisms. *Ann Rev Biochem*; 56: 289-315.
- (107) **Traber MG, Carpentier YA, Kayden HJ, Richelle M, Galeano NF, Deckelbau RJ** (1993) Alterations in plasma alpha-and gamma-tocopherol concentrations in response to intravenous infusion of lipid emulsions in humans. *Metabolism*; 42: 701-709.
- (108) **Van Zoeren-Grobbe D, Lindeman JH, Houdkamp E, Moison RM, Wijnen JT, Berger HM** (1997) Markers of oxidative stress and antioxidant activity in plasma and erythrocytes in neonatal respiratory distress syndrome. *Acta Paediatr*; 86 (12): 1363-1369.
- (109) **Varsila E, Hallman M, Andersson S** (1994) Free-radical-induced lipid peroxidation during the early neonatal period. *Acta Paediatr*; 83: 692-695.
- (110) **Volpe JJ** (2001) Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatr Res*; 50: 553-562.
- (111) **Wiedemann M, Finckh B, Kontush A, Hellwege H-H, Kohlschütter A** (2003) Neonatal blood plasma is less susceptible to oxidation than adult plasma, due to its higher content of bilirubin and lower content of oxidizable fatty acids. *Pediatric Res*; 53: 843-849.
- (112) **Winterbourn CC, Stern A** (1987) Human red cells scavenge extracellular hydrogen peroxide and inhibit formation of hypochlorous acid and hydroxyl radical. *J Clin Invest* Nov; 80 (5): 1486-91.
- (113) **Wu SC, Chou YH** (2001) Measurement of serum vitamin E isomers in fullterm and preterm infants. *Chang Gung Med J* ; 24(12): 793-798.
- (114) **Yamamoto Y, Yamashita S** (1997) Plasma ratio of ubiquinol and ubiquinone as a marker of oxidative stress. *Mol Aspects Med*; 18 Suppl.: 79-84.
- (115) **Yigit S, Yurdakök M, Kilinc K, Oran O, Erdem G, Tekinalp G** (1999) Serum Malondialdehyde concentration in babies with hyperbilirubinaemia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*; 80: 235-237.
- (116) **Yu T, Kui LQ, Ming QZ** (2003) Effect of asphyxia on non-protein-bound iron and lipid peroxidation in newborn infants. *Dev Med Child Neurol*; 45 (1): 24-27.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Eisenmetabolismus im menschlichen Organismus.	12
Abbildung 3.1: NTISS- und SNAP-Score am ersten und 3. Lebenstag in Bezug auf das Gestationsalter im ersten Kollektiv.	40
Abbildung 3.2: NTISS- und SNAP-Score am ersten und 3. Lebenstag in Bezug auf das Geburtsgewicht im ersten Kollektiv.	41
Abbildung 3.3: NTISS und SNAP im Vergleich 1. zu 3. Lebenstag im ersten Kollektiv.	42
Abbildung 3.4: Hämatokrit im Vergleich 1. zu 3. Lebenstag im ersten Kollektiv.....	43
Abbildung 3.5: Bilirubin (mg/dL) im Vergleich 1. zu 3. Lebenstag im ersten Kollektiv.	43
Abbildung 3.6: Coeruloplasmin (mg/dL) im Vergleich 1. zu 3. Lebenstag im ersten Kollektiv.	44
Abbildung 3.7: Cholesterin (mg/dL) im Vergleich 1. zu 3. Lebenstag im ersten Kollektiv.....	44
Abbildung 3.8: Alpha- und gamma-Tocopherol im Vergleich 1. und 3. Lebenstag im ersten Kollektiv.....	45
Abbildung 3.9: Signifikanter Abfall von NTISS und SNAP mit steigendem Bilirubinspiegel am 1. Lebenstag, sowie von NTISS am 3. Lebenstag im ersten Kollektiv.	46
Abbildung 3.10: Abfall des NTISS mit steigendem Hämatokrit (%) am 1. und 3. Lebenstag im ersten Kollektiv.	47
Abbildung 3.11: Signifikanter Abfall des SNAP- und NTISS-Scores mit steigendem Cholesterinspiegel am 1. Lebenstag im ersten Kollektiv.....	48
Abbildung 3.12: Signifikanter Abfall des NTISS-Scores mit steigenden Coenzym Q10-Werten am 3. Lebenstag im ersten Kollektiv.	49
Abbildung 3.13: Signifikanter Abfall des SNAP-Scores bei steigenden Coenzym Q10-Werten am 1. Lebenstag in der Gruppe 1.-3. Lebenstag.	50
Abbildung 3.14: Signifikanter Abfall von NTISS am 1. Lebenstag bei steigendem reduzierten Anteil Coenzym Q10 gesamt, sowie bezogen auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin im ersten Kollektiv.....	51
Abbildung 3.15: Signifikanter Abfall von SNAP am 1. Lebenstag bei steigendem reduzierten Anteil Coenzym Q10 gesamt, sowie bezogen auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin im ersten Kollektiv.....	52
Abbildung 3.16: Signifikanter Abfall von SNAP am 3. Lebenstag mit steigendem reduzierten Anteil Coenzym Q10 (%) im ersten Kollektiv.....	53
Abbildung 3.17: Abfallender SNAP-Score mit steigendem alpha-Tocopherol-Spiegel am 1. Lebenstag im ersten Kollektiv.	54
Abbildung 3.18: NTISS-Score und Schwangerschaftswoche am 1., 3. und 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.	55
Abbildung 3.19: NTISS-Score und Geburtsgewicht am 1., 3. und 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.	56
Abbildung 3.20: SNAP-Score und Schwangerschaftswoche am 3. und 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.....	56
Abbildung 3.21: SNAP-Score und Geburtsgewicht am 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.....	57
Abbildung 3.22: Hämatokrit (%) am 1., 3. und 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.....	57
Abbildung 3.23: Bilirubin am 1., 3. und 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.	58
Abbildung 3.24: Radikalresistenz der Erythrozyten am 1., 3. und 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.	59
Abbildung 3.25: Coeruloplasmin am 1., 3. und 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.	60
Abbildung 3.26: Cholesterinspiegel am 1., 3. und 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.....	61

