

Aus der Klinik für Neonatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Adulte Blutprodukte in der Neugeborenen-Intensivmedizin –
Ein unterschätztes Risiko?

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Chiara-Aiyleen Badur

aus Berlin

Datum der Promotion: 17. September 2021

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	3
ABSTRACT, DEUTSCH	4
ABSTRACT, ENGLISCH	6
1. EINFÜHRUNG	8
Abbildung 1. Vorhersage von transkriptionellen Bindungsstellen im <i>EPO</i> 5'-Promotor bei Vorliegen des SNP rs1617640.	11
2. ZIELSTELLUNG	12
3. MATERIAL, METHODIK UND ERGEBNISSE	13
3.1. Adulte Spenderblutprodukte als Risikofaktoren für zentralvenöse Katheter-assoziierte Thromboembolien bei Neugeborenen: Eine retrospektive Fall-Kontroll-Studie	13
Abbildung 2. Häufigkeit von Transfusionen vor der Diagnose einer venösen Thromboembolie	15
3.2. Pooling, Raumtemperatur und verlängerte Lagerzeiten erhöhen die Freisetzung von biologisch reaktiven Mediatorproteinen aus Spenderthrombozyten des Erwachsenen: Ein verstecktes Transfusionsrisiko für Neugeborene?	15
3.3. Die Promotor-Variante rs1617640 im Erythropoietin-Gen ist nicht mit einer höhergradigen Retinopathia praematurorum assoziiert, unabhängig von der Behandlung mit rekombinantem humanen Erythropoietin	17
4. DISKUSSION	18
5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	21
6. LITERATURVERZEICHNIS	22
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	26
ANTEILSERKLÄRUNG AN DEN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN	27
DRUCKEXEMPLARE DER PUBLIKATIONEN	28
LEBENS LAUF	69
KOMPLETTE PUBLIKATIONS LISTE	71
DANKSAGUNG	72

Abkürzungsverzeichnis

ATK	Apherese-Thrombozytenkonzentrat
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
BRM	Modifikatoren der biologischen Reaktion (<i>biological response modifiers</i>)
CCL5	<i>Chemokine C-C motif 5 alias RANTES</i>
DKK1	<i>Dickkopf-related protein 1</i>
EPO	Erythropoietin
IPF	Anteil unreifer Thrombozyten (<i>immature platelet fraction</i>)
MPV	Mittleres Thrombozytenvolumen (<i>mean platelet volume</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PlaNeT2	Platelets for Neonatal Transfusion - Study 2
PTK	Pool-Thrombozytenkonzentrat
RCT	Randomisierte kontrollierte Studie (<i>randomized controlled trial</i>)
rhEPO	Rekombinantes humanes Erythropoietin
ROP	Retinopathia praematurorum (Frühgeborenen-Retinopathie)
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
TGF β 1	<i>Transforming Growth Factor β1</i>
TK	Thrombozytenkonzentrat
TSP1	Thrombospondin 1
VTE	(zentral) venöse Thromboembolie

Abstract, Deutsch

Die gegenwärtige SARS-CoV-2 Pandemie verdeutlicht sogar in der Laienpresse die aus einer schweren Infektion und intensivmedizinischer Therapie resultierende Prädisposition für Störungen der Blutgerinnung. Ein hämostaseologisches Ungleichgewicht zwischen Pro- und Antikoagulation erhöht das Risiko für eine Thrombose, Embolie oder Blutung. Während der ersten Lebenswochen und Monate unterliegt die Gerinnungsphysiologie aufgrund von entwicklungsabhängigen Veränderungen der zellulären und plasmatischen Komponenten sehr großen Umstellungen, verbunden mit dem erhöhten Risiko für Blutungen und Thrombosen. Es ist deshalb wichtig, potentielle Störfaktoren zu identifizieren und präventive Maßnahmen, insbesondere zur Vermeidung von Transfusions-assoziierten Komplikationen einzuleiten. Zu solchen Komplikationen zählen neben Thromboembolien bei sehr unreifen Frühgeborenen auch Hirn- und Lungenblutungen, Störungen der Darmperfusion oder die Frühgeborenen-Retinopathie.

In dieser Arbeit werden drei Forschungsprojekte aus dem Gebiet der neonatalen Hämatologie und Transfusionsmedizin betrachtet:

- (i) In einer Fall-Kontroll-Studie konnten einerseits die Transfusion von Blutkomponenten erwachsener Spender und andererseits die Frequenz von Transfusionen nach Anlage eines zentralvenösen Katheters als unabhängige signifikante Risikofaktoren für Thromboembolien identifiziert werden.
- (ii) Sogenannte biologische Reaktionsmodifikatoren aus Spender-Thrombozyten könnten in Abhängigkeit von der Herstellung (Pool-Vollblut *versus* Apherese) und Lagerung (Temperatur und Dauer) unterschiedlich stark freigesetzt werden und Transfusions-assoziierte Krankheitsbilder erklären. Im Vordergrund der eigenen Untersuchung standen biologische Reaktionsmodifikatoren, die aus Thrombozyten des Erwachsenen, jedoch nicht oder nur sehr gering aus Thrombozyten des Neugeborenen freigesetzt werden (CCL5/RANTES, TGF β 1, TSP1 und DKK1). In einem *in vitro* Ansatz konnte nachgewiesen werden, dass diese Proteine besonders stark in Pool-Thrombozyten-Konzentraten sowie – unabhängig von der Herstellung –

vermehrt bei Raumtemperatur (*versus* 4°C) und längerer Lagerungsdauer (> 4 Tage) freigesetzt werden.

- (iii) Bei sehr unreifen Frühgeborenen entwickelt sich regelhaft eine Anämie, die in vielen Fällen eine oder mehrere Transfusionen von Spendererythrozyten erfordert. Die Erythrozytentransfusion ist wiederum mit dem Risiko einer (höhergradigen) Retinopathie assoziiert, welche bis zur Erblindung führen kann. Aus dem pathophysiologisch ähnlichen Krankheitsmodell der diabetischen Retinopathie weiß man, dass eine Variante des *Erythropoietin*-Gens, das bei Anämie zur Stimulation der körpereigenen Blutbildung vermehrt exprimiert wird, die überschießende Gefäßneubildung an der Netzhaut anheizt. Analog dazu wurde die Assoziation dieses *EPO* Polymorphismus an die Häufigkeit und Schwere der Frühgeborenenretinopathie untersucht. In dieser Fall-Kontroll-Studie konnte die *Erythropoietin*-Promotor-Variante rs1617640 jedoch nicht mit dem Auftreten einer höhergradigen ROP assoziiert werden. Der Befund war unabhängig vom zusätzlichen Risikofaktor einer Therapie mit rekombinantem humanem Erythropoietin zur Prävention der Transfusionen.

Aus den Ergebnissen resultieren neue Strategien zur Verringerung Transfusions-assoziiertes Komplikationen, was signifikant zur Verbesserung der Langzeitentwicklung sehr unreifer Frühgeborener, aber auch kranker Reifgeborener beitragen sollte.

Abstract, Englisch

The current SARS-CoV-2 pandemic highlights the predisposition for coagulopathies associated with severe infection and intensive care. A disturbance of the hemostatic balance between pro- and anticoagulation increases the risk of thrombosis, embolism or bleeding. During the first weeks of life, the physiology of hemostasis undergoes significant developmental-stage specific changes of cellular and plasmatic components, correlating with an increased risk of bleeding and thrombosis. It is therefore of particular importance to identify potential disruptive factors and to initiate preventive measures to avoid transfusion-associated complications. In very immature preterm newborns such complications include thromboembolism, cerebral and lung hemorrhage, intestinal malperfusion or retinopathy of prematurity.

Therefore, this dissertation summarizes three main research projects in neonatal hematology and transfusion medicine:

- (i) In a case-control study, the transfusion of adult donor blood components as well as the transfusion frequency after placement of central venous catheters were identified as independent significant risk factors for thromboembolism.
- (ii) The release of biological response modifiers from donor platelets could be influenced by the preparation (pooled whole blood donation *versus* apheresis) and storage conditions (temperature and duration) and thereby cause transfusion-associated complications. We studied biological response modifiers, which are released from adult platelets, but not at all or only in much lower concentrations from neonatal platelets (CCL5/RANTES, TGF β 1, TSP1 und DKK1). The *in vitro* experiments showed that these proteins are released at higher concentrations in pooled platelet concentrates and – independent of preparation – after longer storage time (>4 d) as well as storage at room temperature (*versus* 4°C).
- (iii) Very immature preterm newborns regularly develop an anemia, often requiring one or multiple donor red blood cell transfusions. These transfusions are associated with an increased risk of severe retinopathy, even potentially resulting in blindness. In the pathophysiological similar disease model of

diabetic retinopathy, a variant of the *erythropoietin* gene, which translates into a protein that primarily regulates red blood cell production, has been associated with an increased risk of proliferative diabetic retinopathy. The association of this *EPO* polymorphism was studied in regard to the frequency and severity of retinopathy of prematurity. This case-control study did not show an association between the *erythropoietin* promotor variant rs1617640 and severe retinopathy of prematurity. This was observed independently of recombinant human EPO administration to prevent transfusions.

These findings result in new strategies to reduce transfusion-associated complications, which will contribute considerably to improving the short- and long-term outcomes of very premature as well as sick term newborns.

1. Einführung

Venöse Thromboembolien (VTE) sind seltene, jedoch relevante Komplikationen der neonatologischen Intensivtherapie. Registerdaten zeigten eine Inzidenz der neonatalen VTE und arteriellen Thromboembolien von 24 pro 10.000 Aufnahmen auf der Neugeborenenintensivstation.¹ In den letzten Jahren zeichnete sich eine signifikante Erhöhung der Inzidenz um bis zu 90% ab.² Neugeborene, die eine VTE entwickeln, befinden sich meist ohnehin in einem kritischen Allgemeinzustand, sie haben eine Mortalität von 18%.¹ Obwohl bei Überlebenden niedrige Komplikationsraten beobachtet wurden,³ ist weiterhin unklar, welche Langzeitfolgen (z.B. eine portale Hypertension) zu erwarten sind. Mögliche Risikofaktoren für eine VTE sind eine bakterielle Kolonisation von Kathetern,⁴ ein niedriges Lebensalter bei Katheteranlage, eine lange Katheterliegedauer sowie invasive Beatmung, Operationen, angeborene Herzfehler und angeborene Thrombophilien.^{2,5}

In dem hämostaseologischen System treten während der Neonatalperiode signifikante entwicklungsabhängige Veränderungen auf, welche erst zum Ende des ersten Lebensjahres weitestgehend abgeschlossen sind.⁶ Diese Veränderungen beeinflussen das hämostaseologische Gleichgewicht von pro- und anti-koagulatorischen Faktoren, die Aktivität der Fibrinolyse, die Struktur und Funktion verschiedenster Gerinnungsproteine (z.B. von-Willebrand-Faktor) und die Reaktivität von Thrombozyten.⁷ Das exakt abgestimmte Gleichgewicht der neonatalen Hämostase kann leicht gestört werden. Beispielsweise kommt es beim Kontakt von hyporeaktiven neonatalen Thrombozyten mit adultem Plasma *in vitro* zu einer verkürzten Adrenalinverschlusszeit im Thrombelastogramm und zu einer Hyperkoagulierbarkeit.⁸ Eine retrospektive Kohortenstudie zeigte, dass in 15% der Fälle nach Transfusion von adultem Gefrierplasma ein thromboembolisches Ereignis eintrat.⁹

Adulte Spender-Thrombozyten werden häufig bei einer Thrombozytopenie von Früh- und Reifgeborenen transfundiert, um Blutungen zu verhindern oder zu stoppen. In einer kürzlich erschienenen Publikation konnte jedoch weder eine Assoziation zwischen Thrombozytenzahl und Blutungsrisiko noch eine Verringerung der Blutungen durch prophylaktische Thrombozytentransfusionen bestätigt werden.¹⁰ Zusätzlich zeigte kürzlich eine randomisierte kontrollierte Studie (RCT) zum Grenzwert für eine Thrombozytentransfusion bei sehr unreifen Frühgeborenen (*Platelets for Neonatal*

Transfusion - Study 2, PlaNeT2), dass bei thrombozytopenischen Frühgeborenen mit prophylaktischer Thrombozytentransfusion ab einem liberalen Grenzwert von $< 50 \times 10^9/L$ eine signifikant höhere Todesrate und häufiger schwere Blutungen im Vergleich zu einem restriktiven Grenzwert von $< 25 \times 10^9/L$ auftraten.¹¹ Ein weiteres RCT, dass die Thrombozytentransfusion als unterstützende Maßnahme zur Therapie des persistierenden Ductus arteriosus Botalli bei Frühgeborenen untersuchte, zeigte, dass liberale Transfusionsgrenzen signifikant häufiger zur intraventrikulären Hämorrhagie führten.¹² Entgegen der allgemeinen Annahme zeigen diese Daten, dass Thrombozytentransfusionen Frühgeborene und kranke Reifgeborene schädigen können.¹³

Die genauen Mechanismen, durch die Thrombozytentransfusionen zu einer Störung der Gerinnungsphysiologie führen, sind noch weitgehend unbekannt. Vor allem in der Erwachsenen-Intensivmedizin werden Aspekte wie die Transmission von Infektionskrankheiten, eine Transfusions-assoziierte Lungenschädigung und eine Volumenüberlastung als mögliche Pathomechanismen diskutiert. Im Vergleich zu Erwachsenen wurde in der Pädiatrie eine erhöhte Inzidenz von allergischen Transfusionsreaktionen beobachtet.¹⁴ Neugeborene, die in der PlaNeT2 Studie zu der Behandlungsgruppe mit liberaler Transfusionsgrenze gehörten, entwickelten eine erhöhte Rate von bronchopulmonaler Dysplasie (BPD) als mit restriktiver Transfusionsgrenze.¹¹ Die Befunde zur Thrombozytentransfusions-assoziierten Morbidität und Mortalität deuten darauf hin, dass adulte Thrombozytenkonzentrate (TK) durch eine Störung des Gleichgewichtes im sich noch entwickelnden hämostatischen Systems und/oder durch (pro-)inflammatorische Effekte zu Organschädigungen führen.¹⁵

Zu möglichen Ursachen, die dieses Gleichgewicht stören und somit nicht-infektiöse Komplikationen nach Thrombozyten-Transfusionen triggern, gibt es verschiedene Hypothesen. Im Vordergrund steht die Frage nach der Akkumulation von Molekülen, welche aus Spenderthrombozyten freigesetzt werden. Hierzu gehören (pro-)inflammatorische Mediatoren, Mikropartikel, Membranlipide und Modifikatoren der biologischen Reaktion (BRM, *biological response modifier*). Dies führt zu der Hypothese, dass vor allem solche BRMs, die in adulten Thrombozyten im Vergleich zu neonatalen Thrombozyten verstärkt exprimiert werden, eine wichtige Rolle spielen. Von besonderem Interesse sind hierbei CCL5, (*chemokine (C-C motif) ligand 5 alias Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed, and Secreted=RANTES*), *Transforming Growth*

Factor β 1 (TGFβ1), *Thrombospondin 1* (TSP1) und *Dickkopf-related protein 1* (DKK1) (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Martha C. Sola-Visner, Harvard Medical School, 2016/03/25). Diese Proteine befinden sich in den α-Granula der Thrombozyten¹⁶⁻¹⁹ und regulieren die Rekrutierung und/oder Aktivierung unterschiedlicher, immunologisch aktiver Zellen,²⁰⁻²⁴ wodurch sie sowohl die Megakaryopoese als auch die Angiogenese inhibieren.^{24,25} CCL5 wurde bereits im Rahmen von Transfusionsreaktionen untersucht,²⁶⁻²⁸ und bei TGFβ1 und TSP1 zeigte sich eine Assoziation mit der BPD sowie der Frühgeborenen-Retinopathie (ROP).²⁹ Bislang war unklar, ob die Freisetzung solcher BRMs durch die Art der Thrombozyten-Präparation oder die Lagerungsbedingungen (Temperatur, Lagerungszeit) beeinflusst werden.