Abbildung 3.27: alpha-Tocopherolspiegel als Gesamtmenge und berechnet auf die entsprechende Cholesterinmenge am 1., 3. und 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.	62
Abbildung 3.28: gamma-Tocopherol in der Gesamtmenge, sowie bezogen auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin am 1., 3. und 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.	63
Abbildung 3.29: Coenzym Q10-Levels bezogen auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin am 1., 3. und 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.	64
Abbildung 3.30: Reduzierter Anteil der Coenzym Q10-Levels bezogen auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin am 1., 3. und 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.	65
Abbildung 3.31: NTISS-Score und Bilirubinspiegel im zweiten Kollektiv.	66
Abbildung 3.32: NTISS-Score und Hämatokrit (%) am 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.	67
Abbildung 3.33: SNAP-Score und Cholesterin (mg/dL) am 1. Lebenstag im zweiten Kollektiv.	67
Abbildung 3.34: NTISS-Score und Coenzym Q10-Level am 3. und 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.	68
Abbildung 3.35: SNAP-Score und Coenzym Q10 gesamt (µmol/l) am 1. Lebenstag im zweiten Kollektiv.	68
Abbildung 3.36: NTISS-Score und Coenzym Q10 bezogen auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin (µmol/mmol Cholesterin) am 3. und 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.	69
Abbildung 3.37: NTISS-Score und reduzierter Anteil des Coenzym Q10 am 1. und 3. Lebenstag im zweiten Kollektiv.	69
Abbildung 3.38: SNAP-Score und reduziertes Coenzym Q10 in der Gesamtmenge (µmol/l), sowie berechnet auf den Cholesterinspiegel (µmol/mmol Cholesterin) am 1. Lebenstag im zweiten Kollektiv.	70
Abbildung 3.39: NTISS-Score und reduziertes Coenzym Q10-Level in bezug auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin (µmol/mmol Cholesterin) am 1. Lebenstag im zweiten Kollektiv.	71
Abbildung 3.40: SNAP-Score und reduziertes Coenzym Q10 (%) am 3. Lebenstag im zweiten Kollektiv.	71
Abbildung 3.41: NTISS-Score und oxidierte Anteil des Coenzym Q10-Levels am 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.	72
Abbildung 3.42: NTISS- und SNAP-Score und alpha-Tocopherol (µmol/l) am 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.	73
Abbildung 3.43: NTISS-Score und alpha-Tocopherol am 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.	74
Abbildung 3.44: SNAP-Score und gamma-Tocopherol absolut (µmol/l) sowie bezogen auf den Cholesterinspiegel (µmol/mmol Cholesterin) am 7. Lebenstag im zweiten Kollektiv.	75
Abbildung 3.45: NTISS-Score mit zunehmender Reife des Kollektives, sowie zunehmendem Geburtsgewicht im dritten Kollektiv.	76
Abbildung 3.46: SNAP-Score mit zunehmender Reife der Patienten und zunehmendem Geburtsgewicht.	77
Abbildung 3.47: NTISS- und SNAP-Score an allen 4 untersuchten Lebenstagen im dritten Kollektiv.	78
Abbildung 3.48: Bilirubin (mg/dL) am 1., 3., 7. und 14. Lebenstag im dritten Kollektiv.	79
Abbildung 3.49: Hämatokrit (%) am 1., 3., 7. und 14. Lebenstag im dritten Kollektiv.	80

Abbildung 3.50: Radikalresistenz der Erythrozyten (min) am 1., 3., 7. und 14. Lebenstag im dritten Kollektiv.	81
Abbildung 3.51: Coeruloplasmin-Werte (mg/dL) am 1., 3., 7. und 14. Lebenstag im dritten Kollektiv.	82
Abbildung 3.52: alpha-Tocopherol ($\mu\text{mol/l}$), sowie alpha-Tocopherol bezogen auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin ($\mu\text{mol/mmol}$ Cholesterin) im dritten Kollektiv.	83
Abbildung 3.53: gamma-Tocopherol ($\mu\text{mol/mmol}$ Cholesterin und $\mu\text{mol/l}$) im dritten Kollektiv.	84
Abbildung 3.54: Coenzym Q10 in der Gesamtmenge ($\mu\text{mol/l}$), sowie bezogen auf die lipophile Bezugsgröße Cholesterin ($\mu\text{mol/mmol}$ Chol.) im dritten Kollektiv.	85
Abbildung 3.55: Oxidiertes und reduziertes Coenzym Q10 (%) im dritten Kollektiv....	86
Abbildung 3.56: SNAP- und NTISS-Score und Hämatokrit (%) im dritten Kollektiv...	87
Abbildung 3.57: SNAP- und NTISS-Score und Cholesterin (mg/dl) am 14. Lebenstag im dritten Kollektiv.	88
Abbildung 3.58: NTISS-Score und Coenzym Q10 am 1. Lebenstag im dritten Kollektiv.	89
Abbildung 3.59: Abfallender SNAP-Score mit steigendem reduziertem Coenzym Q10, berechnet auf den Cholesterinspiegel, am 1. Lebenstag in der Gruppe 1.-14. Lebenstag.	90
Abbildung 3.60: Am 14. Lebenstag zeigt sich ein Anstieg des NTISS-Scores mit steigendem Anteil an reduziertem Coenzym Q10 (%), sowie ein Abfall des NTISS-Scores mit höherem Anteil an oxidiertem Coenzym Q10.	91
Abbildung 3.61: Am 14. Lebenstag zeigt sich ein Anstieg des SNAP-Scores mit steigendem Anteil an reduziertem Coenzym Q10 (%), sowie ein Abfall des SNAP- Scores mit höherem Anteil an oxidiertem Coenzym Q10.	92
Abbildung 3.62: SNAP-Score und alpha-Tocopherol ($\mu\text{mol/mmol}$ Cholesterin) am 14. Lebenstag im dritten Kollektiv.....	93
Abbildung 3.63: NTISS- Score und gamma-Tocopherol ($\mu\text{mol/mmol}$ Cholesterin) am 14. Lebenstag im dritten Kollektiv.....	94
Abbildung 3.64: Darstellung des NTBI ($\mu\text{mol/l}$) in Bezug auf das Lebensalter (Tage) bei partiell oraler Eisensupplementation.....	95
Abbildung 3.65: Radikalresistenz der Erythrozyten und NTBI ($\mu\text{mol/l}$).....	96
Abbildung 3.66: Malondialdehyd ($\mu\text{mol/l}$) und NTBI ($\mu\text{mol/l}$).....	97
Abbildung 3.67: NTBI ($\mu\text{mol/l}$) und Malondialdehyd (mmol/l).....	98

8 Anhang

Name, Vorname	Geburtsdatum
---------------	--------------

1. Pränatale Daten

Ankreuzen oder
ausfüllen

Intrauterines Wachstum	normal gewachsen Wachstumsrückstand	☐ ☐
Gestose	ja nein	☐ ☐
Vorzeitiger Blasensprung (>24 Std.)	ja nein	☐ ☐
Pränatale Infektion	nein wahrscheinlich sicher	☐ ☐ ☐
Amnioninfektionssyndrom	nein wahrscheinlich sicher	☐ ☐ ☐
Intrauteriner fetaler Distress Cardio-Tokogramm	pathologisches CTG	ja nein
Dopplersonographisches Flußmuster	pathologisches Muster	ja nein
Dexamethasongabe	ja nein	☐ ☐
Besondere Risiken	(schwere) Fehlbildung Anderes	☐ ☐

2. Perinatale Daten

Ankreuzen oder
ausfüllen

Schwangerschaftswoche	
Geburtsgewicht	g
Länge bei Geburt	cm
Kopfumfang bei Geburt	cm
Nabelarterien-pH	
Apgar-Score (5 Minuten)	≤3 ☐ 4-6 ☐ ≥7 ☐
Primär intubiert (innerhalb der ersten 30 Minuten)	ja ☐ nein ☐
Atemnotsyndrom aufgetreten	ja ☐ nein ☐

Name, Vorname

Geburtsdatum

3. Postnatale Daten

a) Erhebung zu festgelegten Zeitpunkten

Tag der Erhebung (Lebenstag)	1	2	3	4	5	6	7	14	21	28	Entlassung* = Tag
Antioxidantien-Status im Blut	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Diagnosen (Liste der neonatologischen Probleme)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Infektionen: nein											
wahrscheinlich											
sicher											
Surfactantgabe nein											
ja											
Wirksamkeit prompt											
Wirksamkeit schlecht											
Offener Ductus arteriosus: nein											
ja											
Chronic Lung Disease nein											
ja											
Bronchopulmonale Dysplasie ja											
Katecholamingabe ja											
Steroidgabe ja											
pathologische cerebrale nein											
Sonographie: ja											
(Hirnblutung Grad 2-4)											
Augenärztliche Untersuchung: RPM											
(0=nein;1=Stadium 1-2; 2=Stadium 3-4)											
Klinische Scores NTISS	x		x				x	x	x	x	
SNAP	x		x				x	x	x	x	

* aus der Intensivstation

Name, Vorname

Geburtsdatum

b) Erhebung täglich

Lebenstag		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Gewicht	g												
Beatmet	ja												
	nein												
FiO ₂													
Hämatokrit (falls indiziert)													
Bilirubin (falls indiziert)	mg/dL												
Phototherapie	Std/Tag												
Ernährung oral	mL/Tag												
Ernährung parenteral	mL/Tag												
Intralipid	mL/Tag												
	g/Tag												
	g/Kg KG												

Lebenstag		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	28	ET
Gewicht	g												
Beatmet	ja												
	nein												
FiO ₂													
Hämatokrit (falls indiziert)													
Bilirubin (falls indiziert)	mg/dL												
Phototherapie	Std/Tag												
Ernährung oral	mL/Tag												
Ernährung parenteral	mL/Tag												
Intralipid	mL/Tag												
	g/Tag												
	g/Kg KG												

Name, Vorname

Geburtsdatum

NTISS (Neonatal Therapeutic Intervention Scoring System)

		Score	LT 1	LT 3	LT 7	LT 14	LT 21	LT 28	ET
Lungen	Sauerstoffgabe	1 a							
	Surfactantgabe	1							
	Tracheostoma-Pflege	1 b							
	Tracheotomie	1 b							
	CPAP (Spontanatmung)	2 a							
	Endotracheale Intubation	2							
	Beatmung	3 a							
	Beatmung mit Relaxation	4 a							
	Hochfrequenzbeatmung	4 a							
Herz-Kreislauf	Indometacingabe	1							
	Plasmaexpander <15ml/kg	1 c							
	Katecholamingabe (1)	2 d							
	Plasmaexpander >15ml/kg	3 c							
	Katecholamingabe (>1)	3 d							
	Schrittmacher standby	3 e							
	Schrittmacher genutzt	4 e							
	Reanimation	4							
Medikation	Antibiotikagabe (<2)	1 f							
	Diuretikagabe (enteral)	1 g							
	Steroidgabe (postnatal)	1							
	antikonvulsive Therapie	1							
	Aminophyllingabe (Solosin)	1							
	andere Medikation	1							
	Antibiotikagabe (>2)	2 f							
	Diuretikagabe (parenteral)	2 g							
	met.Acidose: Na-Bicarbonat	3							
	Hyperkaliämie (Sultanol)	3							
Monitoring	regelmäßige Überwachung	1							
	Herz-Kreislauf-Überwachung	1							
	Blutentnahmen (5-10)	1 h							
	Inkubator	1							
	Pulsoximetrie	1							
	Blutdruckmessung	1							
	Urinkatheter	1							
	Flüssigkeitsbilanz	1							
	Blutentnahmen (>10)	2 h							
Stoffwechsel	Sondennahrung	1							
	Intralipidgabe (i.v.)	1							
Ernährung	Aminosäurengabe (i.v.)	1							
	Phototherapie	1							
	Insulingabe	2							
	Kaliumgabe	3							
Transfusion	Gamma-Globulin (i.v.)	1							
	Bluttransfusion (<15ml/kg)	2 i							
	teilweiser Blutaustausch	2							
	Bluttransfusion (>15ml/kg)	3 i							
	Thrombozytenkonzentrate	3							
	Leukozytenkonzentrate	3							
	doppelter Blutaustausch	3							

		Score	LT 1	LT 3	LT 7	LT 14	LT 21	LT 28	ET
Procedere	Transport des Patienten	2							
	1 Thoraxdrain gelegt	2 j							
	Kleine Operation	2 k							
	>1 Thoraxdrain gelegt	3 j							
	Pleurapunktion	3							
	Große Operation	4 k							
	Perikardpunktion	4 l							
	Perikarddrain gelegt	4 l							
	Dialyse	4							
Gefäße	peripherer venöser Katheter	1							
	arterieller Katheter	2							
	zentraler Venenkatheter	2							
Punkte total									

Name, Vorname

Geburtsdatum

SNAP (Score for Neonatal Acute Physiology)

Parameter	1 Punkt	3 Punkte	5 Punkte	LT 1	LT 3	LT 7	LT 14	LT 21	LT 28	ET
Blutdruck, mmHg										
hoch	66-80	81-100	>100							
niedrig	30-35	20-29	< 100							
Herzfrequenz										
hoch	180-200	201-250	> 250							
niedrig	80-90	40-79	< 40							
Atemfrequenz	60-100	>100								
Temperatur, °C	35-35,6	33,4-34,9	< 33,4							
PO₂, mmHg	50-60	30-50	< 30							
PO₂/FiO₂-Ratio	2,5-3,5	0,3-2,49	< 0,3							
PCO₂, mmHg	50-65	66-90	> 90							
Oxygenationsindex mAP×FiO₂×100/ PaO₂	0,07 -0,20	0,21 -0,40	> 0,40							
Hämatokrit, %										
hoch	66-70	> 70								
niedrig	30-35	20-29	< 20							
Leukozyten (× 1000)	2,0-5,0	< 2,0								
Unreife-Ratio	> 0,21									
Neutrophile (absolut)	500-999	< 500								
Thrombozyten (× 1000)	30-100	0-29								
Harnstoff-N, mg/dL	40-80	> 80								
Kreatinin, mg/dL	1,2-2,4	2,5-4,0	> 4,0							
Urinausscheidung mL/kg/ h	0,5-0,9	0,1-0,49	< 0,1							
Ind.Bilirubin										
>2 kg: mg/ dL	15-20	> 20								
<2 kg: mg/ dL/ kg	5-10	> 10								
Dir.Bilirubin, mg/ dL	> 2,0									
Natrium, mmol/ L										
hoch	150-160	161-180	> 180							
niedrig	120-130	< 120								
Kalium, mmol/ L										
hoch	6,6-7,5	7,6-9,0	> 9,0							
niedrig	2,0-2,9	2,0								
Calcium, ion., mg/dL										
hoch	> 1,4									
niedrig	0,8-1,0	< 0,8								
Calcium, tot., mg/ dL										
hoch	> 12									
niedrig	5,0-6,9	< 5,0								
Glucose, mg/ dL										
hoch	150-250	> 250								
niedrig	30-40	< 30								
Bikarbonat, mmol/L										
hoch	> 33									
niedrig	11-15	< 10								
Serum-pH	7,2-7,3	7,1-7,19	< 7,10							
Krampf	1	> 1								
Atemstillstand	Stim.-e	Stim.-ue	totaler							
Blut im Stuhl	positiv									
Punktwert total										

Tabelle 8.1: Patientenliste der Verlaufsstudie Radikalkrankheiten bei Frühgeborenen.