Die höhergradige ROP ist bei sehr unreifen Frühgeborenen mit einem schlechten entwicklungs-neurologischen *Outcome* assoziiert.³⁰ Die Behandlung mit rekombinantem humanen Erythropoietin (rhEPO) zur Prävention der Frühgeborenenanämie, sowie erhöhte intravitreale oder im Kreislauf zirkulierende endogene Erythropoietin-Konzentration (EPO) ab Lebenstag 14 könnten mit dem Risiko einer höhergradigen ROP (Stadium $\geq 3^\circ$) assoziiert sein.³¹⁻³³ In transgenen Mausmodellen zeigte EPO einen pro-angiogenen Effekt in der proliferativen Phase der Retinopathie,³⁴⁻³⁶ während in der Initialphase der ROP exogenes rhEPO in sich entwickelnden Mäusen die Retina vor Gefäßverlust schützte.³⁵ Bei Erwachsenen mit einem Typ-2 Diabetes konnte die *EPO* Genvariante rs1617640 mit einer schwerwiegenden proliferativen retinalen Vaskulopathie und einer 7-fach erhöhten intravitrealen EPO-Proteinkonzentration assoziiert werden.³⁷ Bei der Genvariante rs1617640 findet sich in der 5'-Promotorregion des *EPO*-Gens ein *single nucleotide polymorphism* (SNP), bei dem das T-Allel eine Bindungsstelle für verschiedene Transkriptionsfaktoren schafft, wodurch experimentell die *EPO* Transkription stimuliert wird (Abbildung 1).^{37,38}

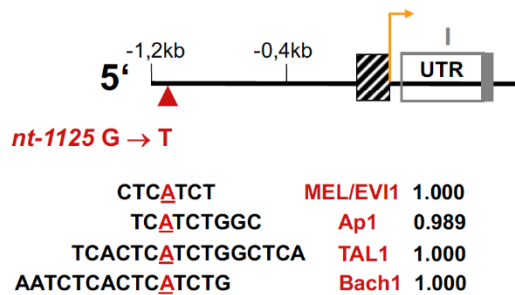


Abbildung 1. Vorhersage von transkriptionellen Bindungsstellen im *EPO* 5'-Promotor bei Vorliegen des SNP rs1617640. Es sind die potenziellen Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren und ihre in silico vorhergesagte Bindungs-Wahrscheinlichkeit dargestellt. (Rau, C. Relevanz des Polymorphismus rs1617640 im Promotor des Erythropoietin-Gens bei Frühgeborenen mit schwerer Retinopathie [Dissertation]. 2016.³⁸)

Bisher unerforscht war, ob der *EPO* Polymorphismus rs1617640 mit einem erhöhten Risiko für eine (höhergradige) ROP des Frühgeborenen assoziiert ist und wie sich bei Vorliegen des Risikoallels zusätzlich eine Behandlung mit rhEPO zur Prävention bzw. Behandlung der Frühgeborenenanämie auswirken könnte.

2. Zielstellung

Im ersten Projekt sollten mittels einer Fall-Kontroll-Studie mögliche Ursachen für eine Störung der Blutgerinnung, die bei sehr unreifen Frühgeborenen und kranken Reifgeborenen zu Katheter-assoziierten VTEs führten, untersucht werden. In dieser Analyse sollte auf die mögliche Relevanz der adulten Blutprodukte (Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentrat sowie Blutplasma) sowie veränderter Gerinnungs- und Entzündungsparameter bei der Entwicklung zentralvenöser Katheter-assoziiierter Thrombosen fokussiert werden. Diese Analyse soll dazu beitragen, Strategien für die zukünftige Vermeidung bzw. Verringerung dieser Komplikationen der neonatologischen Intensivtherapie zu entwickeln.

Im zweiten Projekt sollte in einem translationalen Forschungsansatz geklärt werden, ob Thrombozytentransfusionen deshalb ein besonderer Risikofaktor für VTEs sind, weil aus den gelagerten und aktivierten Thrombozyten bestimmte sogenannte *biological response modifiers* freigesetzt werden, die das Gerinnungssystem des Neugeborenen signifikant beeinflussen könnten. Im Vordergrund der Untersuchung standen deshalb BRMs, die in adulten Thrombozyten im Vergleich zu neonatalen Thrombozyten verstärkt exprimiert werden. Zu ihnen zählen CCL5, TGF β 1, TSP1 und DKK1. Ziel der Untersuchung war es, die Freisetzung dieser Faktoren in Abhängigkeit von der jeweiligen Technik der Aufbereitung (aus Apherese gewonnene Thrombozytenkonzentrate oder aus Vollblut gewonnene gepoolte TKs) und Lagerung (Temperatur, Dauer) der Thrombozytenkonzentrate zu messen.

Im dritten Teilprojekt sollte mittels einer Fall-Kontroll-Studie die mögliche Assoziation eines Polymorphismus im 5'-Promotor des *EPO*-Gens (SNP rs1617640), die mit einer höheren intravitrealen *EPO* Proteinkonzentration einhergehen kann, mit der höhergradigen ROP des Frühgeborenen (mit *versus* ohne rh*EPO*-Therapie der Frühgeborenenanämie) geklärt werden.

In der Zusammenschau aller drei Teilprojekte war es das übergeordnete Ziel, Komplikationen der intensivmedizinischen Behandlung, insbesondere in Zusammenhang mit transfusionsmedizinischen Maßnahmen, bei sehr unreifen Frühgeborenen und kranken Reifgeborenen tiefgründiger zu analysieren. Dies soll dazu beitragen, Therapie-Konzepte zu optimieren und die langfristige neurologische und psychomotorische Entwicklung der Kinder zu verbessern.

3. Material, Methodik und Ergebnisse

3.1. Adulte Spenderblutprodukte als Risikofaktoren für zentralvenöse Katheter-assoziierte Thromboembolien bei Neugeborenen: Eine retrospektive Fall-Kontroll-Studie

In dieser retrospektiven Fall-Kontroll-Studie analysierten wir, mit welchen Risikofaktoren bei Neugeborenen mit zentralvenösen Kathetern die Bildung einer VTE assoziiert ist. Hierfür wurden alle Neugeborene, die auf unseren Intensivstationen, in dem 10-Jahreszeitraum vom 01. Januar 2006 bis zum 31. Dezember 2016 aufgenommen wurden, in die Studie eingeschlossen, wenn sie bei liegendem zentralvenösem Katheter eine Thromboembolie entwickelt hatten. Es ergab sich eine Fallgruppe von 25 Neonaten, zu denen jeweils ein Kontrollpatient zugeordnet wurde. Als möglicherweise ursächliche Variablen wurden u.a. das Gestationsalter, alle Diagnosen, Katheteranlage und -typ, Zeitpunkt der Diagnose der Thrombose (sonographisch oder durch eine Autopsie bestätigt), Lokalisation des Thrombus, sowie Koagulations- und Infektionsparameter analysiert. Zusätzlich erfolgte eine detaillierte Untersuchung der Transfusion von Blutprodukten während zwei definierter Zeiträume: a) vor Katheteranlage sowie b) zwischen Katheteranlage und Diagnose der Thrombose. Die demographischen Daten der Patienten sind in Tabelle 1 (s. S. 47; *Table 1* des Originalmanuskriptes) dargestellt.

Um den Zusammenhang zwischen mutmaßlichen Risikofaktoren und einer VTE zu erkennen, wurde eine Zeitleiste erstellt, die mit dem Tag der Geburt beginnt und mit der Entlassung oder Verlegung des Patienten endet (s. S. 46; *Figure 1* des Originalmanuskriptes).

Unsere Studie bestätigt eine allgemein niedrige Inzidenz (0,26 %) von zentralvenösen Katheter-assoziierten VTE.¹ Routinemäßig erfolgt allerdings kein Screening auf Thromboembolien. Daher ist es möglich, dass asymptomatische Verläufe einer VTE nicht dokumentiert wurden und somit zu einer falsch niedrigen Inzidenz beitragen. Da die Hämostase signifikanten, entwicklungsabhängigen Veränderungen unterliegt, haben wir an das Gestationsalter angepasste Referenzwerte für den Gerinnungsscreen verwendet.³⁹⁻⁴¹ Es fanden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede der Gerinnungsparameter zwischen den beiden Gruppen (s. S. 51-52; *Table 2* im *Supplemental Digital Content 2* des Originalmanuskriptes). Es zeigte sich, dass Frühgeborene (n=16) häufiger als Reifgeborene (n=9) von einer Katheter-assoziierten

VTE betroffen waren. Die VTE war im Vergleich zur Kontrollgruppe mit längeren Krankenhausaufenthalten verbunden (Fallgruppe Median 52 d, Zeitspanne 24 bis 240 d; Kontrollgruppe Median 39 d, Zeitspanne 1 bis 143 d). In der Fallgruppe führten insgesamt 28 Katheter zu einer VTE, welche sich am häufigsten in der Vv. cava inferior und femoralis bildeten (s. S. 48; *Table 2* des Originalmanuskriptes und s. S. 50; *Table 1* im *Supplemental Digital Content 1* des Originalmanuskriptes). Da in der Kontrollgruppe keine VTE diagnostiziert wurde, wurden alle Katheteranlagen während des gesamten Krankenhausaufenthaltes berücksichtigt (n=47). Am häufigsten (n=5) kam es in der Fallgruppe zwei Tage nach Katheteranlage zur Thrombose; die mediane Zeitspanne betrug 6,5 Tage. Um zu vergleichen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Katheteranlage und einer Thrombose gibt, wurde für die Kontrollgruppe ein Beobachtungszeitraum von 7 Tagen ab dem Zeitpunkt der Katheteranlage definiert. Zusätzlich untersuchten wir den Zusammenhang zwischen Katheter-assoziiertes Bakteriämie und Thrombose. Anders als erwartet, zeigten sich in den beiden Gruppen keine signifikanten Assoziationen zwischen erhöhten Inflammationsparametern oder Katheter-assoziierten Bakteriämien und VTE, obwohl Inflammation und Sepsis in der Literatur wiederholt als Risikofaktoren für VTEs dargestellt werden.

Um ein besseres Verständnis über den möglichen Einfluss von adulten Spenderblutprodukten, die über einen eigenen, peripheren venösen Zugang verabreicht werden, auf das Risiko für eine Thrombose zu erlangen, wurde jeder Transfusionsvorgang analysiert. Hierbei zeigte sich, dass 24 von 25 Neugeborene der Fallgruppe und 19 von 25 Neugeborene der Kontrollgruppe Transfusionen von Blutkomponenten erhielten. Die Odds-Ratio für Transfusionstherapien vor Katheteranlage war in der Fallgruppe (OR 7,58, 95% Konfidenzintervall 0,84 – 68,46) größer als in der Kontrollgruppe, jedoch ohne statistische Signifikanz. Die Gesamtzahl der Transfusionen während dieser Zeiträume war in der Fallgruppe (44 Erythrozyten-, 61 Plasma- und 18 Thrombozyten-Transfusionen) gegenüber der Kontrollgruppe (26/24/11) um das 1,92-fache erhöht ($p < 0,001$). Die statistische Analyse zeigte jedoch unter Berücksichtigung der Art des Spenderblutproduktes keine Unterschiede (s. S. 49; *Table 3* des Originalmanuskriptes). Zusätzlich ließ sich eine Erhöhung der Transfusionsfrequenz in den Tagen vor VTE Diagnose darstellen (Abbildung 2, siehe auch S. 53; *Figure im Supplemental Digital Content 3* der des Originalmanuskriptes).

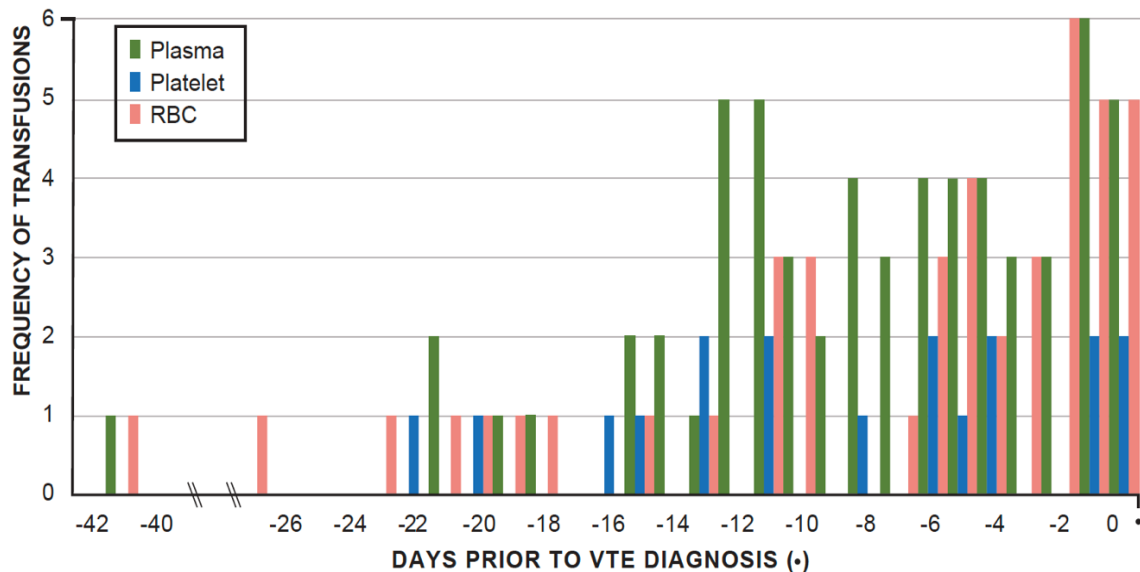


Abbildung 2. Häufigkeit von Transfusionen vor der Diagnose einer venösen Thromboembolie. (Badur CA, Bühner C, Dame C. Adult Donor Blood Products as Risk Factors for Central Venous Catheter-associated Thromboembolism in Neonates: A Retrospective Case-Control Study. J Pediatr Hematol Oncol. 2021. Figure im Supplemental Digital Content 3 der Originalpublikation: <http://links.lww.com/JPHO/A380>.⁴²⁾

Zusammengefasst weisen unsere Daten darauf hin, dass die Transfusion von Blutkomponenten des Erwachsenen ein besonderer Risikofaktor für Katheter-assoziierte zentralvenöse Thromboembolien bei Neugeborenen ist.

3.2. Pooling, Raumtemperatur und verlängerte Lagerzeiten erhöhen die Freisetzung von biologisch reaktiven Mediatorproteinen aus Spenderthrombozyten des Erwachsenen: Ein verstecktes Transfusionsrisiko für Neugeborene?

In dieser Studie untersuchten wir, ob entwicklungsabhängig exprimierte BRMs in Thrombozytenkonzentraten freigesetzt werden und ob die Freisetzung durch die Aufbereitungsmethode (Pool- und Apherese-Thrombozytenkonzentrate - PTKs und ATKs) und verschiedene Lagerungskonditionen (Dauer und Temperatur) beeinflusst wird. Hierfür wurden Leukozyten-depletierte, unbestrahlte PTKs und ATKs unter Agitation entweder bei Raumtemperatur (22°C) oder gekühlt (2-8°C) bis zu 7 Tage gelagert. Details zu den Spenderpräparaten sind in den *Supplements* dargelegt (s. S. 63; *Table 1* im *Supplement* der Originalpublikation). Aliquots der TKs wurden an Tag 1 (nur ATKs), 2, 3, 4 und 7 untersucht. Als ausgewählte BRMs wurden CCL5/RANTES, TGFβ1, TSP1 und DKK1 im Überstand der TKs, im Thrombozyten-Lysat und im Plasma des TKs gemessen. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe eines *Enzyme-linked*

Immunosorbent Assays (DuoSet ELISAs, R&D Systems, Minneapolis, USA) bestimmt. Die Absorption wurde mit einem iMARK *Microplate Absorbance Reader* (Bio-Rad, Feldkirchen, Germany) gemessen (s. S. 63; *Table 2* im *Supplement* der Originalpublikation). Die Thrombozytenfunktion wurde mittels Lichttransmissionsaggregometrie beurteilt (s. S. 63, *Table 3* im *Supplement* der Originalpublikation). Andere laborchemische Parameter, wie das mittlere Thrombozytenvolumen (MPV) und die unreife Thrombozytenfraktion (IPF), wurden mit einem automatisierten Hämatologie-Analysegerät (SYSMEX SN-1000, Kobe, Japan) bestimmt. Die Entzündungsparameter Interleukin-6 (IL-6) und C-reaktives Protein (CRP) wurden mittels Elecsys IL-6 (Cobas e801 Modul) und CRP Gen.3 Probe (Cobas c701 Modul, Roche, Mannheim, Germany) im Thrombozytenkonzentrat-Überstand und im Lysat bestimmt. Die Qualität des TKs wurde durch die Beobachtung des sogenannten *swirling* (englisch Wolkenbildung) bei leichtem Schwenken, pH Messung und Sterilität nach 7-tägiger Bebrütung überprüft.

In den TKs, die bei 4°C gelagert wurden, zeigte sich initial eine Erhöhung des MPVs (s. S. 56, *Table 1* der Originalpublikation), was am ehesten auf die kälteinduzierte Konformationsänderung der Thrombozyten zurückzuführen ist. Außerdem wurde in diesen TKs eine verminderte Lichttransmission gemessen, die wahrscheinlich durch eine erhöhte Aggregation der Thrombozyten verursacht wurde. Eine erhöhte hämostatische Wirksamkeit bei niedrigeren Temperaturen konnte in unserer Studie nicht beobachtet werden. Die Konzentration der Entzündungsparameter war unter den Versuchsbedingungen unter der Nachweisgrenze bzw. *per definitionem* negativ (s. S. 64; *Table 4 und 5* im *Supplement* der Originalpublikation).