Aktennr.	SSW	Patient	Geburtsdatum
40316	24.SSW	v. W. und L., weibl. 1. Zwilling	18.05.98
40317	24.SSW	v. W. und L.L., ml. 2. Zwilling	18.05.98
39961	25.SSW	R.F., ml.	24.03.98
39046	26.SSW	S.C., ml. 1. Zwilling	07.11.97
39047	26.SSW	S., ml. 2. Zwilling	07.11.97
39824	26.SSW	O.J., ml.	03.03.98
40025	26.SSW	W.N., weibl. 1. Zwilling	02.04.98
40026	26.SSW	W.L., weibl. 2. Zwilling	02.02.98
39995	27.SSW	H.M., weibl.	29.03.98
40036	27.SSW	S.P., weibl.	04.04.98
38908	28.SSW	G.C., ml.	15.10.97
38996	28.SSW	S.X., ml.	30.10.98
39482	28.SSW	R.R., weibl. 1. Zwilling	16.01.98
39483	28.SSW	R., ml. 2. Zwilling	16.01.98
40211	28.SSW	H.B., ml.	02.05.98
38726	29.SSW	W., ml.	21.09.97
38774	29.SSW	B., weibl.	28.09.97
38940	29.SSW	W.M., ml.	20.10.97
40079	29.SSW	F.L., weibl.	11.04.98
38679	30.SSW	F.C., weibl.	15.09.97
39015	30.SSW	H.P., ml.	03.11.97
39406	30.SSW	G.-M., J. 1. Drilling	06.01.98
39407	30.SSW	G.-M., F. 2. Drilling	06.01.98
39408	30.SSW	G.M., J. 3. Drilling	06.01.98
40162	30.SSW	F. L., weibl.	24.04.98
40191	30. SSW	M.S., ml.	28.04.98
40284	30.SSW	S.C., weibl. 1. Zwilling	12.05.98
40285	30.SSW	S.N., ml. 2. Zwilling	12.05.98
39114	31.SSW	M.S., weibl.	16.11.97
40187	31.SSW	K.K., weibl.	25.04.98
40370	31.SSW	O.L., ml.	28.05.98
39229	32.SSW	Z.M., ml. 1. Zwilling	04.12.97
39230	32.SSW	Z. R., ml. 2. Zwilling	04.12.97
39494	32.SSW	U.D., ml.	17.01.98
39510	32.SSW	J.S., ml. 1. Zwilling	19.01.98
39511	32.SSW	J.J.-A., ml. 2. Zwilling	19.01.98
39638	32.SSW	T.S., weibl.	08.02.98
39863	32.SSW	H.A., ml.	07.03.98
39620	33.SSW	S.N., ml. 1. Zwilling	05.02.98
39621	33.SSW	S.A., ml. 2. Zwilling	05.02.98
39293	34.SSW	P.K., ml.	17.12.97
39375	34.SSW	F.Y., weibl. 1. Drilling	02.01.98
39376	34.SSW	F.N., weibl. 2. Drilling	02.01.98
39377	34.SSW	F.M., ml. 3. Drilling	02.01.98
39867	34.SSW	K.R., weibl. 1. Zwilling	09.03.98
39868	34.SSW	K.H., ml. 2. Zwilling	09.03.98

Tabelle 8.2: Patientenkollektiv des ersten Studienteils. Teil 1.

Name																	
B., weibl.	1	16	36	3,8	57	149,0	0,70	22,8	63,0	1,638	0,20		4,7		0,046		0,046
	3	14	41	6,6	43	104,0	0,80	28,5	99,0	2,574	0,56		7,8		0,000		0,000
	7	0	0	7,6	43	123,0	2,43	19,6	205,0	5,330	4,15	14,30	10,0	24,0	76,000	0,079	24,000
G.C., ml.	1	3	16	3,9	58	96,0	0,00	6,9	94,0	2,444	0,42		9,8		0,201		0,160
	3	22	31	6,8	50	105,0	1,55	15,5	82,0	2,132	0,89		10,9		0,000		0,000
	7	0	0	6,5	35	135,0	2,44	12,9	90,0	2,340	2,28	7,50	12,0	27,0		0,000	0,000
	14	11	21	2,5	34		1,05	9,3	82,0	2,132	15,06		13,2		0,415		0,350
P., ml.	1	3	16	3,9	58	99,0	0,96	15,5	85,0	2,210	0,30		9,9		0,188		0,140
	3	10	16	4,7	43	111,0	0,48	80,0	80,0	2,080	5,10		0,6		0,189		0,130
	7	0	0	6,3	48	143,0	1,60	15,5	138,0	3,588	6,34	8,80	6,0	15,0	74,000	0,100	26,000
	14	5	12	4,1	42	126,0	1,60	25,4	181,0	4,706	21,16		34,9				0,030
S.X., ml.	1	11	26	4,4	46	93,0	0,65	6,9	44,0	1,144	1,27		7,6		0,059		0,059
	3	7	27	6,7	41	94,0	0,99	6,9			1,44		8,8		0,000		0,000
	7	0	0	6,4	31	141,0	0,86		99,0	2,574	7,90	16,80	15,0	27,0	74,000	0,110	26,000
	14	10	17	4,4	34	146,0	1,13	12,9	123,0	3,2	6,08		21,7				
F.Y., weibl.	1	10	15	3,0	60	83,0	1,19	6,9	106,0	2,756	6,99		5,9		0,190		0,190
	3	5	11	7,1	45	86,0	1,92	8,1	116,0	3,016	1,58		8,8		0,084		0,084
	7	0	0	10,3	50	118,0	1,72	7,0	69,0	1,794	2,38	18,40	1,0	6,0	72,000	0,086	28,000
F.N. weibl.	1	12	18	3,0	51	86,0	1,40	6,9	102,0	2,652	0,26		6,7		0,000		0,000
	3	11	19	7,5	35	94,0	2,70	10,5	145,0	3,770	3,07		11,5		0,357		0,270
	7	1	0	10,0	39	143,0	0,51	12,9	65,0	1,690	7,27	10,50	12,0	16,0	76,000	0,120	24,000
F.C., weibl.	1	12	13	3,1	55	90,0	3,28	6,9	87,0	2,626	0,29		3,2		0,000		0,000
	3	5	10	8,6	50	80,0	4,69	7,0	136,0	3,536			11,1		0,000		0,000
S.C. ml.	1	16	40	2,1	43	92,0	0,65		20,0	0,520	1,05		5,3		0,180		0,180
	3	18	32	5,9	45	86,0	1,61		109,0	2,834	0,55		9,4		0,000		0,000
S.N., ml.	1	11	13	3,5	58	81,0	1,50	7,0	131,0	3,406	0,09		7,2		0,303		0,280
	3	2	6	8,4	54	99,0	0,44	11,7	114,0	2,964	0,59		10,1		0,459		0,400
	7	1	1	10,5	53	105,0	1,00	12,9	167,0	4,342	1,04	26,90	3,0	6,0	86,000	0,190	14,000
S.A., ml.	1	9	11	5,1	54	77,0	1,23	6,9	109,0	2,834	1,80		8,2		0,261		0,210
	3	9	12	9,1	55	96,0	0,62	7,0	126,0	3,276	3,49		10,3		0,465		0,440
	7	0	0	12,0	54	97,0	1,79	10,5	142,0	3,692	0,91	17,40	3,0	6,0	0,000	0,380	99,999
	14	0	6	12,6	48	119,0	1,10	15,5	160,0		2,39		12,5		0,420		0,000
	21	0	3	9,9	39	128,0	0,52	11,7	159,0	4,134	5,78		31,0		1,080		0,950
J.S., ml.	1	17	20	4,9	71	75,0	1,75		68,0	1,768	1,74		5,8		0,070		0,056
	3	14	18	6,2	62	93,0	2,27		70,0	1,820	0,37		5,3		0,061		0,000
	7	0	0	7,3	52	137,0	0,68	16,9	102,0	2,652	5,78	8,00	12,0	15,0	67,000	0,100	33,000
J.J.-A., ml.	1	13	29	3,5	64	73,0	1,33		69,0	1,794					1,070		0,850
	3	6	24	3,9	57	84,0	3,03	16,9	96,0	2,496	5,56		9,3		0,224		0,140
	7	1	0	3,4	52	138,0	2,89	18,2	125,0	3,250	5,70	13,00	11,0	20,0	78,000	0,120	22,000
K.R., weibl.	1	11	12	3,9	65	93,0	1,09		138,0	3,588	0,24		12,0		0,228		0,169
	3	4	10	9,1	57	75,0	1,13	10,5	147,0	3,822	1,54		12,0		0,189		0,100

Tabelle 8.3: Patientenkollektiv des ersten Studienteils. Teil 2.

Name	Lebenstag	SNAP	NTISS	Bilirubin (mg/dl)	HKT (%)	H50 (min)	Malondialdehyd (µmol/l)	Coeruloplasmin (nmol/l)	Cholesterin (mg/dl)	Cholesterin (nmol/l)	gamma-Tocopherol (µmol/l)	alpha-Tocopherol (µmol/nmol Cholesterin)	Coenzym Q10 (µmol/L)	Coenzym Q10 (µmol/nmol Cholesterin)	reduziertes Coenzym Q10 (µmol/L)	oxidiertes Coenzym Q10 (µmol/L)
K.H., ml.	1	11	12	2,9	73	94,0	1,59				0,42		13,9		0,390	0,390
	3	5	6	3,4	64	85,0	0,98		87,0	2,626	0,42		8,9		0,128	0,053
R.R., weibl.	3	13	18	5,1	46	97,0	1,38	6,9	165,0	4,290	0,50		14,5		0,160	0,033
	7	1	0	5,9	37	104,0	1,22	6,9	123,0	3,198	8,77	16,30	13,0	23,0	57,000	43,000
	14	13	14	6,4	40	122,0	0,62	10,5	104,0		9,69		25,1		0,250	0,028
G.-M.F., weibl.	1	14	20	2,5	69	128,0	0,06	6,9	121,0	3,146	0,47		13,6		0,083	0,024
	3	4	14	5,7	54	83,0	0,71	6,9	63,0	1,638	0,90		8,2		0,110	0,000
	7	0	0	5,6	41	104,0	1,08	6,9	65,0	1,690	7,47	18,00	5,0	15,0	87,000	13,000
	14	11	16	4,4	34	120,0	1,39	10,5	125,0	3,250	12,16		28,3		0,320	0,210
	20			3,8	43	65,0	0,64	9,3	167,0	4,342	7,86		15,7		0,670	0,170
W.N., weibl.	1	16	31	3,2	47	74,0	1,88	6,9	84,0	2,184	0,64		5,4		0,075	0,000
	3	9	27	4,7	30	66,0	0,56	10,5	116,0	3,016	0,85		4,4		0,071	0,014
	7	0	0	6,1	41	111,0	1,69	7,0	106,0	2,756	2,62	4,80	12,0	22,0	0,000	0,000
	14	13	19	5,1	36	147,0	0,54	18,2	87,0		11,70		15,5		0,230	0,010
	21	12	22			105,0	0,48	16,9	73,0	1,898	5,04		6,8		0,000	0,000
W.L., weibl.	1	16	32	3,1	50	97,0	1,06	6,9	87,0	2,262	0,18		4,0		0,000	0,000
	3	9	23	5,0	42	53,0	0,30	12,9	156,0	4,056	0,34		8,6		0,125	0,109
	7	0	0	3,6	43	119,0	5,15	7,0	248,0	6,448	11,43	13,20	15,0	22,0	59,000	0,130
S.C., weibl.	1	9	13	4,5	54	72,0	0,31		153,0	3,978	0,44		6,2		0,170	0,094
	3	12	14	6,3	56	87,0	1,38	7,0	155,0	4,030	1,40		12,4		0,340	0,360
	7	1	0	5,9	52	102,0	1,90	9,3	169,0	4,394	11,85	26,10	12,0	15,0	79,000	0,120
P.K., ml.	1	12	20	2,5	46	81,0	0,65	7,0	99,0	2,574	0,54		5,6		0,140	0,023
	3	11	14	8,5	43	84,0	1,77	7,0	123,0	3,198	1,13		15,7		0,210	0,340
	7	0	0	7,3	38	121,0	1,64	8,1	133,0	3,458	3,28	16,60	4,0	11,0	70,000	0,140
K.K., weibl.	1	13	29	2,6	65	89,0	0,96		113,0	2,938	0,72		10,3		0,000	0,180
	3	10	20	8,3	50	114,0	0,40	18,2	123,0	3,198	0,38		11,0		0,220	0,090
	7	0	0	7,2	51	127,0	0,59	16,9	184,0	4,784	7,63	14,40	9,0	12,0	84,000	0,060
O.J., ml.	1	17	35	2,0	47	100,0	0,46	6,9	78,0	2,028	0,34		8,1		0,000	0,000
	3	10	33	5,8	40	80,0	0,93	11,7	133,0	3,458	1,23		11,0		0,051	0,000
	7	1	0	5,9	43	138,0	0,66	6,9	111,0	2,886	5,74	9,90	13,0	20,0	77,000	0,150
H.M., weibl.	1	15	28	2,8	55	100,1	1,09		186,0	4,836	0,44		10,1		0,105	0,042
	3	15	26	5,4	39	115,0	1,03	9,3	113,0	2,938	0,37		11,3		0,090	0,087
	7	0	0	5,0	37	>150	0,72	8,1	118,0	3,068	6,16	11,40	10,0	17,0	90,000	0,023
	14	10	20	5,2	44	117,0	0,51	12,9	99,0		12,23		16,5		0,308	0,006
F.L., weibl.	1	15	26	4,6	56	112,0	0,37		89,0	2,314	0,83		7,6		0,000	0,000
	3	11	20	8,9	50		0,56	10,5	133,0	3,458	1,60		11,3		0,160	0,013
	7	0	0	5,6	42	152,1	0,49	10,5	111,0	2,886	6,86	14,30	11,0	14,0	86,000	0,060
O.L., ml.	1	11	19	3,5	53	100,1	1,37	6,9	106,0	2,756	0,64		9,5		0,330	0,150
	3	9	18	7,3	42	99,0	1,35	6,9	104,0	2,704	0,97		7,1		0,290	0,150
	7	0	0	9,5	35	123,0	1,01	6,9	114,0	2,964	4,34	12,70	11,0	15,0	80,000	0,090

Tabelle 8.4: Patientenkollektiv des ersten Studienteils. Teil 3.