Von besonderer Relevanz war die Analyse der BRMs, da hier signifikante Unterschiede gefunden werden konnten. Initial wurde eine höhere Konzentration von DKK1 in Pool *versus* Apherese-TKs gemessen. Im Überstand der Pool-TKs zeigten sich signifikant erhöhte Werte von CCL5, TGFβ1, TSP1 und DKK1 sowohl nach einer normalen Lagerungszeit von ≤ 4 Tagen als auch nach verlängerter Lagerungszeit von 7 Tagen (s. S. 57-58; *Figures 1-4* der Originalpublikation). Die Konzentrationen von allen vier BRMs waren bei Raumtemperatur unter Standardbedingungen bis zu einem zweifachen Anstieg messbar. Die Thrombozytenfunktion zeigte in der Aggregometrie trotz verschiedener Konditionen keine Unterschiede (s. S. 59; *Figure 5* der Originalpublikation).

3.3. Die Promotor-Variante rs1617640 im Erythropoietin-Gen ist nicht mit einer höhergradigen Retinopathia praematurorum assoziiert, unabhängig von der Behandlung mit rekombinantem humanen Erythropoietin

In dieser Fall-Kontroll-Studie stellten wir die Frage, ob die *Erythropoietin*-Promotor-Variante rs1617640 mit dem Risiko einer höhergradigen ROP assoziiert ist. Anhand einer 1-zu-2 Allokation wurden alle *very low birth weight* (Geburtsgewicht unter 1500 g) Frühgeborene mit einer ROP $\geq 3^\circ$ (mit/ohne PLUS-Zeichen), die in einem 11-Jahreszeitraum an unserer Klinik behandelt wurden, eingeschlossen. 72 Patienten wurden in die Fallgruppe eingeschlossen und 114 Frühgeborenen mit einer niedrigeren ROP Ausprägung ($0^\circ/1^\circ$) anhand von Geburtsgewicht, Gestationsalter bei Geburt und Geschlecht gegenübergestellt (s. S. 66; *Table 1* der Originalpublikation). Die Extraktion der genomischen DNA erfolgte aus den archivierten Trockenblutkarten des Neugeborenen Screenings (Ethikantrag EA2/051/09, erweitert ROP_02_11). Patienten DNA wurde mit der NucleoSpin™ -Säule (Macherey-Nagel) aufgereinigt. Ein 394 bp Produkt der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) des *EPO* 5'-Promoters (NCBI No. NM_007933.15, nt 38349923 to nt 38350316) wurde mittels des Primer Sets *EPOS*NPfw 5'-GTCCATTGTGCAGGACACAC-3' und *EPOS*NPre 5'-AAGGATCTTCCTGCCTTG-3' amplifiziert. Die PCR Produkte wurden in einem 16-Kapillar 3130xl Genanalysator (ABI PRISM® 3130; Applied Biosystems) sequenziert. Das detaillierte Protokoll ist in der Originalpublikation beschrieben.

Frühgeborene mit einem sehr niedrigen Gestationsalter (24-26 Wochen) hatten ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung einer höhergradigen ROP. Zusätzlich stellte sich in der Fallgruppe eine erhöhte Prävalenz von Indikatoren der Frühgeborenenmorbidity (Dauer der mechanischen Beatmung, postnatale Steroide, Rate der intraventrikulären Blutungen) dar. Die Anzahl der Frühgeborenen, die Erythrozytentransfusionen erhielten, war in beiden Gruppen fast identisch, jedoch zeigte sich in der Fallgruppe (ROP $\geq 3^\circ$) ein frühzeitiger Beginn, eine signifikant erhöhte Anzahl sowie ein signifikant größeres Gesamtvolumen der Transfusionen (jeweils $p < 0,001$). Die Behandlung mit rhEPO war nicht mit einer erhöhten Inzidenz der ROP $\geq 3^\circ$ (s. S. 66; *Table 1* der Originalpublikation) assoziiert. Die homozygote TT Variante der *Erythropoietin*-Promotor-Variante rs1617640 trat jedoch in beiden Gruppen genauso häufig auf, und es zeigte sich keine Assoziation zwischen dem T-Risikoallel und der höhergradigen ROP (s. S. 66; *Table 2* der Originalpublikation).

4. Diskussion

Die Ergebnisse der drei Studien zeigen, dass Störungen der Hämatopoese und transfusionsmedizinische Interventionen mit einem erhöhten Risiko für die (Langzeit-) Morbidität sehr unreifer Frühgeborener, aber auch kranken Reifgeborener assoziiert sind. Präventive Maßnahmen zur Vermeidung von Komplikationen wie Katheter-assoziierten VTEs oder Transfusions-assoziierten Krankheitsbildern wie der BPD oder ROP sind deshalb Gegenstand der aktuellen translationalen Forschung in der Neonatologie.

Unsere Studie über Katheter-assoziierte Thrombosen bestätigt zwar eine eher niedrige Inzidenz (0,26%) dieser Komplikation, dennoch führt sie zu einer relevanten Morbidität der betroffenen Patienten.¹ Obwohl Inflammation und Sepsis als häufigste Ursache der Katheter-assoziierten VTE angesehen werden,⁶ fanden wir in dieser Fall-Kontroll-Studie überraschenderweise einen solchen direkten Zusammenhang nicht. Unsere Untersuchungen zeigen allerdings, dass VTEs mit einer zeitnahen und häufigen Applikation von (adulten) Spenderblutprodukten assoziiert sind. In der Fall-Kontroll-Studie war in der Fallgruppe die Anzahl der Transfusionen zwischen Katheteranlage und VTE Diagnose deutlich erhöht und zusätzlich die Anzahl der Erythrozyten- und Plasmatransfusionen höher. Unerwarteterweise war dagegen die Anzahl der Thrombozytentransfusionen in beiden Untersuchungsgruppen gleich. Transfusionen werden in unserer Klinik immer über einen separaten peripheren venösen Verweilkatheter verabreicht, und Heparin wird in die Infusionslösung der zentralen Venenkatheter hinzugefügt, sodass diese Faktoren keine Kovariable für die Bildung einer VTE darstellen sollten. Der Gerinnungsscreen war nicht geeignet, um ein prothrombotisches Risiko vorherzusagen. Wir folgern aus der Studie, dass die neonatale Hämostase so wenig wie möglich durch die Gabe von Blutkomponenten (Erythrozyten-, Thrombozyten- und Plasmakonzentrat) aus dem Gleichgewicht gebracht werden sollte. Tatsächlich zeigen aktuelle RCTs, dass restriktive Transfusionsgrenzen entweder mit dem gleichen *Outcome* oder im Falle der Thrombozyten-Transfusion sogar mit einem besseren *Outcome* assoziiert sind.^{11,43} Um das Risiko für Transfusions-assoziierte Komplikationen, wie der VTE, zu verringern, sind weitere translationale Studien erforderlich, die die genauen Mechanismen (z.B. Voraktivierung durch Temperatur oder Enzyme) identifizieren, über die Blutprodukte des Erwachsenen die neonatale Hämostase modifizieren und diese in ein folgenschweres Ungleichgewicht bringen.

Diesem Konzept folgend war es von großem Interesse zu beleuchten, wie spezielle, entwicklungsabhängig exprimierte Faktoren, die mit der Transfusion in den Blutstrom gelangen, ein Risiko für eine Störung der Hämostase sind. In einem *in vitro* Ansatz wurde deshalb die Freisetzung von speziellen BRMs in TKs untersucht. Dabei wurden vier BRMs (CCL5/RANTES, TGF β 1, TSP1 und DKK1) untersucht, die in adulten Thrombozyten stark, jedoch in neonatalen Thrombozyten nicht oder nur sehr gering vorhanden sind. Von besonderer Relevanz ist die Erkenntnis, dass die Konzentration der vier BRMs in Apherese TKs während kürzerer und kühlerer Lagerung am niedrigsten ist. In Bezug auf die Neugeborenenintensivmedizin ist jedoch zu beachten, dass die in kühleren Temperaturen gelagerten TKs auch mehr Mikropartikel enthalten könnten,⁴⁴ welche als Risikofaktor für eine Transfusions-assoziierte nekrotisierende Enterokolitis diskutiert werden.

Interessant ist aber die Betrachtung der einzelnen BRMs, da sie als Kandidaten-Proteine für das erhöhte Thrombose- oder auch Blutungsrisiko angesehen werden, wenn adulte Komponenten in den neonatalen Blutstrom transfundiert werden^{15,45,46} CCL5 wirkt pro-inflammatorisch,²² lockt unter anderem Lymphozyten, Neutrophile und Basophile an und induziert eine Histaminausschüttung der Basophilen sowie eine Degranulation der Eosinophilen.^{47,48} Erhöhte CCL5 Konzentrationen könnten zu allergischen Reaktionen nach TK Transfusion führen.²⁶⁻²⁸ TGF β 1 ist ein potenter Inhibitor der Megakaryopoese und erhöhte Konzentrationen in TKs könnten somit für die Normalisierung der Thrombozytenzahl kontraproduktiv sein.²⁵ TSP1 wirkt pro-und antikoagulatorisch und hat zusammen mit TGF β 1 zusätzlich einen Einfluss auf die Angiogenese, wodurch sie potentiell auch an der Pathogenese der ROP und BPD beteiligt sein könnten.^{24,29} Auch DKK1 wirkt pro-inflammatorisch, erhöht nachweislich die Thrombozyten-vermittelte Freisetzung von entzündlichen Zytokinen aus dem Endothel und könnte zur Transfusions-assoziierten Morbidität bei Neonaten beitragen.^{20,49}

Unsere Studie weist auf Strategien hin, wie durch die Art der Herstellung des TKs, dessen Lagerungstemperatur und –dauer die Exposition kranker Neugeborener gegenüber BRMs reduziert werden kann. Es bleibt also im nächsten Schritt zu testen, inwiefern die erhöhte Freisetzung tatsächlich, beispielsweise im Mausmodell, das Risiko der Transfusions-assoziierten Nebenwirkungen verändert. Perspektivisch wird sich auch zeigen, ob restriktivere Transfusionsrichtlinien zu niedrigeren Inzidenzen von Katheter-assoziierten venösen Thrombosen führen werden.

Die klinische Relevanz der *Erythropoietin*-Promotor-Variante rs1617640 konnte in Studien über Erwachsene mit proliferativer diabetischer Retinopathie und terminaler Niereninsuffizienz nachgewiesen werden.⁵⁰ In unserer Studie zeigten wir jedoch, dass dieser Polymorphismus (SNP) weder mit der Inzidenz der ROP (alle Stadien) noch der Häufigkeit einer höhergradigen ROP assoziiert ist. Zusätzlich fanden wir, dass eine Therapie mit rhEPO bei Säuglingen mit dem TT Risiko-Allel nicht zu der Entwicklung einer höhergradigen ROP führte. Dies deutet darauf hin, dass rhEPO sicherer zu sein scheint als in der vorherigen, zwischenzeitlich revidierten, Metaanalyse von Aher und Ohlsson³¹ und der Warnung des Paul-Ehrlich-Instituts⁵¹ angenommen. Interessanterweise scheinen bestimmte BRMs, vor allem TSP1 und TGF β 1, eine Auswirkung auf die Pathogenese der ROP zu haben.^{24,29} Diese Befunde legen nahe, dass die Behandlung mit rhEPO zur Vermeidung von Transfusionen wieder einen neuen Stellenwert bekommen könnte, zumal die *post-hoc* Analyse *Preterm Erythropoietin Neuroprotection Trial* (PENUT) kürzlich gezeigt hat, dass bei *extremely low birth weight* (Geburtsgewicht unter 1500 g) Frühgeborenen so die Transfusionshäufigkeit und -volumina signifikant gesenkt werden können.⁵²

5. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend könnten die Ergebnisse der hier angeführten Studien zu einer Verminderung der Transfusions-assoziierten Morbidität beitragen. Durch restriktivere Transfusionsstrategien sollte nicht nur das Risiko für venöse Thrombosen, sondern auch das Blutungsrisiko, welches aus dem Ungleichgewicht im Gerinnungssystem infolge der Anwendung von Spenderblutprodukten des Erwachsenen resultiert, verringert werden. Es wird die Aufgabe weiterer translationaler und klinischer Studien sein, zu überprüfen, ob durch eine Verminderung der Freisetzung bestimmter BRMs, die die Biologie des Thrombozyten des Erwachsenen charakterisieren, Komplikationen der Thrombozyten-Transfusion verringert werden können. Bei Anämie besteht zusätzlich die Option einer Behandlung mit rekombinantem humanen Erythropoietin, das offensichtlich auch bei Vorliegen eines *EPO* 5'-Promotor Polymorphismus, der die intravitrealen *EPO*-Konzentrationen erhöhen könnte, ohne eine Zunahme der Inzidenz der (höhergradigen) ROP angewendet werden kann.

6. Literaturverzeichnis

1. Schmidt B, Andrew M. Neonatal thrombosis: report of a prospective Canadian and international registry. *Pediatrics*. 1995;96(5 Pt 1):939-943.
2. Boulet SL, Grosse SD, Thornburg CD, Yusuf H, Tsai J, Hooper WC. Trends in venous thromboembolism-related hospitalizations, 1994-2009. *Pediatrics*. 2012;130(4):e812-820.
3. Bhatt MD, Patel V, Butt ML, Chan AKC, Paes B, Thrombosis and Hemostasis in Newborns (THiN) Group. Outcomes following neonatal portal vein thrombosis: a descriptive, single-center study and review of anticoagulant therapy. *Pediatr Blood Cancer*. 2019;66(4):e27572.
4. Saracco P, Bagna R, Gentilomo C, Magarotto M, Viano A, Magnetti F, Giordano P, Luciani M, Molinari AC, Suppiej A, Ramenghi LA, Simioni P, Neonatal Working Group of Registro Italiano Trombosi I. Clinical data of neonatal systemic thrombosis. *J Pediatr*. 2016;171:60-66 e61.
5. Avila ML, Amiri N, Stanojevic S, Vu TT, Barron K, Krol P, Yue N, Williams S, Brandao LR. Can thrombophilia predict recurrent catheter-related deep vein thrombosis in children? *Blood*. 2018;131(24):2712-2719.
6. Haley KM. Neonatal venous thromboembolism. *Front Pediatr*. 2017;5:136.
7. Will A. Neonatal haemostasis and the management of neonatal thrombosis. *Br J Haematol*. 2015;169(3):324-332.
8. Ferrer-Marin F, Stanworth S, Josephson C, Sola-Visner M. Distinct differences in platelet production and function between neonates and adults: implications for platelet transfusion practice. *Transfusion*. 2013;53(11):2814-2821; quiz 2813.
9. Puetz J, Witmer C, Huang YS, Raffini L. Widespread use of fresh frozen plasma in US children's hospitals despite limited evidence demonstrating a beneficial effect. *J Pediatr*. 2012;160(2):210-215 e211.
10. Fustolo-Gunnink SF, Huisman EJ, van der Bom JG, van Hout FMA, Makineli S, Lopriore E, Fijnvandraat K. Are thrombocytopenia and platelet transfusions associated with major bleeding in preterm neonates? A systematic review. *Blood Rev*. 2019;36:1-9.
11. Curley A, Stanworth SJ, Willoughby K, Fustolo-Gunnink SF, Venkatesh V, Hudson C, Deary A, Hodge R, Hopkins V, Lopez Santamaria B, Mora A, Llewelyn C, D'Amore A, Khan R, Onland W, Lopriore E, Fijnvandraat K, New H, Clarke P, Watts T, PlaNeT2 MATISSE Collaborators. Randomized trial of platelet-transfusion thresholds in neonates. *N Engl J Med*. 2019;380(3):242-251.
12. Kumar J, Dutta S, Sundaram V, Saini SS, Sharma RR, Varma N. Platelet transfusion for PDA closure in preterm infants: a randomized controlled trial. *Pediatrics*. 2019;143(5).
13. Fustolo-Gunnink SF, Roehr CC, Lieberman L, Christensen RD, Van Der Bom JG, Dame C, Del Vecchio A, Keir AK, Curley A, Stanworth SJ, Lopriore E. Platelet and red cell transfusions for neonates: lifesavers or Trojan horses? *Expert Rev Hematol*. 2019;12(10):797-800.
14. Oakley FD, Woods M, Arnold S, Young PP. Transfusion reactions in pediatric compared with adult patients: a look at rate, reaction type, and associated products. *Transfusion*. 2015;55(3):563-570.
15. Margraf A, Nussbaum C, Sperandio M. Ontogeny of platelet function. *Blood Adv*. 2019;3(4):692-703.