Name	Lebenstag	SNAP	NTISS	Bilirubin (mg/dl)	HKT (%)	H50 (min)	Malondialdehyd (µmol/l)	Coeruloplasmin (nmol/l)	Cholesterin (mg/dl)	Cholesterin (nmol/l)	gamma-Tocopherol (µmol/l)	gamma-Tocopherol (µmol/nmol Cholesterin)	alpha-Tocopherol (µmol/l)	alpha-Tocopherol (µmol/nmol Cholesterin)	Coenzym Q10 (µmol/L)	Coenzym Q10 (µmol/nmol Cholesterin)	reduziertes Coenzym Q10 (µmol/L)	oxidiertes Coenzym Q10 (µmol/L)
P.S., weibl.	1	14	14	4,0	57	60,0	1,15	6,9	75,0	1,950	0,47		4,3		0,113		0,113	0,000
	3	10	10	9,3	49	76,0	1,52	11,7	85,0	2,210	0,43		3,7		0,123		0,094	0,029
	7	0	0	11,9	54	116,0	0,27	10,5	113,0	2,938	2,97	17,90	10,0	7,0	81,000	0,072	19,000	
M.S., ml.	1	15	23	4,1	48	84,0	0,70	23,9	92,0	2,392	0,58		7,3		0,300		0,280	0,020
	3	13	13	8,9		120,0	0,88				1,38		11,9		0,280		0,240	0,040
	7	1	0	7,7	54	120,0	0,65	23,9	162,0	4,212	2,77	19,30	10,0	12,0	79,000	0,110	21,000	
H.A., ml.	1	13	26	2,1	65	76,0	0,72	6,9	106,0	2,756	0,52		6,1		0,200		0,134	0,066
	3	11	15	6,2	47	69,0	0,65	15,5	126,0	3,276	0,30		8,6		0,319		0,260	0,059
	7	0	0	7,6	49	114,0	0,61	12,9	169,0	4,394	4,62	17,90	9,0	17,0	75,000	0,095	25,000	
vW.& L., weibl.	1	20	32	1,5	45	84,0	2,40	6,9	39,0	1,014	0,01		1,2		0,000		0,000	0,000
vW.& L.L., ml.	1	18	36	2,5	35	63,0	6,47		67,0	1,742	0,27		7,0		0,089		0,058	0,031
	3	12	28	3,6	36	89,0	1,63	8,1	60,0	1,560	0,36		8,1		0,210		0,150	0,060
	7	0	0	3,5	43	113,0	0,99	6,9	63,0	1,638	5,63	8,80	15,0	34,0		0,000	0,000	
H.B., ml.	1	17	37	1,7	47	101,0	1,99	6,9	70,0	1,820	0,38		5,7		0,530		0,000	0,530
	3	13	20	7,2	45	65,0	1,61	15,5	142,0	3,770	1,47		18,4		0,405		0,330	0,075
	7	1	1	6,2	46	118,0	1,39	14,2	297,0	7,722	22,63	32,50	11,0	19,0	88,000	0,076	12,000	
Z.M., ml.	1	10	27	4,7	55	68,0	1,64	7,0	164,0	4,264	0,72		9,3		0,169		0,145	0,024
	3	10	23	7,5	47	83,0	2,08	8,1	96,0	2,496	0,35		6,2		0,049		0,000	0,049
	7	0	0	6,9	42	105,0	0,59	11,7	147,0	3,822	7,55	9,90	9,0	23,0		0,000	0,000	
Z.R., ml.	1	13	14	5,4	52	65,0	1,58	9,3	89,0	2,314	1,23		6,2		0,270		0,000	0,270
	3	13	12	8,6	41	63,0	2,21	8,1	159,0	4,134	1,78		8,3		0,072		0,000	0,072
	7	1	1	10,9	42	92,0	1,33	7,0	159,0	4,134	4,79	15,90	6,0	13,0		0,000	0,000	
	14	5	14	8,7	44	90,0	1,19	22,5	133,0	3,458	5,89		19,1		0,263		0,220	0,043
	21	2	10	4,9	40	117,0	0,77	16,9	150,0	3,900	39,68		24,1		0,475		0,390	0,085
R.F., ml.	1	12	34	1,9	55	63,0	0,78	6,9	104,0	2,704	0,48		6,4		0,085		0,085	0,000
	3	10	26	5,9	50	101,0	0,92	19,6	121,0	3,146	0,44		10,1		0,175		0,153	0,022
	7	0	0	4,8	29	114,0	0,83	8,1	121,0	3,146	4,25	9,20	9,0	25,0	52,000	0,112	48,000	
W.M., ml.	1	10	19	3,3	42	112,0	1,33	6,9	43,0	1,118	0,59		3,5		0,000		0,000	0,000

Name, Vorname	Geburtsdatum	Geburtsgewicht
---------------	--------------	----------------

NTBI-Studie: Erhebung der klinischen Daten

Labordaten am Tage der Blutentnahme

Hb (g/dl)	
Retis (‰)	
Bili (mg/dl)	
CRP (mg/dl)	
Interleukin 6 (ng/l)	

Eisen gesamt

Tag der Abnahme	
+/- 1 Tag	
+/- 2 Tage	
+/- 3 Tage	
+/- 7 Tage	

O2-Gabe

Zeitraum der O2-Applikation (in LT)	
Wann (LT)	
Max. O2-Bedarf	
Fi-O2	
Zum Zeitpunkt der BE	

Transfusionen

Nein	
Ja	Zeitpunkt (LT)
	Anzahl
	Menge (ml)

Ernährung z. Zeitpunkt der Blutentnahme

Muttermilch	
Muttermilch +Infusion	
FG/NG-Milch	
FG/NG-Milch + Infusion	
komplett parenteral	

Medikamente z. Zeitpunkt der Blutentnahme

Vitamine	
Intralipid	
Antibiotika	
Ferro 66	
Glukokortikoide	

Tabelle 8.5: Patientenkollektiv des zweiten Studienteils mit Bestimmung von NTBI. Teil 1.

ICH		1	0	1
RPM		1	0	1
BPD		1	1	0
NEC		1	1	0
oxidiertes Coenzym Q10 (µmol/L)		0,114	0,114	0
reduziertes Coenzym Q10 (µmol/L)		0,223	0,142	0
Coenzym Q10 (mmol/L)		0,337	0,275	0
alpha-Tocopherol (µmol/mmol Cholesterin)		9,93	10,36	0
alpha-Tocopherol (µmol/l)		8,14	12,02	0
gamma-Tocopherol (µmol/mmol Cholesterin)		5,23	3,58	0
gamma-Tocopherol (µmol/L)		4,29	4,88	0
Eisen (mg/dL)		10	28,5	16
vorherige Transfusion (ml)		24	0	0
orale Eisensupplementation: ja=1, nein=0		1	0	0
Hämoglobin (g/L)		12	16,1	16
NTBI: positiv=1, negativ=0		1	0	0
NTBI (µmol/L)		2,039	1,516	4,608
Coeruloplasmin (mg/dL)		7	9,3	22,5
Cholesterin (mg/dL)		82	116	136
Malondialdehyd (µmol/L)		1,83	0,65	0,91
H 50 (min)		73	62	58
Gestationsalter (Wochen)		40	36	39
LT		94	5	18
Abnahmedatum		08.12.97	10.03.98	08.01.98
Geburtsdatum		06.09.97	05.03.98	22.12.97
Geburtsgewicht (g)		990	2305	2200
SSW		26	35	36
Name		B.J., ml.	D.B., ml.	D.K., weibl.
		1	2	3
		4	5	6
		7	8	9
		10	11	12
		13	14	15
		16	17	18
		19	20	21
		22	23	24
		25	26	27
		28	29	30
		31	32	33
		34	35	36
		37	38	39
		40	41	42
		43	44	45
		46	47	48
		49	50	51
		52	53	54
		55	56	57
		58	59	60
		61	62	63
		64	65	66
		67	68	69
		70	71	72
		73	74	75
		76	77	78
		79	80	81
		82	83	84
		85	86	87
		88	89	90
		91	92	93
		94	95	96
		97	98	99
		100	101	102
		103	104	105
		106	107	108
		109	110	111
		112	113	114
		115	116	117
		118	119	120
		121	122	123
		124	125	126
		127	128	129
		130	131	132
		133	134	135
		136	137	138
		139	140	141
		142	143	144
		145	146	147
		148	149	150
		151	152	153
		154	155	156
		157	158	159
		160	161	162
		163	164	165
		166	167	168
		169	170	171
		172	173	174
		175	176	177
		178	179	180
		181	182	183
		184	185	186
		187	188	189
		190	191	192
		193	194	195
		196	197	198
		199	200	201
		202	203	204
		205	206	207
		208	209	210
		211	212	213
		214	215	216
		217	218	219
		220	221	222
		223	224	225
		226	227	228
		229	230	231
		232	233	234
		235	236	237
		238	239	240
		241	242	243
		244	245	246
		247	248	249
		250	251	252
		253	254	255
		256	257	258
		259	260	261
		262	263	264
		265	266	267
		268	269	270
		271	272	273
		274	275	276
		277	278	279
		280	281	282
		283	284	285
		286	287	288
		289	290	291
		292	293	294
		295	296	297
		298	299	300
		301	302	303
		304	305	306
		307	308	309
		310	311	312
		313	314	315
		316	317	318
		319	320	321
		322	323	324
		325	326	327
		328	329	330
		331	332	333
		334	335	336
		337	338	339
		340	341	342
		343	344	345
		346	347	348
		349	350	351
		352	353	354
		355	356	357
		358	359	360
		361	362	363
		364	365	366
		367	368	369
		370	371	372
		373	374	375
		376	377	378
		379	380	381
		382	383	384
		385	386	387
		388	389	390
		391	392	393
		394	395	396
		397	398	399
		400	401	402
		403	404	405
		406	407	408
		409	410	411
		412	413	414
		415	416	417
		418	419	420
		421	422	423
		424	425	426
		427	428	429
		430	431	432
		433	434	435
		436	437	438
		439	440	441
		442	443	444
		445	446	447
		448	449	450
		451	452	453
		454	455	456
		457	458	459
		460	461	462
		463	464	465
		466	467	468
		469	470	471
		472	473	474
		475	476	477
		478	479	480
		481	482	483
		484	485	486
		487	488	489
		490	491	492
		493	494	495
		496	497	498
		499	500	501
		502	503	504
		505	506	507
		508	509	510
		511	512	513
		514	515	516
		517	518	519
		520	521	522
		523	524	525
		526	527	528
		529	530	531
		532	533	534
		535	536	537
		538	539	540
		541	542	543
		544	545	546
		547	548	549
		550	551	552
		553	554	555
		556	557	558
		559	560	561
		562	563	564
		565	566	567
		568	569	570
		571	572	573
		574	575	576
		577	578	579
		580	581	582
		583	584	585
		586	587	588
		589	590	591
		592	593	594
		595	596	597
		598	599	600
		601	602	603
		604	605	606
		607	608	609
		610	611	612
		613	614	615
		616	617	618
		619	620	621
		622	623	624
		625	626	627
		628	629	630
		631	632	633
		634	635	636
		637	638	639
		640	641	642
		643	644	645
		646	647	648
		649	650	651
		652	653	654
		655	656	657
		658	659	660
		661	662	663
		664	665	666
		667	668	669
		670	671	672
		673	674	675
		676	677	678
		679	680	681
		682	683	684
		685	686	687
		688	689	690
		691	692	693
		694	695	696
		697	698	699
		700	701	702
		703	704	705
		706	707	708
		709	710	711
		712	713	714
		715	716	717
		718	719	720
		721	722	723
		724	725	726
		727	728	729
		730	731	732
		733	734	735
		736	737	738
		739	740	741
		742	743	744
		745	746	747
		748	749	750
		751	752	753
		754	755	756
		757	758	759
		760	761	762
		763	764	765
		766	767	768
		769	770	771
		772	773	774
		775	776	777
		778	779	780
		781	782	783
		784	785	786
		787	788	789
		790	791	792
		793	794	795
		796	797	798
		799	800	801
		802	803	804
		805	806	807
		808	809	810
		811	812	813
		814	815	816
		817	818	819
		820	821	822
		823	824	825
		826	827	828
		829	830	831
		832	833	834
		835	836	837
		838	839	840
		841	842	843
		844	845	846
		847	848	849
		850	851	852
		853	854	855
		856	857	858
		859	860	861
		862	863	864
		865	866	867
		868	869	870
		871	872	873
		874	875	876
		877	878	879
		880	881	882
		883	884	885
		886	887	888
		889	890	891
		892	893	894
		895	896	897
		898	899	900
		901	902	903
		904	905	

Tabelle 8.6: Patientenkollektiv des zweiten Studienteils mit Bestimmung von NTBI. Teil 2.