16. Klinger MH, Wilhelm D, Bubel S, Sticherling M, Schroder JM, Kuhnel W. Immunocytochemical localization of the chemokines RANTES and MIP-1 alpha within human platelets and their release during storage. *Int Arch Allergy Immunol.* 1995;107(4):541-546.
17. Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem.* 1983;258(11):7155-7160.
18. Voorzanger-Rousselot N, Goehrig D, Facon T, Clezardin P, Garnero P. Platelet is a major contributor to circulating levels of Dickkopf-1: clinical implications in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2009;145(2):264-266.
19. Jaffe EA, Leung LL, Nachman RL, Levin RI, Mosher DF. Thrombospondin is the endogenous lectin of human platelets. *Nature.* 1982;295(5846):246-248.
20. Chae WJ, Ehrlich AK, Chan PY, Teixeira AM, Henegariu O, Hao L, Shin JH, Park JH, Tang WH, Kim ST, Maher SE, Goldsmith-Pestana K, Shan P, Hwa J, Lee PJ, Krause DS, Rothlin CV, McMahon-Pratt D, Bothwell AL. The Wnt antagonist Dickkopf-1 promotes pathological type 2 cell-mediated inflammation. *Immunity.* 2016;44(2):246-258.
21. Guo Y, Mishra A, Howland E, Zhao C, Shukla D, Weng T, Liu L. Platelet-derived Wnt antagonist Dickkopf-1 is implicated in ICAM-1/VCAM-1-mediated neutrophilic acute lung inflammation. *Blood.* 2015;126(19):2220-2229.
22. Marques RE, Guabiraba R, Russo RC, Teixeira MM. Targeting CCL5 in inflammation. *Expert Opin Ther Targets.* 2013;17(12):1439-1460.
23. Kajdaniuk D, Marek B, Borgiel-Marek H, Kos-Kudla B. Transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) in physiology and pathology. *Endokrynol Pol.* 2013;64(5):384-396.
24. Lopez-Dee Z, Pidcock K, Gutierrez LS. Thrombospondin-1: multiple paths to inflammation. *Mediators Inflamm.* 2011;2011:296069.
25. Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA. Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood.* 2000;96(6):2022-2036.
26. Kluter H, Bubel S, Kirchner H, Wilhelm D. Febrile and allergic transfusion reactions after the transfusion of white cell-poor platelet preparations. *Transfusion.* 1999;39(11-12):1179-1184.
27. Wakamoto S, Fujihara M, Kuzuma K, Sato S, Kato T, Naohara T, Kasai M, Sawada K, Kobayashi R, Kudoh T, Ikebuchi K, Azuma H, Ikeda H. Biologic activity of RANTES in apheresis PLT concentrates and its involvement in nonhemolytic transfusion reactions. *Transfusion.* 2003;43(8):1038-1046.
28. Savage WJ, Savage JH, Tobian AA, Thoburn C, Hamilton RG, Schroeder JT, Ness PM. Allergic agonists in apheresis platelet products are associated with allergic transfusion reactions. *Transfusion.* 2012;52(3):575-581.
29. Stark A, Dammann C, Nielsen HC, Volpe MV. A pathogenic relationship of bronchopulmonary dysplasia and retinopathy of prematurity? A review of angiogenic mediators in both diseases. *Front Pediatr.* 2018;6:125.
30. Glass TJA, Chau V, Gardiner J, Foong J, Vinall J, Zwicker JG, Grunau RE, Synnes A, Poskitt KJ, Miller SP. Severe retinopathy of prematurity predicts delayed white matter maturation and poorer neurodevelopment. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2017;102(6):F532-F537.
31. Aher SM, Ohlsson A. Late erythropoietin for preventing red blood cell transfusion in preterm and/or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014(4):CD004868.

32. Holm M, Skranes J, Dammann O, Fichorova RN, Allred EN, Leviton A. Systemic endogenous erythropoietin and associated disorders in extremely preterm newborns. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2016;101(5):F458-463.
33. Sato T, Kusaka S, Shimojo H, Fujikado T. Vitreous levels of erythropoietin and vascular endothelial growth factor in eyes with retinopathy of prematurity. *Ophthalmology.* 2009;116(9):1599-1603.
34. Manzoni P, Maestri A, Gomirato G, Takagi H, Watanabe D, Matsui S. Erythropoietin as a retinal angiogenic factor. *N Engl J Med.* 2005;353(20):2190-2191; author reply 2190-2191.
35. Chen J, Connor KM, Aderman CM, Smith LE. Erythropoietin deficiency decreases vascular stability in mice. *J Clin Invest.* 2008;118(2):526-533.
36. Yang N, Zhang W, He T, Xing Y. Exogenous erythropoietin aggravates retinal neovascularization in a murine model of proliferative retinopathy. *Turk J Med Sci.* 2017;47(5):1642-1650.
37. Tong Z, Yang Z, Patel S, Chen H, Gibbs D, Yang X, Hau VS, Kaminoh Y, Harmon J, Pearson E, Buehler J, Chen Y, Yu B, Tinkham NH, Zabriskie NA, Zeng J, Luo L, Sun JK, Prakash M, Hamam RN, Tonna S, Constantine R, Ronquillo CC, Satta S, Avery RL, Brand JM, London N, Anduze AL, King GL, Bernstein PS, Watkins S, Genetics of D, Diabetic Complication Study G, Jorde LB, Li DY, Aiello LP, Pollak MR, Zhang K. Promoter polymorphism of the erythropoietin gene in severe diabetic eye and kidney complications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(19):6998-7003.
38. Rau C. *Relevanz des Polymorphismus rs1617640 im Promotor des Erythropoietin-Gens bei Frühgeborenen mit schwerer Retinopathie* [Dissertation]. Berlin: Klinik für Neonatologie, Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin; 2016.
39. Andrew M, Paes B, Milner R, Johnston M, Mitchell L, Tollefsen DM, Powers P. Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood.* 1987;70(1):165-172.
40. Andrew M, Paes B, Milner R, Johnston M, Mitchell L, Tollefsen DM, Castle V, Powers P. Development of the human coagulation system in the healthy premature infant. *Blood.* 1988;72(5):1651-1657.
41. Monagle P, Barnes C, Ignjatovic V, Furmedge J, Newall F, Chan A, De Rosa L, Hamilton S, Ragg P, Robinson S, Auldish A, Crock C, Roy N, Rowlands S. Developmental haemostasis. Impact for clinical haemostasis laboratories. *Thromb Haemost.* 2006;95(2):362-372.
42. Badur CA, Bühner C, Dame C. Adult donor blood products as risk factors for central venous catheter-associated thromboembolism in neonates: a retrospective case-control study. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2021;43(2):e255-e259.
43. Franz AR, Engel C, Bassler D, Rudiger M, Thome UH, Maier RF, Krageloh-Mann I, Kron M, Essers J, Bühner C, Rellensmann G, Rossi R, Bittrich HJ, Roll C, Hohn T, Ehrhardt H, Avenarius S, Korner HT, Stein A, Buxmann H, Vochem M, Poets CF, Etno Investigators. Effects of liberal vs restrictive transfusion thresholds on survival and neurocognitive outcomes in extremely low-birth-weight infants: the ETTNO randomized clinical trial. *JAMA.* 2020;324(6):560-570.
44. Johnson L, Tan S, Jenkins E, Wood B, Marks DC. Characterization of biologic response modifiers in the supernatant of conventional, refrigerated, and cryopreserved platelets. *Transfusion.* 2018;58(4):927-937.
45. Dame C, Lorenz V, Sola-Visner M. Fetal and Neonatal Megakaryopoiesis and Platelet Biology. In: Schulze H, Italiano J, eds. *Molecular and Cellular Biology of*

- Platelet Formation: Implications in Health and Disease*. Cham: Springer International Publishing; 2016:267-291.
46. Maheshwari A, La Gamma EF. Fundamentals of fetoneonatal immunology and its clinical relevance. In: Buonocore G, Bracci R, Weindling M, eds. *Neonatology: A Practical Approach to Neonatal Diseases*. Milano: Springer Milan; 2012:830-847.
 47. Alam R, Stafford S, Forsythe P, Harrison R, Faubion D, Lett-Brown MA, Grant JA. RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. *J Immunol*. 1993;150(8 Pt 1):3442-3448.
 48. Kuna P, Reddigari SR, Schall TJ, Rucinski D, Viksman MY, Kaplan AP. RANTES, a monocyte and T lymphocyte chemotactic cytokine, releases histamine from human basophils. *J Immunol*. 1992;149(2):636-642.
 49. Ueland T, Otterdal K, Lekva T, Halvorsen B, Gabrielsen A, Sandberg WJ, Paulsson-Berne G, Pedersen TM, Folkersen L, Gullestad L, Oie E, Hansson GK, Aukrust P. Dickkopf-1 enhances inflammatory interaction between platelets and endothelial cells and shows increased expression in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(8):1228-1234.
 50. Li H, Xu H, Li Y, Zhao D, Ma B. Associations between erythropoietin polymorphisms and risk of diabetic microvascular complications. *Oncotarget*. 2017;8(68):112675-112684.
 51. Paul-Ehrlich-Institut und Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte. Erythropoietin – zusätzliches Risiko einer Retinopathie bei Frühgeborenen nicht auszuschließen. In: 3 ed: Bulletin zur Arzneimittelsicherheit; 2015:3-6.
 52. Juul SE, Comstock BA, Wadhawan R, Mayock DE, Courtney SE, Robinson T, Ahmad KA, Bendel-Stenzel E, Baserga M, LaGamma EF, Downey LC, Rao R, Fahim N, Lampland A, Frantz II ID, Khan JY, Weiss M, Gilmore MM, Ohls RK, Srinivasan N, Perez JE, McKay V, Vu PT, Lowe J, Kuban K, O'Shea TM, Hartman AL, Heagerty PJ, Penut Trial Consortium. A randomized trial of erythropoietin for neuroprotection in preterm infants. *N Engl J Med*. 2020;382(3):233-243.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Chiara-Aiyleen Badur, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Adulte Blutprodukte in der Neugeborenen-Intensivmedizin – Ein unterschätztes Risiko? [Englisch: Adult donor blood products in neonatal intensive care – an underestimated risk?] selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den 21.12.2020

Chiara-Aiyleen Badur

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Chiara-Aiyleen Badur hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Chiara-Aiyleen Badur, Christoph Bühner, Christof Dame. Adult Donor Blood Products as Risk Factors for Central Venous Catheter-associated Thromboembolism in Neonates: A Retrospective Case-Control Study. Journal of Pediatric Hematology/Oncology, 2021

Erstautorenschaft. Gemeinsame Ausarbeitung des Studienprotokolls und -designs sowie Verfassen des Ethikantrages, eigenständige Datenerhebung aus den Patientenakten und Datenauswertung, aus meiner statistischen Auswertung sind alle Tabellen und Abbildungen des Manuskriptes entstanden, Ausarbeitung und Verfassen der ersten, sowie der nach Revision angenommenen Version des Manuskriptes.

Publikation 2: Miriam Waubert de Puiseau, Lina K. Sciesielski, Oliver Meyer, Zhi-Jian Liu, Chiara-Aiyleen Badur, Helge Schönfeld, Rudolf Tauber, Axel Pruß, Martha C. Sola-Visner, Christof Dame. Pooling, Room Temperature, and Extended Storage Time Increase the Release of Adult-specific Biologic Response Modifiers in Platelet Concentrates: A Hidden Transfusion Risk for Neonates? Transfusion, 2020

Co-Autorenschaft. Gemeinsame Ausarbeitung des Studienprotokolls und -designs sowie Verfassen des Ethikantrages, Aufarbeitung und Qualitätsprüfung der Thrombozytentransfusionen und Durchführung der Messungen, die in der Tabelle 1 und Abbildungen 1-4 dargestellt sind, Beteiligung an der Ausarbeitung des Manuskriptes.

Publikation 3: Christof Dame, Lina K Sciesielski, Carolin Rau, Chiara-Aiyleen Badur, Christoph Bühner. The Erythropoietin Promoter Variant rs1617640 Is Not Associated with Severe Retinopathy of Prematurity, Independent of Treatment with Erythropoietin, Journal of Pediatrics, 2018

Co-Autorenschaft. Eigenständige Datenerhebung aus den Patientenakten für die Bearbeitung der Revision des Manuskriptes, die Auswertung dieser Daten ist in den Tabellen 1 und 2 dargestellt, Beteiligung an der Ausarbeitung und der Revision des Manuskriptes.

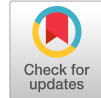
Chiara-Aiyleen Badur

Druckexemplare der Publikationen



Due to copyright reasons, only the final version of the manuscript for peer-review could be included in the print version.

Published article:

Badur CA, Bühler C, Dame C. Adult donor blood products as risk factors for central venous catheter-associated thromboembolism in neonates: a retrospective case-control study. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2021;43(2):e255-e259. URL: <https://doi.org/10.1097/MPH.0000000000001821>



Pooling, room temperature, and extended storage time increase the release of adult-specific biologic response modifiers in platelet concentrates: a hidden transfusion risk for neonates?

Miriam Waubert de Puiseau,^{1,†} Lina K. Sciesielski ,^{1,†} Oliver Meyer,² Zhi-Jian Liu,³ Chiara-Aiyelen Badur,¹ Helge Schönfeld,⁴ Rudolf Tauber,⁴ Axel Pruf,² Martha C. Sola-Visner,³ and Christof Dame ¹

BACKGROUND: Adult donor platelets (PLTs) are frequently transfused to prevent or stop bleeding in neonates with thrombocytopenia. There is evidence for PLT transfusion-related morbidity and mortality, leading to the hypothesis on immunomodulatory effects of transfusing adult PLTs into neonates. Candidate factors are biologic response modifiers (BRMs) that are expressed at higher rates in adult than in neonatal PLTs. This study investigated whether storage conditions or preparation methods impact on the release of those differentially expressed BRMs.

STUDY DESIGN AND METHODS: Pooled PLT concentrates (PCs) and apheresis PCs (APCs) were stored under agitation for up to 7 days at room temperature (RT) or at 2 to 8°C. The BRMs CCL5/RANTES, TGFβ1, TSP1, and DKK1 were measured in PCs' supernatant, lysate, and corresponding plasma. PLT function was assessed by light transmission aggregometry.

RESULTS: Concerning the preparation method, higher concentrations of DKK1 were found in pooled PCs compared to APCs. In supernatants, the concentrations of CCL5, TGFβ1, TSP1, and DKK1 significantly increased, both over standard (≤4 days) and over extended storage times (7 days). Each of the four BRMs showed an up to twofold increase in concentration after storage at RT compared to cold storage (CS). There was no difference in the aggregation capacity.

CONCLUSION: This analysis shows that the release of adult-specific BRMs during storage is lowest in short- and CS APCs. Our study points to strategies for reducing the exposure of sick neonates to BRMs that can be specifically associated to PLT transfusion-related morbidity.

ABBREVIATIONS: ADP = adenosine diphosphate; APC(s) = apheresis-derived platelet concentrate(s); BPD = bronchopulmonary dysplasia; BRM = biologic response modifier(s); CCL5 = chemokine C-C motif 5 *alias* RANTES; CRP = C-reactive protein; CS = cold storage; DKK1 = Dickkopf-related protein 1; IL-6 = interleukin-6; LoD = limit of detection; PPC(s) = pooled platelet concentrate(s); RCT = randomized controlled trial; RT = room temperature; TGFβ1 = transforming growth factor β1; TSP1 = thrombospondin 1.

From the ¹Klinik für Neonatologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin; the ²Institute of Transfusion Medicine, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany; the ³Division of Newborn Medicine, Department of Pediatrics, Boston Children's Hospital and Harvard Medical School, Boston/MA, USA; and ⁴Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie Charité - Universitätsmedizin Berlin, and Labor Berlin Charité Vivantes GmbH, Berlin.

Address reprint requests to: Christof Dame, MD, Department of Neonatology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz 1, D-13353 Berlin, Germany; e-mail: christof.dame@charite.de.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

[†]MWdP and LKS contributed equally to the project.

The Charité is corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health.

The authors thank the Verein für frühgeborene Kinder an der Charité e.V. for co-funding the study.

This article was published online on 27 April 2020. An error was subsequently identified in the authors list and authors affiliations section. This notice is included in the online and print versions to indicate that both have been corrected 3 June 2020.

Received for publication February 12, 2020; revision received March 30, 2020, and accepted March 31, 2020.

doi:10.1111/trf.15827

© 2020 The Authors. *Transfusion* published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of AABB.

TRANSFUSION 2020;60:1828–1836

Thrombocytopenia and hemorrhage are frequent issues in very preterm or sick neonates.¹ To prevent or to stop bleeding in neonates with thrombocytopenia, adult donor platelets (PLTs) are commonly transfused.² However, neither a causal association between PLT count and bleeding risk nor a reduction of bleedings by prophylactic PLT transfusion could be confirmed in a recent systematic review.³ Most recently, the randomized controlled trial (RCT) on PLTs for Neonatal Transfusion (PlaNeT2) showed that among preterm infants with thrombocytopenia those who received a prophylactic PLT transfusion at a threshold of $50 \times 10^9/L$ had a significantly higher rate of death or major bleeding than those neonates with a restrictive PLT transfusion threshold of $25 \times 10^9/L$.⁴ In another RCT on PLT transfusion for closure of a patent ductus arteriosus in preterm infants, liberal PLT transfusion thresholds were associated with a significantly higher rate of intraventricular hemorrhage.⁵ Thus, against common beliefs, clinical data indicate that PLT transfusions may indeed harm preterm and sick term neonates.⁶

The exact cause for the association between PLT transfusion and adverse outcomes is unknown. More generally, transmission of infectious diseases, transfusion-related lung injury, and transfusion-related circulatory overload were repeatedly discussed, especially in adult intensive care. In pediatric patients, PLT transfusion was associated with an increased incidence of allergic transfusion reactions when compared to adults.⁷ In neonates, PlaNeT2 showed increased rates of bronchopulmonary dysplasia (BPD) in infants randomly assigned to the high-threshold PLT transfusion group.⁴ The higher risk of hemorrhage and the increased rate of BPD associated with a PLT transfusion in infants suggest that adult donor PLTs lead to organ damage as consequence of disturbances in the developing hemostatic system and/or of reactive proinflammatory properties.⁸

The accumulation of various molecules released from donor PLTs, such as (pro-) inflammatory mediators, microparticles, membrane lipids, and biologic response modifiers (BRMs) has been theorized as cause for noninfectious adverse events after PLT transfusion. This theory is even more relevant for neonates, since certain BRMs were found at higher concentrations in adult than in neonatal PLTs. Such BRMs include chemokine C-C motif 5 (CCL5 *alias* Regulates on Activation Normal T cell Expressed and Secreted [RANTES]), Transforming growth factor $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), thrombospondin 1 (TSP1), and Dickkopf-related protein 1 (DKK1). These proteins are present in the PLT's alpha-granule⁹⁻¹² and have the capacity to regulate recruitment and/or activation of various immune cells,¹³⁻¹⁷ inhibiting both megakaryopoiesis and angiogenesis.^{17,18} Among these proteins, CCL5 has previously been studied in transfusion reactions,¹⁹⁻²¹ and both TGF $\beta 1$ and TSP1 have

been found to be associated with BPD and retinopathy of prematurity.²² This raises the question of whether such BRMs are released from stored adult donor PLTs and if the release is impacted by PLT preparation (apheresis-derived PLT concentrates [APCs] or whole blood-derived pooled PLT concentrates [PPCs]) and storage conditions (time, temperature).

MATERIALS AND METHODS

PCs

Both PPCs, prepared by the buffy coat method, and APCs were leukoreduced and nonirradiated.²³ PLTs were stored in clot-preventing additive solutions (Supplement S1, available as supporting information in the online version of this paper). PCs were limited to blood group O, while Rh factor status or sex were not considered. Analysis was started when the PCs would have been available for transfusion. Matched pairs of APCs and nonmatched pairs of PPCs were stored either at 22°C (room temperature [RT]) or at 2 to 8°C (cold storage [CS]), both with constant horizontal agitation. PCs were sampled on Days 1 (only APCs), 2, 3, 4, and 7.

Blood count and immature PLT fraction

Blood count variables, including mean PLT volume (MPV) and immature PLT fraction values, were determined by an automated hematology analyzer (SN-1000, Sysmex).

PC supernatants and lysates, analysis of IL-6 and C-reactive protein

Platelet supernatants were collected by centrifugation at $3000 \times g$ for 10 minutes at RT and stored in aliquots at $-80^\circ C$ until enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) were performed. Corresponding PLT lysates were prepared by an optimized freeze-thaw method.²⁴ PC lysates were cleared from cellular components by centrifugation at $3000 \times g$ for 5 minutes at RT and stored at $-80^\circ C$. Interleukin 6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP) concentrations were determined using the Elecsys IL-6 (on Cobas e801 analyzer) and CRP Gen.3 assay (on Cobas c701 analyzer, all Roche), respectively.

ELISA

Concentrations of CCL5, TGF $\beta 1$, TSP1, and DKK1 were determined in supernatants and lysates, as well as in plasma of the APC donor, using DuoSet ELISAs (R&D Systems). Absorbance was read with a microplate absorbance reader (iMARK, Bio-Rad). Samples were diluted in reagent diluent (Supplement S2, available as supporting information in the online version of this paper).

Light transmission aggregometry

For light transmission aggregometry, a fresh 600- μ L aliquot of PC was centrifuged at $939 \times g$ without brake for 7 minutes at 37°C. The pellet was resuspended in 1 mL of suspension buffer (Supplement S3, available as supporting information in the online version of this paper). The PLT count was measured with an analyzer (KX 21 N, Sysmex), and suspension buffer was added to achieve a final PLT concentration of $250 \times 10^9/L$. Before testing, PLTs rested for 60 to 70 minutes at 37°C with manual agitation every 15 minutes. Light transmission aggregometry was performed using an aggregometer (PAP-4 series, Biodata Corporation) with collagen (final concentration 10 μ g/L) and thrombin receptor-activating peptide 6 (TRAP6; final concentration 0.1 mmol/L, both from HART Biologica).

Swirling, pH, and sterility

To verify the quality of the PC, the presence of swirling was assessed and the pH was determined by soaking pH paper. Sterility of the PCs was evaluated after 7 days in an automated blood culture system (BacT/ALERT, bioMérieux).

Statistical analysis

Data were analyzed with computer software (SPSS Statistics 22, IBM Corp.). Two-way analysis of variance (ANOVA) was used to examine differences over time between the four groups and each condition and for comparing standard versus extended storage time. Longitudinal changes were examined by Friedman's test (K-linked sample analysis). The t test was used to investigate differences in PLT count and MPV between conditions at each time point.

Ethical approval

Approval for the study was given by the institutional review board (EA2/152/17).

RESULTS

Swirling, sterility, and pH

At the initiation of the experiments, swirling was assessed in each PC. PCs stored at RT retained their swirling throughout the whole storage time, unlike CS PCs where no swirling could be observed from 24 hours of CS onward. A 7-day incubation in a blood culture system confirmed sterility in each PC on Day 7 of storage. In all PCs, pH values did not change from initiation with a mean (range) of 7.0 (6.5-7.3) to 6.9 (6.6-7.4) on the final trial day.

Blood count, MPV, and immature PLT fraction

To evaluate degradation or changes in the shape of PLTs during the entire storage time, PLT count and MPV were determined comparing both the methods of preparation and the different types and times of storage. Generally, the measured PLT counts and MPV were higher in PPCs than in APCs, that is, at both RT and CS and at all times (Table 1). Comparing time points of storage, significantly higher PLT counts and MPV were measured 24 hours after initiation of CS compared to baseline values in both CS PPCs and APCs, but not at RT. Both variables remained stable during the later course of storage. For CS PPCs and APCs, PLT counts and MPV also did not change after return to RT (data not shown). Baseline values varied 1) between different PPCs ($2.5 \pm 1.1\%$) and 2) between the APCs of the

TABLE 1. PLT count and MPV during storage time*

	Baseline (at initiation of storage)		24 hours (after initiation of storage)	Day 4	Day 7
A. PLT count					
RT APC	821 \pm 154		789 \pm 105	777 \pm 110	807 \pm 109
p value		NS			
RT PPC	1055 \pm 263		1074 \pm 300	1046 \pm 282	1043 \pm 252
p value		NS			
CS APC	858 \pm 118		989 \pm 79	961 \pm 137	962 \pm 114
p value		0.004			
CS PPC	1044 \pm 138		1290 \pm 121	1307 \pm 187	1290 \pm 130
p value		<0.001			
B. MPV					
RT APC	9.2 \pm 0.5		9.1 \pm 0.5	9.0 \pm 0.4	9.1 \pm 0.5
p value		NS			
RT PPC	9.6 \pm 0.4		9.8 \pm 0.3	9.8 \pm 0.3	10.1 \pm 1.1
p value		NS			
CS APC	9.2 \pm 0.5		9.9 \pm 0.6	10.0 \pm 0.5	10.1 \pm 0.7
p value		0.003			
CS PPC	9.4 \pm 0.2		10.3 \pm 0.3	10.5 \pm 0.4	10.9 \pm 0.3
p value		<0.001			

* Absolute values (A, $\times 10^9/L$; B, fL) are presented as mean \pm SD, n = 6 in each group. Significance (p < 0.05) was determined by paired t test. NS = not significant.

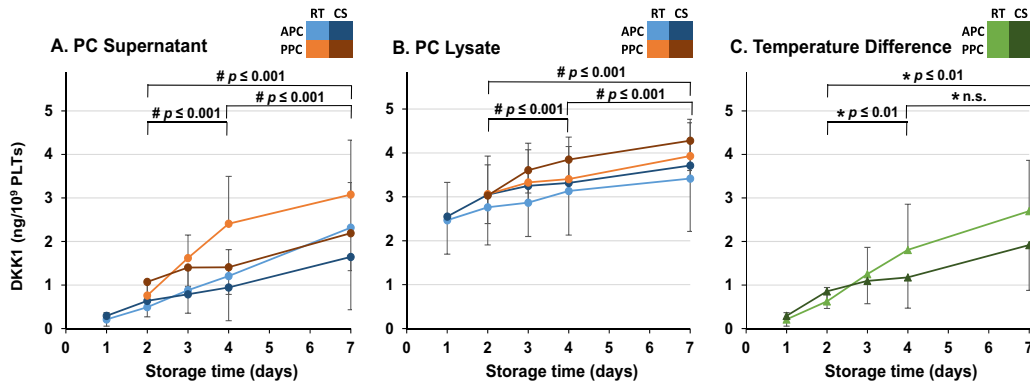


Fig. 1. Concentration of DKK1 in PC supernatant (A, C) and lysate (B), when comparing preparation and storage temperature (A/B; n = 6) or storage temperature alone (C; n = 12). Mean ± SD. *Two-way repeated-measures ANOVA; #Friedman test. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

individual donors (1.5 ± 1.0%), but showed no significant changes over storage time (data not shown).

IL-6 and CRP

IL-6 and CRP concentrations were measured to evaluate whether the amount of standard inflammatory markers varied depending on PC preparation method, storage time, or storage temperature. In 50% of specimens, the concentration of IL-6 (as early inflammatory marker protein) was found slightly above the limit of detection (LoD) of the assay (LoD 1.5 ng/L, range of measured values <1.5-3.6 ng/L). This finding was equally distributed between PPCs versus APCs and RT versus CS (Supplement S4, available as supporting information in the online version of this paper). In 96% of supernatants from PPCs, CRP (as unspecific late inflammatory marker

protein) was present at concentrations above LoD (LoD, 0.3 mg/L; maximal value measured, 1.2 mg/L), while detectable CRP was found only in 20% of APC supernatants (Supplement S5, available as supporting information in the online version of this paper). This difference was significant (p < 0.001). However, the concentrations of both IL-6 and CRP were extremely low in all specimens (data not shown), suggesting lack of any clinical significance.

CCL5, TGFβ1, TSP1, and DKK1

CCL5, TGFβ1, TSP1, and DKK1 concentrations were determined to examine whether the putative release of BRMs from PLT's alpha-granules varies depending on the preparation method, storage time, or storage temperature. To reduce the influence of varying PLT counts, the protein

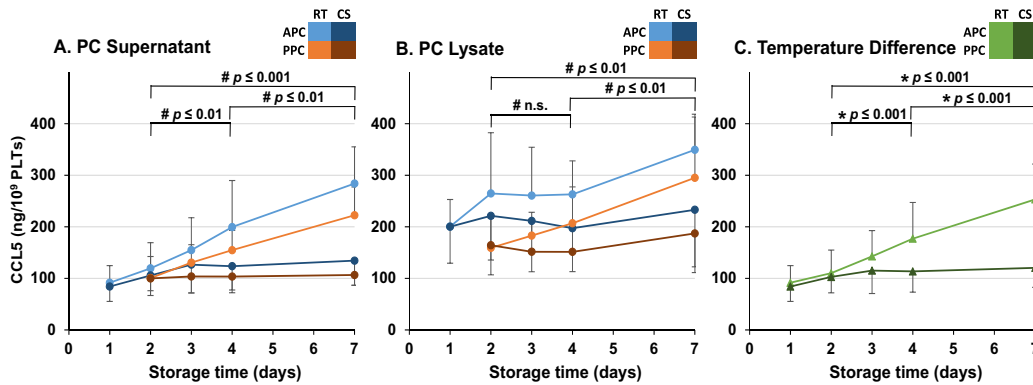


Fig. 2. Concentration of CCL5 in PC supernatant (A, C) and lysate (B), when comparing preparation and storage temperature (A/B; n = 6) or storage temperature alone (C; n = 12). Mean ± SD. *Two-way repeated-measures ANOVA, #Friedman test. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

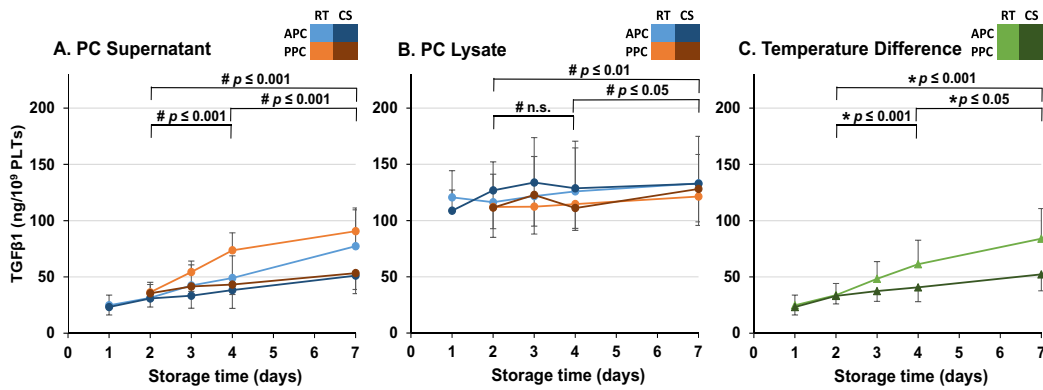


Fig. 3. Concentration of TGFβ1 in PC supernatant (A, C) and lysate (B), when comparing preparation and storage temperature (A/B; n = 6) or storage temperature alone (C; n = 12). Mean ± SD. *Two-way repeated measures ANOVA; #Friedman test. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

concentrations were normalized to the initial PLT count of each PC. All four BRMs were measured at concentrations far above the LoD in both lysates and supernatants (Figs. 1-4), but below (TGFβ1, DKK1) or just above (CCL5, TSP1) the LoD in the donor's plasma (data not shown).

At the initiation (Day 2), only the concentration of DKK1 differed significantly with higher baseline concentration in PPCs than in APCs (Fig. 1A). Depending on the preparation method and the storage conditions, both in PC supernatants and in PC lysates, specific patterns of changes in CCL5, TGFβ1, TSP1, and DKK1 concentrations were observed. In PC supernatants, a significant increase of CCL5, TGFβ1, TSP1, and DKK1 was observed over both standard (Days 2-4) and extended (Days 2-7) storage times (Figs. 1-4).

At all time points, the mean concentration of all four BRMs was higher in lysate than in supernatant. In contrast to PC supernatant, the concentrations of CCL5 and TGFβ1 in PC lysates showed a significant increase only over extended storage time, but not during standard storage time (Figs. 2B and 3B). There was no significant change in the concentration of TSP1 in lysates of PCs (Fig. 4B). The concentration of all four alpha-granule proteins with higher expression in adult PLTs increased significantly more in RT PCs than in CS PCs over both standard and extended storage times (Figs. 1C-4C). Notably, the direct comparison between undetectable/very low BRM concentrations in the donor's plasma and those from PC supernatant and PLT lysate indicates that the BRMs were indeed released from the stored PLTs.

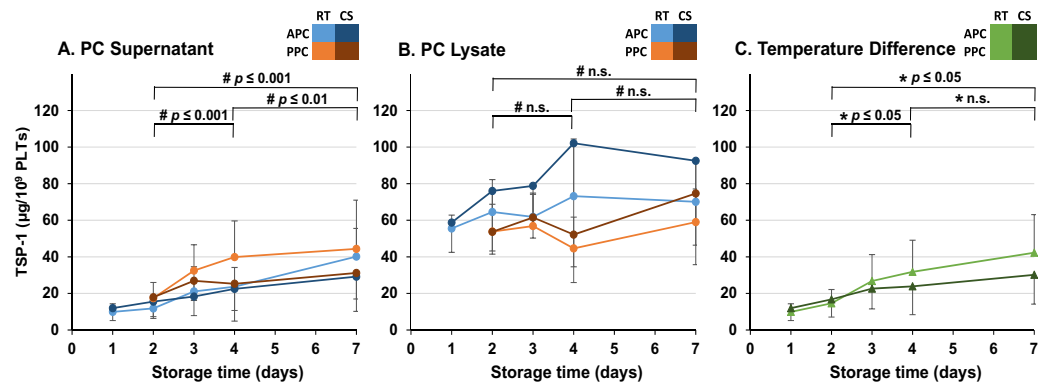


Fig. 4. Concentration of TSP-1 in PC supernatant (A, C) and lysate (B), when comparing preparation and storage temperature (A/B; n = 6) or storage temperature alone (C; n = 12). Mean ± SD. *Two-way repeated-measures ANOVA, #Friedman test. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

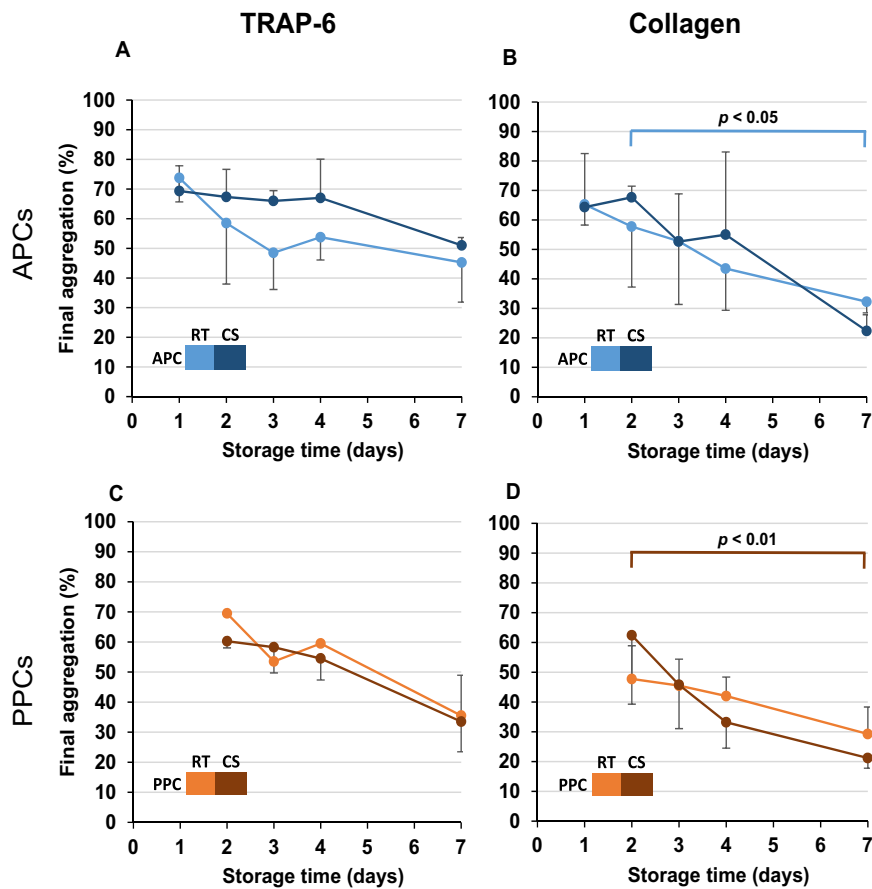


Fig. 5. Light transmission aggregometry. Final aggregation (%) with TRAP-6 (0.1 mmol/L) and collagen (10 µg/L) as agonists, when analyzing the decrease in APCs at RT or in CS (A/B, n = 3-5) as well as PPCs at RT or in CS (C/D, n = 3-5). Mean ± SD. #Friedman test. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

PLT function test

Light transmission aggregometry was used for monitoring PLT function. In CS, PCs PLT counts increased after at least 24 hours of CS (Table 1). During storage time, both APCs and PPCs showed a decrease of the final aggregation with both agonists tested (TRAP6 and collagen; Fig. 5), which was generally pronounced, but significant only if activation was performed with collagen. However, this phenomenon was obvious only in APCs stored at RT and in PPCs stored at 4°C (Figs. 5B and 5D). Since the type of PLT preparation had no effect on final aggregation (data not shown), the question of the impact of temperature on PLT function was addressed by comparing PLT function in RT versus CT APCs (Figs. 5A and 5B) as well as RT versus CT PPCs (Figs. 5C and 5D). However, there was also no significant difference

in the aggregation depending on the storage at RT or at 2 to 8°C (Figs. 5E and 5F). In addition, adenosine diphosphate (ADP) was tested at different concentrations (3-20 µmol/L), but no aggregation was observed (data not shown).

DISCUSSION

Herein, we present the first systematic analysis on the release of BRMs during storage of PCs known to be expressed at higher levels in adult than in neonatal PLTs (CCL5/RANTES, TGFβ1, TSP1, and DKK1). Notably, the release of each of these BRMs changed specifically depending on the pretransfusion variables: 1) preparation method, 2) storage time, and 3) temperature. Concerning the preparation method, a significant difference in the

initial concentration of the four BRMs was found only for DKK1. Particularly, APCs showed a significantly lower release of DKK1 than PPCs (Fig. 1A). The most robust findings for all four factors were 1) the increased release of the BRMs with storage time and 2) the higher concentrations in the supernatants of PCs stored at RT versus CS (Figs. 1–4). These experimental data argue for using rather fresh PLTs in transfusing preterm and term neonates. However, there is a continuous debate on whether transfusing fresh versus standard-issue blood products into critically ill pediatric patients reduces the incidence of new or progressive multiple organ dysfunction. Concerning red blood cell (RBC) transfusion, the recently published RCT “Age of Blood in Children in Pediatric Intensive Care Unit” (ABC-PICU) did not find a significant correlation between the storage length of the blood product and the clinical outcome variables.²⁵ However, such RCT is currently not available for stored PCs.

Quantitatively, the most prominent impact of storage temperature was found when determining the concentration of CCL5 in supernatants (Fig. 2A). More generally, a previous study has also shown CS PCs to release less BRMs than RT PCs.²⁶ However, each BRM analyzed in our panel deserved further attention regarding its biologic function and putative consequence for PLT transfusion in clinical neonatology.

The concentration of CCL5 increased by 10% during standard (Days 2–4) and by 17% during extended storage (Days 2–7) in CS, while the corresponding values for RT were 60 and 130%, respectively (Fig. 2A). The accumulation of CCL5 over storage time and the decreased release in CS found in this study are concordant to findings of previous studies.^{26–29} CCL5 is a proinflammatory chemoattractant released by a variety of cells, including PLTs.¹⁵ It attracts lymphocytes, neutrophils, and basophils among others and has also been shown to induce histamine release in basophils and degranulation of eosinophils.^{15,30,31} Due to these allergic properties, CCL5 has been investigated in association with allergic response(s) after PLT transfusion.^{19–21} Assuming that CCL5 was limited to the intravascular space and had a molecular weight of approximately 8 kDa,²⁰ an adult 70-kg patient would be exposed to a final concentration of 1.6 or 1.1 nmol/L after being transfused with 250 mL (approximately 3 mL/kg body weight) of a 4-day-old RT or CS PC, respectively. In neonates, donor PLTs are commonly transfused with a volume of 15 mL/kg body weight,³² which would result in a fivefold higher CCL5 exposure of this patient group if PLTs were stored as RT and CS PC, respectively, resulting in 8.1 or 5.4 nmol/L in neonatal plasma.

Cold-stored PCs and APCs showed a significantly lower release of DKK1 than RT PCs and PPCs, both over standard and over extended storage (Fig. 1). DKK1 is a proinflammatory protein, a major suppressor of the Wnt/ β -catenin signaling pathway and exerts important regulatory functions in white blood cell (WBC) infiltration and T-cell cytokine production.^{13,33} DKK1 has also been shown to

increase PLT-mediated release of inflammatory cytokines from endothelium.³⁴ Such mechanism could also contribute to transfusion-associated morbidity in neonates.

Transforming growth factor β 1 was also released less in CS PCs than in RT PCs (Fig. 3). The concentration of TGF β 1 increased 23% for standard and 58% for extended storage in the CS PCs, while the corresponding values for RT PCs were 81 and 148%, respectively. TGF β 1 is a predominantly anti-inflammatory protein involved in fibrosis, immune response suppression, angiogenesis, and inflammation.¹⁶ TGF β 1 is stored in its latent form and released from various immune cells, including PLTs upon activation, and can then be activated by different molecules. The half-life of activated TGF β 1 is only a couple of minutes. TGF β 1 is a potent inhibitor of megakaryopoiesis,¹⁸ and thus TGF β 1 could have counterproductive effects when being transfused to a thrombocytopenic neonate. Former studies investigating the concentrations of BRM in PCs have performed screenings with preloaded cytokine antibody arrays to determine which BRMs to further examine.^{26,29} Considering the samples in these studies were not activated before measurement, the concentrations of TGF β 1 were very low or undetectable and TGF β 1 was not studied further.^{26,29} However, the activation of TGF β 1 is required—as we did in our experiments—to reflect its endogenous biologic response that it would exert in the human body.

TSP1 is one of the molecules identified as an activator of TGF β 1³⁵ and was also released less in CS PCs compared to RT PCs (Fig. 4). TSP1 is a BRM with functions in both pro- and anti-inflammatory pathways, including regulation of migration, proliferation, cell adhesion, hemostasis, and growth factor activity.¹⁷ TGF β 1 and TSP1, as regulators of angiogenesis, have been suggested as potential protective mediators in BPD and retinopathy of prematurity.²² Thus, increased concentrations of TGF β 1 and TSP1 could contribute to the higher rate of BPD associated with liberal PLT transfusion thresholds in the PlaNet2 trial.^{4,8}

More generally, we observed an early increase of PLT count in CS, which is not in line with the results of other authors who found a decrease over storage time.^{36–38} The observed increase in MPV in CS PCs was expected and reflects the CS-induced conformational change from discoid to spherocytic shape of the PLTs.³⁶ There were also no changes in the very low numbers of RBCs and WBCs counted. The early increase of PLT counts in CS PCs is difficult to explain and is likely an artifact of counting in the fully automated blood analyzer. Moreover, the decrease in final aggregation by light transmission aggregometry reflects the known storage lesion dependent on glycolytic metabolism of stored PLTs.^{38,39} CS may reduce this glycolytic metabolism leading to higher maximal aggregation.³⁹ Multiple studies showed that PCs and whole blood stored at 4°C are hemostatically more effective than those stored at RT.^{40,41} Such effect was not obvious in our analysis (Fig. 5). Interestingly, the releasate

from TRAP6-activated PLTs was able to increase megakaryocyte proPLT formation, probably via CCL5.⁴²

In neonatal intensive care, it should be considered, however, that CS PCs contain more microparticles than those stored at RT,²⁶ which might be of concern since microthromboembolisms are accused of causing transfusion-associated necrotizing enterocolitis. Furthermore, it should be taken into account that in a humanized animal model CS, PLTs display an accelerated clearance from the circulation,⁴³ predisposing them rather for treatment of acute bleeding than for prophylactic PLT transfusion in the thrombocytopenic neonate. In pediatric trauma patients with hemorrhagic shock, however, a recent clinical trial on the transfusion of CS versus RT whole blood PLTs showed no differences in posttransfusion PLT numbers and function.⁴⁴

Development-specific differences between neonates and adults are evident both for PLT biology as well as plasmatic coagulation and hemostasis.^{45,46} Transfusion of either adult PLTs into the neonatal plasmatic coagulation system or of adult plasma that reacts with neonatal PLTs seem to disturb the unique hemostatic balance in the neonate, particularly in the very preterm infant, resulting in a higher risk of (secondary) major hemorrhage. Our data strongly suggest that besides this development-specific mismatch on PLT function, the accumulation of BRMs with higher adult than neonatal expression could be causal or contribute to noninfectious adverse events after PLT transfusion.

There is currently no experimental evidence that a single BRM (at a certain concentration) can be responsible for PLT transfusion-associated morbidity (e.g. BPD), but this hypothesis needs to be tested in appropriate animal models. However, our study points to an easy strategy for reducing the exposure of sick neonates to BRMs with high adult expression levels by using the freshest PC available, potentially even stored in the cold.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors appreciate the discussion of preliminary data on BRMs in adult donor platelets with the investigators of the Program Project Grant (2 P01 HL046925-16A1) "Neonatal Anemia and Thrombocytopenia: Pathophysiology and Treatment." We thank Mirelle Möckel and Patricia Greiser (both Institute of Transfusion Medicine, Berlin) for their technical assistance.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LKS, OM, ZJL, CAB, RT, AP, MSV, and CD designed the research; MWdP, LKS, OM, HS, and RT performed the research; MWdP and LKS analyzed the data; MWdP, LKS, OM, and CD interpreted data; MWdP, LKS, OM, and CD wrote the manuscript; and all authors approved of the final version of the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have disclosed no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Sola-Visner M, Bercovitz RS. Neonatal platelet transfusions and future areas of research. *Transfus Med Rev* 2016;30:183-8.
2. Cremer M, Sallmon H, Kling PJ, et al. Thrombocytopenia and platelet transfusion in the neonate. *Semin Fetal Neonatal Med* 2016;21:10-8.
3. Fustolo-Gunnink SF, Huisman EJ, van der Bom JG, et al. Are thrombocytopenia and platelet transfusions associated with major bleeding in preterm neonates? A systematic review. *Blood Rev* 2019;36:1-9.
4. Curley A, Stanworth SJ, Willoughby K, et al. Randomized trial of platelet-transfusion thresholds in neonates. *N Engl J Med* 2019;380:242-51.
5. Kumar J, Dutta S, Sundaram V, et al. Platelet transfusion for PDA closure in preterm infants: a randomized controlled trial. *Pediatrics* 2019;143:e20182565.
6. Fustolo-Gunnink SF, Roehr CC, Lieberman L, et al. Platelet and red cell transfusions for neonates: lifesavers or Trojan horses? *Expert Rev Hematol* 2019;12:797-800.
7. Oakley FD, Woods M, Arnold S, et al. Transfusion reactions in pediatric compared with adult patients: a look at rate, reaction type, and associated products. *Transfusion* 2015;55:563-70.
8. Margraf A, Nussbaum C, Sperandio M. Ontogeny of platelet function. *Blood Adv* 2019;3:692-703.
9. Klinger MH, Wilhelm D, Bubel S, et al. Immunocytochemical localization of the chemokines RANTES and MIP-1 alpha within human platelets and their release during storage. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;107:541-6.
10. Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, et al. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem* 1983;258:7155-60.
11. Voorzanger-Rousselot N, Goehrig D, Facon T, et al. Platelet is a major contributor to circulating levels of Dickkopf-1: clinical implications in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 2009;145:264-6.
12. Jaffe EA, Leung LL, Nachman RL, et al. Thrombospondin is the endogenous lectin of human platelets. *Nature* 1982;295:246-8.
13. Chae WJ, Ehrlich AK, Chan PY, et al. The Wnt antagonist Dickkopf-1 promotes pathological type 2 cell-mediated inflammation. *Immunity* 2016;44:246-58.
14. Guo Y, Mishra A, Howland E, et al. Platelet-derived Wnt antagonist Dickkopf-1 is implicated in ICAM-1/VCAM-1-mediated neutrophilic acute lung inflammation. *Blood* 2015;126:2220-9.
15. Marques RE, Guabiraba R, Russo RC, et al. Targeting CCL5 in inflammation. *Expert Opin Ther Targets* 2013;17:1439-60.
16. Kajdaniuk D, Marek B, Borgiel-Marek H, et al. Transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) in physiology and pathology. *Endokrynol Pol* 2013;64:384-96.

17. Lopez-Dee Z, Pidcock K, Gutierrez LS. Thrombospondin-1: multiple paths to inflammation. *Mediators Inflamm* 2011;2011: 296069.
18. Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA. Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood* 2000;96:2022-36.
19. Kluter H, Babel S, Kirchner H, et al. Febrile and allergic transfusion reactions after the transfusion of white cell-poor platelet preparations. *Transfusion* 1999;39:1179-84.
20. Wakamoto S, Fujihara M, Kuzuma K, et al. Biologic activity of RANTES in apheresis PLT concentrates and its involvement in nonhemolytic transfusion reactions. *Transfusion* 2003;43: 1038-46.
21. Savage WJ, Savage JH, Tobian AA, et al. Allergic agonists in apheresis platelet products are associated with allergic transfusion reactions. *Transfusion* 2012;52:575-81.
22. Stark A, Dammann C, Nielsen HC, et al. A pathogenic relationship of bronchopulmonary dysplasia and retinopathy of prematurity? A review of angiogenic mediators in both diseases. *Front Pediatr* 2018;6:125.
23. Executive Committee of the German Medical Association on the Recommendation of the Scientific Advisory Board, Bundesärztekammer (German Medical Association). Cross-sectional guidelines for therapy with blood components and plasma derivatives. 4th revised edition. Basel: Karger, AG; 2014.
24. Strandberg G, Sellberg F, Sommar P, et al. Standardizing the freeze-thaw preparation of growth factors from platelet lysate. *Transfusion* 2017;57:1058-65.
25. Spinella PC, Tucci M, Fergusson DA, et al. Effect of fresh vs standard-issue red blood cell transfusions on multiple organ dysfunction syndrome in critically ill pediatric patients: a randomized clinical trial. *JAMA* 2019;322:2179-90.
26. Johnson L, Tan S, Jenkins E, et al. Characterization of biologic response modifiers in the supernatant of conventional, refrigerated, and cryopreserved platelets. *Transfusion* 2018;58: 927-37.
27. Wadhwa M, Seghatchian MJ, Dilger P, et al. Cytokines in WBC-reduced apheresis PCs during storage: a comparison of two WBC-reduction methods. *Transfusion* 2000;40:1118-26.
28. Cognasse F, Boussoulade F, Chavarin P, et al. Release of potential immunomodulatory factors during platelet storage. *Transfusion* 2006;46:1184-9.
29. Glenister KM, Payne KA, Sparrow RL. Proteomic analysis of supernatant from pooled buffy-coat platelet concentrates throughout 7-day storage. *Transfusion* 2008;48: 99-107.
30. Kuna P, Reddigari SR, Schall TJ, et al. RANTES, a monocyte and T lymphocyte chemotactic cytokine releases histamine from human basophils. *J Immunol* 1992;149:636-42.
31. Alam R, Stafford S, Forsythe P, et al. RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. *J Immunol* 1993; 150:3442-8.
32. Cremer M, Sola-Visner M, Roll S, et al. Platelet transfusions in neonates: practices in the United States vary significantly from those in Austria, Germany, and Switzerland. *Transfusion* 2011; 51:2634-41.
33. Saito-Diaz K, Chen TW, Wang X, et al. The way Wnt works: components and mechanism. *Growth Factors* 2013;31:1-31.
34. Ueland T, Otterdal K, Lekva T, et al. Dickkopf-1 enhances inflammatory interaction between platelets and endothelial cells and shows increased expression in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1228-34.
35. Murphy-Ullrich JE, Poczek M. Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11:59-69.
36. Sandgren P, Shanwell A, Gulliksson H. Storage of buffy coat-derived platelets in additive solutions: in vitro effects of storage at 4 degrees C. *Transfusion* 2006;46:828-34.
37. Johnson L, Tan S, Wood B, et al. Refrigeration and cryopreservation of platelets differentially affect platelet metabolism and function: a comparison with conventional platelet storage conditions. *Transfusion* 2016;56:1807-18.
38. Wood B, Johnson L, Hyland RA, et al. Maximising platelet availability by delaying cold storage. *Vox Sang* 2018;113: 403-11.
39. Johnson L, Schubert P, Tan S, et al. Extended storage and glucose exhaustion are associated with apoptotic changes in platelets stored in additive solution. *Transfusion* 2016;56:360-8.
40. Nair PM, Pandya SG, Dallo SF, et al. Platelets stored at 4 degrees C contribute to superior clot properties compared to current standard-of-care through fibrin-crosslinking. *Br J Haematol* 2017;178:119-29.
41. Spinella PC, Pidcock HF, Strandenes G, et al. Whole blood for hemostatic resuscitation of major bleeding. *Transfusion* 2016; 56(Suppl 2):S190-202.
42. Machlus KR, Johnson KE, Kulenthirarajan R, et al. CCL5 derived from platelets increases megakaryocyte proplatelet formation. *Blood* 2016;127:921-6.
43. Marini I, Aurich K, Jouni R, et al. Cold storage of platelets in additive solution: the impact of residual plasma in apheresis platelet concentrates. *Haematologica* 2019;104:207-14.
44. Leeper CM, Yazer MH, Cladis FP, et al. Cold-stored whole blood platelet function is preserved in injured children with hemorrhagic shock. *J Trauma Acute Care Surg* 2019;87:49-53.
45. Dame C, Lorenz V, Sola-Visner M. Fetal and neonatal megakaryopoiesis and platelet biology. In: Schulze Hltaliano J, editors. *Molecular and cellular biology of platelet formation*. Cham: Springer; 2016.
46. Maheshwari A, La Gamma EF. Fundamentals of feto-neonatal immunology and its clinical relevance. In: Buonocore G, Bracci R, Weindling M, editors. *Neonatology*. Milano: Springer; 2012. ■

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Appendix S1. Supporting information.

Supplement

1) Platelet concentrate information

	APC	PPC
Per unit	2.0 - 4.0 x 10 ¹¹ platelets	2.0 - 4.5 x 10 ¹¹ platelets
1 ml suspension also included:	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 0.036 – 0.044 ml ACD-A stabilizing solution (Ph. Eur., 0.022 g/ml Sodium citrate*2H₂O, 0.008 g/ml Citric acid*H₂O, 0.0245 g/ml Glucose*H₂O) ▪ 0.356 – 0.364 ml human plasma • 0.60 ml additive solution SSP+ (69.3 mM Sodium chloride, 10.8 mM Citrate, 32.5 mM Acetate, 28.2 mM Phosphate, 5.0 mM Potassium, 1.5 mM Magnesium) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 0.5 – 0.9 vol Additive solution (2.94 g/l Sodium citrate, 4.08 g/l Sodium acetate, 6.75 g/l Sodium chloride) ▪ 0.1 – 0.5 vol Citrate Phosphate Dextrose plasma
Leukocytes	<1 x 10 ⁶ /unit	<1 x 10 ⁶ /unit
Erythrocytes	<3 x 10 ⁹ /unit	<3 x 10 ⁹ /unit

2) Additional technical information on the enzyme-linked immunosorbent assays

Concentrations of CCL5, TGFβ1, TSP1 and DKK1 were determined in supernatants and lysates, as well as in plasma of the APC donor, using DuoSet ELISAs (R&D Systems). Absorbance was read with an iMARK Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad, Feldkirchen, Germany) at 450 nm with wavelength correction at 570 nm and a 4-parameter fit standard curve. Samples were diluted in reagent diluent (kit component): CCL5 1:1000, TGFβ1 1:40-1:80 (after activation of latent TGFβ1 according to the manufacturer's instructions), TSP1 1:1000-1:3000, and DKK1 undiluted – 1:3.

3) Platelet aggregometry buffer recipe

Solution 1	Solution 2	Solution 3 = Suspension buffer
16 g NaCl, 0.4 g KCl, 2 g NaHCO ₃ , 0.1 g NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O ad 100 ml with Aqua dest.	5 ml Solution 1, 50 ml Aqua dest., 1 ml 10% (w/v) Glucose, 1,75 ml 20% (w/v) Albumin ad 100 ml with Aqua dest.	100 ml Solution 2, 1 ml 213 mM MgCl ₂ (2.13 mM final concentration), 2 ml 100 mM CaCl ₂ (2 mM final concentration), use 0.1 M HCl to adjust to pH 7.4

4) IL-6 values

IL-6 values in all study samples; LoD: limit of detection, Rep.: repetition experiment

Condition	Days post donation	IL-6 (ng/l), Rep. 1	IL-6 (ng/l), Rep. 2	IL-6 (ng/l), Rep. 3	IL-6 (ng/l), Rep. 4	IL-6 (ng/l), Rep. 5	IL-6 (ng/l), Rep. 6
Plasma		<LoD	<LoD	<LoD	1,9	2,7	3,6
APC_RT	1		<LoD	<LoD	<LoD	1,9	2,7
	2	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	1,8	2,8
	3	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	2,7
	4	1,6	1,7	<LoD	1,7	1,8	3
	7	<LoD	1,6	<LoD	1,6	2,2	2,7
APC_CS	1	<LoD	1,7	<LoD	<LoD	2,2	2,7
	2	<LoD	1,7	<LoD	1,5	2	2,8
	3	<LoD	1,7	<LoD	<LoD	1,8	2,5
	4	<LoD	1,7	<LoD	1,7	2,1	2,7
	7	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	1,9	2,5
PPC_RT	2	<LoD	1,8	<LoD	<LoD	1,6	2,4
	3	<LoD	1,8	<LoD	1,6	1,7	2,5
	4	<LoD	1,6	<LoD	1,6	2,2	2,1
	7	1,7	1,7	<LoD	<LoD	2,5	2,4
PPC_CS	2	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	1,7	2,4
	3	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	1,9	2,6
	4	<LoD	<LoD	<LoD	1,5	2,6	2,2
	7	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	2	2,3

5) CRP values

CRP values in all study samples; LoD: limit of detection, Rep.: repetition experiment

Condition	Days post donation	CRP (mg/l), Rep. 1	CRP (mg/l), Rep. 2	CRP (mg/l), Rep. 3	CRP (mg/l), Rep. 4	CRP (mg/l), Rep. 5	CRP (mg/l), Rep. 6
Plasma		0,4	<LoD	0,3	<LoD	0,5	0,4
APC_RT	1		<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
	2	<LoD	0,3	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
	3	<LoD	0,3	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
	4	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
	7	<LoD	<LoD	<LoD	1,2	<LoD	<LoD
APC_CS	1	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
	2	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
	3	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
	4	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
	7	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
PPC_RT	2	0,4	0,6	0,3	1,2	0,8	0,6
	3	0,5	0,5	0,5	1,2	0,7	0,4
	4	0,5	0,5	0,5	1,2	0,7	0,5
	7	0,5	0,6	0,4	<LoD	0,7	0,6
PPC_CS	2	0,7	0,3	0,4	0,4	<LoD	<LoD
	3	0,7	<LoD	0,3	<LoD	<LoD	<LoD
	4	0,6	0,3	0,3	0,4	<LoD	<LoD
	7	0,6	0,3	0,4	<LoD	<LoD	<LoD



The *Erythropoietin* Promoter Variant rs1617640 Is Not Associated with Severe Retinopathy of Prematurity, Independent of Treatment with Erythropoietin

Christof Dame, MD, Lina K. Sciesielski, PhD*, Carolin Rau, MD*, Chiara-Aiyleen Badur, BSc, and Christoph Bührer, MD

In this case-control study, the erythropoietin (*EPO*) promoter variant s1617640, linked to high intravitreal *EPO* concentrations and increased risk of diabetic retinopathy, was not associated with severe retinopathy of prematurity. This finding was observed both in infants with and without recombinant *EPO* administration. (*J Pediatr* 2018;199:256-9).

Severe retinopathy of prematurity (ROP) is associated with poor neurodevelopmental outcome.¹ Administration of recombinant erythropoietin ([*EPO*] r*EPO*), elevated intravitreal *EPO*, or high systemic endogenous *EPO* on day 14 have been implicated in increasing the risk of severe ROP (stage ≥ 3).²⁻⁴ Although transgenic mouse models showed a proangiogenic role of *EPO* in the proliferative phase of retinopathy,⁵⁻⁷ exogenous *EPO* protected the retina from vessel loss during the initiation period of ROP in developing mice.⁸

In adults with diabetes, the *EPO* gene variant rs1617640 has been associated with severe proliferative retinal vasculopathy and 7-fold increased intravitreal *EPO* protein concentrations.⁸ The T risk allele introduces a transcription factor-binding motif in the 5' promoter that experimentally induces *EPO* transcription.⁸ The purpose of this study was to analyze the association between the rs1617640 *EPO* variant and severe ROP in very preterm infants.

Methods

This retrospective case-control study (1:2 allocation) evaluated all very low birth weight (VLBW) infants with ROP stage ≥ 3 (with or without plus disease) treated in our institution within an 11-year time period. A total of 2056 VLBW infants were eligible. Among them, ROP stage 0/1 was found in 1815 infants, and 106 infants were diagnosed with ROP stage ≥ 3 . After reviewing the clinical records as well as the accessibility and quality of DNA specimens for molecular diagnostics, 72 of 106 infants with severe ROP were included. Control infants with ROP stage 0/1 ($n = 141$) were as tightly matched to the cases as possible by sequentially matching birth weight (first), gestational age (second), and sex (third). The study cohort of years 1997-2009 was chosen because a subgroup was routinely treated with r*EPO* (250 IU/kg $\times 3$ /week intravenously or

subcutaneously, initiated on day 5 or later once enteral iron supplementation was possible) to prevent red blood cell transfusions. Treatment was continued over the observation period of this study (42 days) and was completed at discharge. This allowed evaluating the hypothesis that infants harboring the rs1617640 *EPO* promoter variant might exhibit an additional or increased risk for ROP stage ≥ 3 , if additionally treated with r*EPO*. Approval for the study was given by the Charité—Universitätsmedizin Berlin Institutional Review Board (EA2/051/09, extended ROP_02_11).

Genomic DNA was isolated from leftover blood spots on filter paper cards of the newborn screening by using the Nucleo Spin Tissue Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). A 394 bp polymerase chain reaction (PCR) product of the *EPO* gene promoter (NCBI No. NM_007933.15, nt 38349923 to nt 38350316) was amplified using the primer set *EPOS*NPfw 5'-GTCCATTGTGCAGGACACAC-3' and *EPOS*NPpre 5'-AAGGATCTTCCTGCCTTG-3'. If necessary, the amplicon was gel-purified using a gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) or directly treated with 0.32 U Shrimp Alkaline Phosphatase and 3.6 U Exonuclease I (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts). The sequencing PCR reactions were performed with the BigDye Terminator Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, California). The PCR products were sequenced in a 16-capillary 3130xl Genetic Analyzer (ABI PRISM 3130; Applied Biosystems). The single nucleotide polymorphisms variant was determined using the Chromas 2.3 software (Technelysium, South Brisbane, Australia).

Results

Infants with ROP stage ≥ 3 and ROP stage 0/1 were matched by birth weight, gestational age, and sex (Table I). Indices of neonatal morbidity (duration of mechanical ventilation,

ROP	Retinopathy of prematurity
EPO	Erythropoietin
PCR	Polymerase chain reaction
rEPO	Recombinant EPO
VLBW	Very low birth weight

From the Department of Neonatology, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

*Contributed equally.

The authors declare no conflicts of interest.

0022-3476/\$ - see front matter. © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.
<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2018.03.014>

Table I. Demographic data and major morbidities in VLBW infants with severe ROP (ROP stage ≥ 3) and case-control infants (ROP 0/1)

Clinical parameters	ROP stage 0/1 n = 141	ROP stage ≥ 3 n = 72	OR (95% CI)	P value
Sex, female, n (%)	71 (50.4)	28 (38.9)	0.63 (0.35-1.12)	.146
Birth weight (g), median (range)	725 (387-1,470)	707 (410-1,475)	—	.534
Gestational age (wk + d), median (range)	25 + 4 (23 + 3-29 + 6)	24 + 6 (23 + 2-29 + 5)	—	.021
Birthweight percentile ≤ 10 (n), median (range)	23 (16.3)	7 (9.7)	0.55 (0.22-1.36)	.218
Mechanical ventilation, n (%)	131 (92.9)	70 (97.2)	2.67 (0.57-12.53)	.230
Duration of mechanical ventilation (d), median (range)	17 (1-42)	35 (1-42)	—	<.001
O ₂ supplementation, n (%)	136 (96.5)	72 (100.0)	∞ (NaN- ∞)	.170
Postnatal steroids, n (%)	22 (15.6)	28 (38.9)	3.44 (1.78-6.64)	<.001
Parenteral feeding (d), median (range)	21 (1-42)	23 (8-42)	—	.233
Intracranial hemorrhage, n (%)	27 (19.1)	33 (45.8)	3.57 (1.91-6.68)	<.001
Patent ductus arteriosus, n (%)	117 (83.0)	57 (79.2)	0.78 (0.38-1.60)	.575
Necrotizing enterocolitis, n (%)	9 (6.4)	5 (6.9)	1.09 (0.35-3.40)	1.000
Red blood cell transfusion, n (%)	123 (87.2)	69 (95.8)	3.37 (0.96-11.83)	.053
Initiation of red blood cells transfusion (d), median (range)	4 (1-40)	2 (1-29)	—	.028
Number of red blood cell transfusions (n), median (range)	4 (1-14)	6 (1-13)	—	<.001
Cumulative transfusion volume (mL), median (range)	47 (9-294)	90 (15-195)	—	<.001
Cumulative iron supplementation (mg), median (range)	158 (5-357)	147 (6-228)	—	.008
rEPO treatment, n (%)	89 (63.1)	35 (48.6)	0.55 (0.31-0.98)	.559
Initiation of rEPO (d), median, (range)	10 (5-28)	11 (5-41)	—	.258

NaN, Not a number.

Follow-up data cover a time period of 42 days after birth. Statistical differences were analyzed using the 2-tailed Mann-Whitney U test or 2-tailed Fisher exact probability test for dichotomous traits for which the OR and the 95% CI are stated.

postnatal steroids, rates of intraventricular hemorrhage) were more prevalent in infants with ROP stage ≥ 3 (Table I). In contrast, the homozygous variant TT of the *EPO* promoter variant rs1617640 was equally frequent in VLBW infants with ROP stage ≥ 3 and ROP stage 0/1, and there was no association between the T risk allele and severe ROP (Table II). Although the number of infants who received red blood cell transfusions was almost equal in both groups, ROP stage ≥ 3 was significantly associated with earlier initiation, higher number, and bigger total volume of transfusions (Table I). Stratification according to rEPO treatment did not indicate a higher incidence of ROP stage ≥ 3 (Table I), also not in rEPO-treated infants harboring the T risk allele (neither homo- nor heterozygously) in the *EPO* promoter (Table II).

Table II. Frequency of *EPO* promoter polymorphism rs1617640 in the study groups with stratification according to rEPO treatment

rs1617640	ROP stage 0/1 n = 141	ROP stage ≥ 3 n = 72	P value
TT genotype, n (%)	56 (39.7)	29 (40.3)	.48
GT genotype, n (%)	63 (44.7)	36 (50.0)	
GG genotype, n (%)	22 (15.6)	7 (9.7)	
With rEPO treatment n = 89		n = 35	
TT genotype, n (%)	30 (33.7)	16 (45.7)	.49
GT genotype, n (%)	44 (49.4)	15 (42.9)	
GG genotype, n (%)	15 (16.9)	4 (11.4)	
Without rEPO treatment n = 52		n = 37	
TT genotype, n (%)	26 (50.0)	13 (35.1)	.19
GT genotype, n (%)	19 (36.5)	21 (56.8)	
GG genotype, n (%)	7 (13.5)	3 (8.1)	

Statistical analysis: Freeman-Halton extension of the Fisher exact probability test for a 2-row by 3-column contingency table was used. The lack of association of the *EPO* promoter polymorphism rs1617640 and severe ROP was also evident in each alternative genetic model (allele, genotype, dominant, or recessive model, respectively) for such analysis (data not shown).

Discussion

In this study, the rs1617640 *EPO* promoter variant was not associated with a higher risk of ROP stage ≥ 3 in VLBW infants. This finding has a more general implication concerning the function of *EPO* in proliferative vasculopathy. Of at least 11 single nucleotide polymorphisms identified in the *EPO* gene, only the rs1617640 variant has been examined functionally. This *EPO* promoter variant increases transcription in reporter gene assays and in a mouse model of oxygen-induced retinal neovascularization.⁸ Therefore, the *EPO* rs1617640 variant gained much attention and was subsequently analyzed in cohort studies that significantly varied in the number of patients, the ethnicity, the type of diabetes, and its association with proliferative diabetic retinopathy, end-stage renal disease, and diabetic microvascular complications.⁸⁻¹⁴ A meta-analysis of the association of the *EPO* rs1617640 variant with proliferative diabetic retinopathy and end-stage renal disease (a total of 3162 cases and 3845 control subjects across 5 separate cohorts of European and European-American ancestry) showed statistical significance,¹¹ although the association between the *EPO* rs1617640 variant and proliferative diabetic retinopathy was not confirmed in each cohort.^{9,10,13} Recently, the clinical relevance of the rs1617640 *EPO* variant was verified in adults with diabetic retinopathy and end-stage renal disease, who exhibited diabetic microvascular complications.¹⁵ This may indicate that additional risk factors are required to turn the function of the rs1617640 *EPO* variant into a mechanism that is harmful for microvessels.

Notably, a very distinct phenotype of the control patients with diabetes (free from both proliferative diabetic retinopathy and end-stage renal disease after 10-15 years of diabetes)

was defined in the initial study reporting the association and function of the *EPO* rs1617640 variant.⁸ By excluding VLBW infants with ROP stage 2 from our study, we also applied a restrictive methodical concept. Moreover, we tightly matched for birth weight, gestational age, and sex. This emphasizes our major conclusion that the rs1617640 *EPO* promoter variant is not associated with a higher risk of ROP stage ≥ 3 .

In the largest previous candidate gene study, 2 variants in *BDNF* encoding brain-derived neurotrophic factor were associated with severe ROP.¹⁶ In strategies to identify genetic risk factors for severe ROP, one may consider that in the sicker infant, inflammation and oxidative stress cause epigenetic modifications. Such modifications may predispose very preterm infants to develop severe ROP or not.^{17,18}

Notably, the extremely low gestational age newborn study reported that infants born between 23 and 27 weeks of gestation had an increased risk for severe ROP when blood *EPO* concentrations on day 14 were in the top quartile.³ Thus, the question on the role of exogenous (recombinant) *EPO* in the development of ROP continues to be of ongoing interest.^{2,19,20} In neonatal rats, high-dose r*EPO* given as a single high dose on postnatal day 1 penetrated the blood-eye barrier and accumulated in the eye with a peak concentration measured at 24 hours after injection.²¹ Although this accumulation was not found after administration of a dose of 500 U/kg,²¹ it is reassuring that in our study population even infants homozygous for the T risk allele of the rs1617640 *EPO* promoter variant did not display a higher risk of ROP stage ≥ 3 if treated with 3×250 U/kg r*EPO* per week over a period of 4-5 weeks (Table II). Thus, our findings further extend conclusions from 2 recent meta-analyses consistently finding that early r*EPO* administration, even given in very high dose for neuroprotection, did not increase the risk of ROP stage ≥ 3 .^{19,20}

Almost all studies included in these 2 meta-analyses considered randomized clinical trials, in which eligibility for enrollment of patients was defined by a broad range of birth weight (from 500 up to 1250 or 1500 g, respectively) and of gestational age (up to ≤ 32 weeks). In fact, the incidence of ROP correlates inversely with gestational age and birth weight.²²⁻²⁴ Of children born at 24, 25, 26, 27, and 28 weeks, 19.6%, 8.6%, 4.6%, 1.1%, and 0.8% developed severe ROP, respectively.²³ This is consistent with the low mean gestational age and birth weight in our study (Table I). Therefore, our study population appears to be representative of overall populations of preterm infants with ROP and suited to address the question on the combined effects of the rs1617640 *EPO* promoter variant and r*EPO* treatment.

In the developing eye, *EPO* acts not only as angiogenic factor,⁶ but also reduces in vitro oxidative stress and experimentally prevents retinal degeneration.^{25,26} These findings and a recent meta-analysis indicating a better neurocognitive outcome after early initiation of r*EPO* for neuroprotection in very preterm infants,²⁷ speak in favor of reconsidering r*EPO* for preterm infants. We speculate that high-dose r*EPO* in the initiation phase of ROP, followed by low-dose during the proliferative phase would be harmonious with the experimental

evidence of the dual role of *EPO* in the pathophysiology of ROP.²⁸ ■

We thank Boris Metze, BSc, and Nicole Dinse, BSc, for technical assistance and Bernd Pilgermann, PhD, and Bernd Berger, BSc, who acted as data trustees (all Charité—Universitätsmedizin Berlin).

Submitted for publication Jul 13, 2017; last revision received Feb 1, 2018; accepted Mar 8, 2018

Reprint requests: Christof Dame, MD, Department of Neonatology, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz 1, Berlin D-13353, Germany. E-mail: christof.dame@charite.de

References

1. Glass TJA, Chau V, Gardiner J, Foong J, Vinal J, Zwicker JG, et al. Severe retinopathy of prematurity predicts delayed white matter maturation and poorer neurodevelopment. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2017;102:F532-7.
2. Aher SM, Ohlsson A. Late erythropoietin for preventing red blood cell transfusion in preterm and/or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;4:CD004868.
3. Holm M, Skranes J, Dammann O, Fichorova RN, Allred EN, Leviton A. Systemic endogenous erythropoietin and associated disorders in extremely preterm newborns. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2016;101:F458-63.
4. Sato T, Kusaka S, Shimojo H, Fujikado T. Vitreous levels of erythropoietin and vascular endothelial growth factor in eyes with retinopathy of prematurity. *Ophthalmology* 2009;116:1599-603.
5. Watanabe D, Suzuma K, Matsui S, Kurimoto M, Kiryu J, Kita M, et al. Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 2005;353:782-92.
6. Chen J, Connor KM, Aderman CM, Smith LE. Erythropoietin deficiency decreases vascular stability in mice. *J Clin Invest* 2008;118:526-33.
7. Yang N, Zhang W, He T, Xing Y. Exogenous erythropoietin aggravates retinal neovascularization in a murine model of proliferative retinopathy. *Turk J Med Sci* 2017;47:1642-50.
8. Tong Z, Yang Z, Patel S, Chen H, Gibbs D, Yang X, et al. Promoter polymorphism of the erythropoietin gene in severe diabetic eye and kidney complications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:6998-7003.
9. Balasubbu S, Sundaresan P, Rajendran A, Ramasamy K, Govindarajan G, Perumalsamy N, et al. Association analysis of nine candidate gene polymorphisms in Indian patients with type 2 diabetic retinopathy. *BMC Med Genet* 2010;11:158.
10. Abhary S, Burdon KP, Casson RJ, Goggin M, Petrovsky NP, Craig JE. Association between erythropoietin gene polymorphisms and diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 2010;128:102-6.
11. Williams WW, Salem RM, McKnight AJ, Sandholm N, Forsblom C, Taylor A, et al. Association testing of previously reported variants in a large case-control meta-analysis of diabetic nephropathy. *Diabetes* 2012;61:2187-94.
12. Song Q, Zhang Y, Wu Y, Zhou F, Qu Y. Association of erythropoietin gene polymorphisms with retinopathy in a Chinese cohort with type 2 diabetes mellitus. *Clin Exp Ophthalmol* 2015;43:544-9.
13. Hosseini SM, Boright AP, Sun L, Cauty AJ, Bull SB, Klein BE, et al. The association of previously reported polymorphisms for microvascular complications in a meta-analysis of diabetic retinopathy. *Hum Genet* 2015;134:247-57.
14. Fan Y, Fu YY, Chen Z, Hu YY, Shen J. Gene-gene interaction of erythropoietin gene polymorphisms and diabetic retinopathy in Chinese Han. *Exp Biol Med (Maywood)* 2016;241:1524-30.
15. Li H, Xu H, Li Y, Zhao D, Ma B. Associations between erythropoietin polymorphisms and risk of diabetic microvascular complications. *Oncotarget* 2017;8:112675-84.
16. Hartnett ME, Morrison MA, Smith S, Yanovitch TL, Young TL, Colaizzo T, et al. Genetic variants associated with severe retinopathy of prematurity

- in extremely low birth weight infants. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:6194-203.
17. Tolsma KW, Allred EN, Chen ML, Duker J, Leviton A, Dammann O. Neonatal bacteremia and retinopathy of prematurity: the ELGAN study. *Arch Ophthalmol* 2011;129:1555-63.
 18. Hartnett ME. Advances in understanding and management of retinopathy of prematurity. *Surv Ophthalmol* 2017;62:257-76.
 19. Ohlsson A, Aher SM. Early erythropoiesis-stimulating agents in preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;(11):CD004863.
 20. Chou HH, Chung MY, Zhou XG, Lin HC. Early erythropoietin administration does not increase the risk of retinopathy in preterm infants. *Pediatr Neonatol* 2017;58:48-56.
 21. Slusarski JD, McPherson RJ, Wallace GN, Juul SE. High-dose erythropoietin does not exacerbate retinopathy of prematurity in rats. *Pediatr Res* 2009;66:625-30.
 22. Löfqvist C, Andersson E, Sigurdsson J, Engström E, Hard AL, Niklasson A, et al. Longitudinal postnatal weight and insulin-like growth factor I measurements in the prediction of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 2006;124:1711-8.
 23. Gerull R, Brauer V, Bassler D, Laubscher B, Pfister RE, Nelle M, et al. Incidence of retinopathy of prematurity (ROP) and ROP treatment in Switzerland 2006-2015: a population-based analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2017, in press.
 24. Holm M, Morken TS, Fichorova RN, VanderVeen DK, Allred EN, Dammann O, et al. Systemic inflammation-associated proteins and retinopathy of prematurity in infants born before the 28th week of gestation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;58:6419-28.
 25. Grimm C, Wenzel A, Groszer M, Mayser H, Seeliger M, Samardzija M, et al. HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat Med* 2002;8:718-24.
 26. Chung H, Lee H, Lamoque F, Hrushesky WJ, Wood PA, Jahng WJ. Neuroprotective role of erythropoietin by antiapoptosis in the retina. *J Neurosci Res* 2009;87:2365-74.
 27. Fischer HS, Reibel NJ, Bühner C, Dame C. Prophylactic early erythropoietin for neuroprotection in preterm infants: a meta-analysis. *Pediatrics* 2017;139:e20164317.
 28. Caprara C, Grimm C. From oxygen to erythropoietin: relevance of hypoxia for retinal development, health and disease. *Prog Retin Eye Res* 2012;31:89-119.

The *Erythropoietin* Promoter Variant rs1617640 Is Not Associated with Severe Retinopathy of Prematurity, Independent of Treatment with Erythropoietin 259

This article was published in *The Journal of Pediatrics*, Volume 199, Dame C, Sciesielski LK, Rau C, Badur CA, Bühner C, The erythropoietin promoter variant rs1617640 is not associated with severe retinopathy of prematurity, independent of treatment with erythropoietin, Pages 256-259, Copyright Elsevier (2018).

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

Originalarbeiten

Adult donor blood products as risk factors for central-venous catheter-associated thromboembolism in neonates: a retrospective case-control study.

Badur CA, Bühler C, Dame C.

J Pediatr Hematol Oncol. 2021 Mar 1;43(2):e255-e259. doi: 10.1097/MPH.0000000000001821.

Pooling, room temperature, and extended storage time increase the release of adult-specific biologic response modifiers in platelet concentrates: a hidden transfusion risk for neonates?

Waubert de Puiseau M, Sciesielski LK, Meyer O, Liu ZJ, **Badur CA**, Schönfeld H, Tauber R, Pruss A, Sola-Visner MC, Dame C.

Transfusion. 2020 Aug;60(8):1828-1836. doi: 10.1111/trf.15827. Epub 2020 Apr 27. PMID: 32339309.

The erythropoietin promoter variant rs1617640 is not associated with severe retinopathy of prematurity, independent of treatment with erythropoietin.

Dame C, Sciesielski LK, Rau C, **Badur CA**, Bühler C.

J Pediatr. 2018 Aug;199:256-259. doi:

10.1016/j.jpeds.2018.03.014. Epub 2018 May 3. PMID: 29731355.

Kongressbeiträge

Reduzierte Freisetzung von spezifischen Inflammations-Mediatoren in Kälte-gelagerten Thrombozyten-Konzentraten: neue Strategie zur Vermeidung von Transfusions-assoziierten Erkrankungen des Früh- und Reifgeborenen

Waubert de Puiseau M, Sciesielski LK, Meyer O, **Badur CA**, Schönfeld H, Tauber R, Pruss A, Dame C.

https://www.uksh.de/uksh_media/Veranstaltungen_Programmflyer/2018/2018_Jul_Sept/DGTI+2018_Programmheft-p-186296.pdf

Poster, Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie 2018, Lübeck

Danksagung

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Christof Dame für seine weitreichende Unterstützung während der Realisierung meiner Doktorarbeit. Durch ihn habe ich großes Interesse an der wissenschaftlichen Arbeit entwickelt. Neben der Mitarbeit in seinem Labor hat er mir den Kontakt zur Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Martha C. Sola-Visner an der Division of Newborn Medicine des Boston Children's Hospital der Harvard Medical School vermittelt, was meinen Erfahrungsschatz erheblich erweitert hat. Die gemeinsamen Schnittstellen nach Boston/MA und Gainesville/FL haben viele Gespräche und Ideen geprägt. Prof. Dame war für mich ein wertvoller Mentor in der studentischen Ausbildung und ärztlichen Weiterbildung. Die klinische und wissenschaftliche Arbeit hat mir viel Freude bereitet, und ich freue mich auf die weitere Zusammenarbeit.

Danken möchte ich auch dem gesamten Team der Arbeitsgruppe von Prof. Dame, vor allem Dr. Lina Sciesielski, für die kontinuierliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Zusätzlich bedanke ich mich bei dem Team der Neonatologie, namentlich Jessica Blank, Boris Metze und Frank Ording für die Hilfe bei der Erfassung und Auswertung klinischer Daten.

Ein besonderer Dank gilt meinem Partner Doan Nguyen, der mich während dieser Zeit immer unterstützt und stets an mich geglaubt hat.

Zum Abschluss möchte ich den Menschen danken, denen meine Arbeit gewidmet ist: meinen Eltern Christina und Metin, meinen Geschwistern Carmen und Marco, sowie meinem Großonkel, Günther Flötgen, und meiner Oma, Lieselotte Flötgen. Besonders bei ihnen möchte ich mich von ganzem Herzen für ihre Hilfe bedanken. Meine Eltern haben mich schon immer, aber vor allem während des Studiums, grenzenlos unterstützt. Ohne ihre Hilfe wären mir viele Möglichkeiten in meinem Leben verwehrt geblieben.