ICH		0	0
RPM		0	0
BPD		0	0
NEC		0	0
oxidiertes Coenzym Q10 (µmol/L)		0,144	0,251
reduziertes Coenzym Q10 (µmol/L)		0,333	0,417
Coenzym Q10 (mmol/L)		0,144	0,657
alpha-Tocopherol (µmol/mmol Cholesterin)		7,49	26,31
alpha-Tocopherol (µmol/l)		7,94	33,15
gamma-Tocopherol (µmol/mmol Cholesterin)		3,56	1,51
gamma-Tocopherol (µmol/L)		3,77	1,06
Eisen (mg/dL)		15,6	11,7
vorherige Transfusion (ml)		26	0
orale Eisensupplementation: ja=1, nein=0		0	1
Hämoglobin (g/L)		11,2	8,4
NTBI: positiv=1, negativ=0		1	0
NTBI (µmol/L)		1,791	0,527
Coeruloplasmin (mg/dL)		7	14,2
Cholesterin (mg/dL)		106	118
Malondialdehyd (µmol/L)		0,88	1,3
H 50 (min)		81	58
Gestationsalter (Wochen)		39	38
LT		48	37
Abnahmedatum		06.03.98	24.02.98
Geburtsdatum		19.01.98	14.12.97
Geburtsgewicht (g)		625	3410
SSW		32	34
Name		J.J.-A., ml.	K.L., weibl.
		J.S., ml.	K.H., ml.
		M.C., weibl.	M.C., weibl.
		M.C., weibl.	M.J., weibl.
		M.J., weibl.	N.J., weibl.
		O.-E.S., weibl.	O.-E.S., weibl.
		O.-E.S., weibl.	R.R., weibl.
		S.J., weibl.	S.S., ml.
		S.S., ml.	S.L., ml.
		S.L., ml.	S.L., ml.
		S.R., weibl.	S.X., ml.

9 Danksagung

Für die Überlassung des interessanten Themas, ihre stets freundliche und hilfreiche Unterstützung und Beratung, sowie ihre unendliche Geduld möchte ich von ganzem Herzen Prof. Dr. med. Alfried Kohlschütter und Prof. Dr. med. Hans- Henning Hellwege danken.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Barbara Finckh für die freundschaftliche und umfangreiche Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit.

Für die stets hilfsbereite Unterstützung bei allen laborchemischen Methoden und die Hilfe beim Sammeln, Verarbeiten und Messen der Proben danke ich allen Mitarbeiterinnen des Neurochemischen Stoffwechsellabors, hier besonders Frau Giesecking, Frau Wernicke und Frau Sehringer.

Ein großes Dankeschön gilt meiner Familie, die mir zu jeder Zeit geholfen hat technische wie emotionale Stolpersteine zu meistern und stets ermutigend zur Seite stand.

10 Lebenslauf

Angaben zur Person

Name Birte Julia Sybille Liebig, geb. Schemmel
Adresse Eppendorfer Baum 19
20249 Hamburg

Geburtstag 10. August 1972 in Neumünster
Familienstand verheiratet, 2 Kinder

Schulbildung

1978-1993 Grundschule
1983- 1993 Gymnasium
1989/1990 Schuljahr an der Potomac Senior High, Dumfries, VA, USA
Juni 1993 Abitur

Studium

April 1994 Universität Hamburg
- Dezember 2000

Praktisches Jahr

Oktober 1999- Erster Abschnitt des Praktisches Jahres in der Medizinischen Klinik,
Februar 2000 UKE, Hamburg (Abteilung für Kardiologie und Nephrologie)
Februar-Juni 2000 Zweiter Abschnitt des Praktischen Jahres im Texas Heart Institute, Houston, TX, USA (Herz- und Gefäßchirurgie)
Mai 2000 Rotation im Texas Children's Hospital, Houston, TX, USA (Kinderherzchirurgie/ Kinderkardiologie)
Juni- Oktober 2000 Dritter Abschnitt des Praktischen Jahres in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des FEK, Neumünster

Studienbegleitende Tätigkeiten

August 1997 Promotionsarbeit bei Prof. Kohlschütter und Prof. Hellwege, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin im UKE, Hamburg: Freies Eisen bei kranken Früh- und Neugeborenen und prooxidativ/antioxidatives Gleichgewicht und klinische Befunde bei kranken Frühgeborenen.

Februar- Juni 2000 Studentensprecherin im Texas Heart Institute, Houston, TX, USA

Ärztliche Tätigkeit

Dezember 2000- Juni 2002 AIP in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin im FEK, Neumünster, interdisziplinäre pädiatrische Station und Notfallambulanz
Juni 2002-Juni 2004 interdisziplinäre pädiatrische Station und Notfallambulanz, seit Oktober 2002 Kinderintensiv und Früh- und Neugeborenenstation, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin im FEK, Neumünster
Juni 2004- dato pädiatrische und neonatologische Intensivstation, Klinik für Kinder und Jugendmedizin im UKE
Januar 2006- Juli 2007 Neuropädiatrische Station
Juni 2008 Anerkennung als Facharzt für Kinder- und Jugendmedizin

Weiterbildung

Januar 2001	Grundkurs chirurgische Sonographie, Klinikum Nord, Hamburg
Februar 2002	Fachkunde Rettungsdienst Kompaktkurs in Westerland/Sylt
Juni 2002 und 2003	Immunologische Summer School für Pädiater, Charite Berlin
April 2004	Osterkongress Brixen mit Sonographie für Fortgeschrittene ZNS und Grundkurs Sonographie Säuglingshüfte
März 2005	Facharzt Repetitorium der DGKJ in Berlin
September 2005	Neonatologische Weiterbildung in Blaubeuren

11 Veröffentlichungen

- Finckh B, Boda V, Horn A, Schemmel B, Kohlschütter A** (1998) Reduced and oxidized plasma coenzyme Q10 as part of a complex monitoring of oxidative stress in micro blood samples from preterm babies. Poster
First conference of the International Coenzyme Q10 Association, Boston, 21.-24. Mai 1998.
- Schemmel B, Fischer R, Finckh B, Commentz B, A Kohlschütter, HH Hellwege** (1999) Freies Eisen im Plasma kranker Früh- und Neugeborener; Z.Geburtsh. Neonatologie; 203: 13, 25. Jahrestagung der GNPI, München.
- Schemmel B, Finckh B, Fischer R, Hellwege HH, Kohlschütter A** (2000) Non transferrin-bound iron and antioxidant status in plasma of sick mature and premature neonates, Pediatric Critical Care Medicine Suppl. 83, 3rd World Congress on Pediatric Intensive Care, 25-29. Juni 2000, Montreal, Canada.
- Finckh B, Daniel D, Fischer R, Schemmel B, Kohlschütter A, Hellwege HH** (2000) Non- transferring- bound iron in plasma of premature infants treated with erythropoietin and iron, Ped. Crit. Care, 25-29. Juni 2000, Montreal, Canada.
- Finckh B, Schemmel B, Auhuber A, Hellwege HH, Kohlschütter A** (2003) Antioxidant status and indices of illness severity in premature infants. Free Radical Res; 37: S81, PP66 Society for Free Radical Research Europe Meeting, Ioanina, 26.-29. Juni 2003.
- Finckh B, Auhuber A, Schemmel B, Hellwege HH, Kohlschütter A** (2003) Low antioxidant capacity and illness severity in premature infants. Free Radic Biol Med 35: S131, P417.
- Wetzstein V, Budde U, Oyen F, Ding X, Herrmann J, Liebig B, Schneppenheim R** (2006) Intracranial hemorrhage in a term newborn with severe von Willebrand disease type 3 associated with sinus venous thrombosis. Haematologica 2006; 91 (12): e163-e165.

12 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig 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: