

Aus der Klinik für Neonatologie (Charité Campus Mitte)
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

VEGF als Indikator einer transfusions- bedürftigen Anämie bei Neugeborenen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Benedikt Weber
aus Heidelberg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Wauer
 2. Prof. Dr. med. Chr. Bühner
 3. Priv.-Doz. Dr. med. A. Franz

Datum der Promotion: 1. Juni 2008

Abkürzungsverzeichnis

ELBW:	<i>extremely low birth weight infants</i> - Neugeborene mit einem Geburtsgewicht < 1000g
EPO:	Erythropoietin
FOE:	<i>peripheral fractional oxygen extraction</i>
Hb:	Hämoglobin
HIF:	<i>hypoxia inducible factor</i>
Hkt:	Hämatokrit
IQR:	Interquartilenabstand
SSW:	Schwangerschaftswoche
TX:	Transfusion
VEGF:	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VLBW:	<i>very low birth weight infants</i> - Neugeborene mit einem Geburtsgewicht < 1500g

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Anämien in der Neonatologie	2
1.1.1 Definition	2
1.1.2 Ursachen der Anämien von Neugeborenen	2
1.1.3 Pathophysiologische Konsequenzen der Anämie	5
1.1.4 Zusammenfassung: Anämien in der Neonatologie	6
1.2 Therapie von Anämien in der Neonatalperiode	7
1.2.1 Risiken von Erythrozytentransfusionen	7
1.2.2 Indikationen zur Erythrozytentransfusion	11
1.2.3 Hypoxieassoziierte Parameter	13
1.2.4 Zusammenfassung: Therapie von Anämien in der Neonatalperiode	14
1.3 VEGF als Parameter der anämieassoziierten Hypoxie	15
1.3.1 Regulation der VEGF-Expression	15
1.3.2 Physiologie von VEGF	17
1.3.3 Klinische Hinweise auf den Zusammenhang von VEGF und Hypoxie bzw. Anämie	18
1.3.4 Zusammenfassung: VEGF als Parameter der anämieassoziierten Hypoxie	18
1.4 Zusammenfassung: Einleitung	19
1.4.1 Fragestellung	19
2 Patienten und Methoden.....	21
2.1 Studienpopulation	21
2.1.1 Einschlusskriterien	21
2.1.2 Ausschlusskriterien	21
2.1.3 Fallzahlberechnung	21
2.2 Datenerhebung	22
2.2.1 Abnahme und Aufbereitung der Proben	22
2.2.2 Messung von VEGF und EPO	22
2.2.3 Patientendaten	23

2.3 Datenauswertung	24
2.3.1 Patientengruppen	24
2.3.2 Statistische Auswertung	25
3 Ergebnisse.....	26
3.1 Patientenpopulation	26
3.2 Abhängigkeit der Hb-Konzentration, des Hkt und der Hkt-Abfallgeschwindigkeit von den VEGF- bzw. EPO-Plasmawerten	29
3.3 Erstellung einer Kontrollgruppe zur Definition eines Referenzwertes für die VEGF-Plasmakonzentration	29
3.4 Einfluss von chronischer Anämie auf die Plasmaspiegel von VEGF und EPO	30
3.4.1 Patientencharakteristik	30
3.4.2 Die Neugeborenen mit chronischer Anämie hatten höhere VEGF-Plasmakonzentrationen als die Kinder der Kontrollgruppe	32
3.4.3 Eine chronische Anämie führte nicht zu höheren EPO-Spiegeln im Plasma	33
3.5 VEGF-„Cut-off“-Wert bei kritischer Anämie	34
3.5.1 Erstellung eines „Cut-off“-Wertes	34
3.5.2 Anwendung des „Cut-off“-Wertes auf die Kinder der Anämiegruppe	36
3.5.3 Anwendung auf nicht transfundierte Kinder mit Anämie	37
3.6 Zusammenfassung: Ergebnisse	39
4 Diskussion.....	40
4.1 Diskussion der Hauptaussagen	40
4.1.1 VEGF korrelierte nicht mit der Hb-Konzentration, dem Hkt und der Hkt-Abfallgeschwindigkeit	40
4.1.2 Die Neugeborenen mit chronischer Anämie zeigten signifikant höhere VEGF-Plasmawerte als die Kinder der Kontrollgruppe	41
4.1.3 Definition eines VEGF-„Cut-off“-Wertes bei 140 pg/ml	43
4.1.4 VEGF-Werte über 140 pg/ml sanken nach Transfusion signifikant ab	44
4.2 Regulation der VEGF-Expression	45

4.3 Methodendiskussion	46
4.3.1 Probenaufarbeitung	46
4.3.2 Studienpopulation	47
4.3.3 Untersuchungsmaterial	48
4.4 Fazit	48
4.4.1 Klinische Relevanz	48
4.4.2 Ausblick	50
5 Zusammenfassung.....	51
6 Anhang.....	53
6.1 Literaturverzeichnis	53
6.2 Elterninformation/Aufklärung	58
6.3 Lebenslauf	61
6.4 Danksagung	62
6.5 Eidesstattliche Erklärung	63

1 Einleitung

Die Anämie ist ein häufiges Problem in der Neonatologie. Vor allem frühgeborene Kinder entwickeln aufgrund ihres noch schwachen Blutbildungssystems oftmals eine transfusionsbedürftige chronische Anämie (13). Dadurch zählen Frühgeborene zu den am häufigsten transfundierten Patientengruppen überhaupt - Anfang der 1990er Jahre ergaben Schätzungen, dass die jährlich 30.000 Frühgeborenen in den USA zusammen mehr als 300.000 Erythrozytentransfusionen erhalten (70). Dank einer Anämieprophylaxe durch Gabe von rekombinantem Erythropoietin (EPO) oder durch verzögerte postnatale Abnabelung konnte die Transfusionshäufigkeit zwar stark gesenkt werden (42), dennoch erhalten in Deutschland heute immer noch allein über 85% der *extremely low birth weight infants* (ELBW, Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1000g) im Laufe ihres stationären Aufenthalts mindestens eine Erythrozytentransfusion (41).

Bluttransfusionen sind mit nicht unerheblichen Risiken assoziiert (26), daher sollte deren Indikation sehr eng gestellt werden. Pathophysiologische Folge der Anämie ist eine reduzierte Sauerstofftransportkapazität des Blutes mit der Gefahr einer schädigenden Gewebhypoxie. Bis heute ist es nicht möglich, das Ausmaß dieser anämieassoziierten Hypoxie zufrieden stellend zu messen - gängige Transfusionsrichtlinien basieren daher auf Expertenmeinungen und nicht auf pathophysiologisch validierten Studienergebnissen.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) ist ein sauerstoffabhängig regulierter Wachstumsfaktor (19), der bei erwachsenen Patienten mit Anämie erhöht ist (16). In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob VEGF die anämieassoziierte Gewebhypoxie quantitativ darstellen und somit als Indikator einer Transfusionsbedürftigkeit von anämischen Früh- und Reifgeborenen eingesetzt werden kann.

1.1 Anämien in der Neonatologie

1.1.1 Definition

Der Begriff Anämie kommt aus dem Griechischen und bedeutet „Blutarmut“. In der klinischen Praxis wird der Begriff auf die Erythrozyten bezogen, d.h. Anämie bedeutet in diesem Zusammenhang exakter „Mangel an Erythrozyten“ und damit „Mangel an Sauerstoffträgern“. Durch Blutparameter, welche die Erythrozyten entweder direkt (Erythrozytenzahl) oder indirekt (Konzentration an Hämoglobin (Hb) bzw. Hämatokrit (Hkt)) reflektieren, kann eine Anämie quantifiziert werden.

Das Blutbildungssystem neugeborener Kinder unterliegt besonders in der Neonatalzeit starken physiologischen Veränderungen (14). Ab welchen hämatologischen Grenzwerten man in dieser Zeit per Definition von einer Anämie spricht, hängt daher in besonderem Maße von Gestations- und Lebensalter ab (Tabelle 1).

Tabelle 1: Hämatologische Grenzwerte von gesunden Neugeborenen (27) und *very low birth weight infants* (VLBW, Neugeborene mit einem Geburtsgewicht < 1500 g) (49)*

	NS	1.LT	3.LT	7.-14.LT	20.-26.LT	40.-45.LT
Hämoglobin (g/dl)	17,1	19,4	18,5 15,6 *	18,8 14,4 *	15,9 12,4 *	12,7 10,6 *
Hämatokrit (%)	52	58	55 47 *	55 44 *	46 39 *	37 33 *
Erythrozyten (10¹²/l)	4,6	5,3	5,1 4,2 *	5,2 4,1 *	4,6 3,9 *	3,9 3,4 *

NS: Nabelschnur; LT: Lebensstage; Nabelschnurwerte entsprechen dem Median, alle anderen dem Mittelwert

1.1.2 Ursachen der Anämien von Neugeborenen

Prinzipiell beruhen Anämien entweder auf einer verminderten Bildung oder auf einem verstärkten Verbrauch bzw. Verlust von Erythrozyten. Im Neugeborenenalter gibt es zusätzliche charakteristische Anämieursachen wie etwa die physiologische Anämie innerhalb der ersten Lebenswochen aufgrund einer Umstellung des Hbs (Trimenonreduktion). Besonders frühgeborene Kinder verfügen bei Geburt noch nicht über ein ausreichend leistungsstarkes Blutbildungssystem und entwickeln daher oft das Krankheitsbild der Frühgeborenenanämie.

1.1.2.1 Physiologische Anämie des reifen Neugeborenen

Fast jedes Neugeborene macht in seinen ersten postnatalen Monaten eine physiologische Anämie durch. Während der so genannten Trimenonreduktion stellt das Blutbildungssystem die Produktion von fetalem auf adultes Hb um. Durch die postnatal einsetzende Eigenatmung steigt die Sauerstoffsättigung des Hb stark an und senkt dadurch die Stimulation der Erythropoese. Abgebaute Erythrozyten werden nicht mehr nachgebildet, folglich sinkt die Hb-Konzentration. Erst wenn diese von etwa 19 g/dl kurz nach Geburt innerhalb von 2 bis 3 Monaten auf Werte um etwa 11 g/dl gefallen ist, wird die Erythropoese wieder angeregt. Die auf diese Weise entstandene kurzzeitig anämische Phase wird als „physiologische Anämie des reifen Neugeborenen“ bezeichnet (60) - sie bedarf per Definition keiner therapeutischen Intervention. Sinkt die Hb-Konzentration allerdings weiter, muss eine andere Ursache der Anämie angenommen werden.

1.1.2.2 Frühgeborenenanämie

Das Blutbildungssystem Frühgeborener ist meist noch nicht leistungsfähig genug, um der Trimenonreduktion ausreichend entgegenzuwirken. Kurz nach ihrer Geburt haben Frühgeborene im Vergleich zu Reifgeborenen zwar fast identische Hb-Ausgangswerte von etwa 19 g/dl, diese fallen im Schnitt jedoch schneller und tiefer, sodass häufig eine Erythrozytentransfusion notwendig wird (13). Dabei besteht ein inverser Zusammenhang zwischen Geburtsgewicht und Transfusionshäufigkeit. Bednarek et al. (6) zeigten, dass Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht < 750g mit $9,7 \pm 7,7$ Transfusionen in der postnatalen Zeit im Krankenhaus signifikant häufiger transfundiert wurden als Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht von 750 bis 999g ($5,5 \pm 5,0$ Transfusionen) bzw. 1000 bis 1499g ($1,2 \pm 2,3$ Transfusionen).

Eine wichtige Rolle in der Entstehung der Frühgeborenenanämie spielen Blutverluste - besonders bei schwerkranken Frühgeborenen resultieren diese meist iatrogen durch engmaschige diagnostische Blutentnahmen (50). Zudem tragen Frühgeborene ein erhöhtes Risiko für geburtstraumatische Blutungen und *Intraventrikuläre Hämorrhagien* (IVH) (64). Je höher der Schweregrad der Erkrankungen, desto häufiger erhalten die Kinder in der postnatalen Zeit eine Erythrozytentransfusion (6).

Ein weiterer Grund scheint in der noch unzureichenden Produktion von EPO zu liegen. Trotz niedriger Hb-Konzentrationen zeigen frühgeborene Kinder in anämischen Situationen inadäquat niedrige EPO-Spiegel (9).

Kinder, die vor der 28. Schwangerschaftswoche (SSW) zur Welt kommen, haben zusätzlich meist unzureichend gefüllte Eisenspeicher, da der Großteil des Eisens erst im dritten Trimenon von der Mutter zum Kind transportiert wird (13). Das Eisen fehlt als Grundbaustein des Hb zum Bau der benötigten Erythrozyten.

In der Regel führt eine Kombination der genannten Faktoren zur Ausbildung der Frühgeborenenanämie, die sich aufgrund der noch schwachen gegenregulatorischen Möglichkeiten der Kinder oft chronisch entwickelt. Anders als die physiologische Trimenonreduktion des reifen Neugeborenen ist die Frühgeborenenanämie ein Krankheitsbild und bedarf in den meisten Fällen der Therapie durch Erythrozytentransfusion.

1.1.2.3 Sonstige neonatologische Anämieursachen

a) Blutungsanämien

Meist führt ein schneller Blutverlust zu einer akuten Anämie. Da der Körper keine Zeit hat, sich auf die neue Sauerstoffmangelsituation einzustellen, kommt es früh zu klinischen Symptomen wie Tachykardie und Tachypnoe. Bluten die Kinder langsam über einen längeren Zeitraum, entwickeln sie eine chronische Blutungsanämie.

Wichtige Ursachen perinataler Blutungsanämien sind fetale Blutungen durch Plazenta- oder Nabelgefäßverletzungen, fetale Transfusionssyndrome, wiederholte Blutabnahmen bei langem stationärem Aufenthalt sowie Blutverluste durch Geburtstraumen und Operationen.

b) Hämolytische Anämien

Häufigste hämolytische Ursache einer neonatalen Anämie ist die Blutgruppeninkompatibilität, bei der kindliche Erythrozyten nach Kontakt mit mütterlichen Antikörpern verstärkt hämolysiert werden. Seltener ist die Ausbildung einer hämolytischen Anämie durch hereditäre Sphärozytose oder Hämoglobinopathien wie Sichelzellanämie und Thalassämie. Ebenfalls selten ist eine Hämolyse durch infektiöse Erreger (z.B. Plasmodien, Enterohämorrhagische E. Coli, Staphylococcus aureus).

c) *Hypoplastische Anämien*

Den hypoplastischen Anämien liegt eine angeborene oder erworbene Bildungsstörung der Erythrozyten im Knochenmark zugrunde. Sehr seltene Ursachen im neonatalen Alter sind die Diamond-Blackfan-Anämie (kongenitale hypoplastische Anämie) und die Infektion mit dem Parvovirus B19.

1.1.3 Pathophysiologische Konsequenzen der Anämie

Die Gefährlichkeit einer Anämie liegt aufgrund der reduzierten Sauerstofftransportkapazität in einer Hypoxie auf zellulärer Ebene. Der Organismus verfügt über Mechanismen, um wichtige Organe vor hypoxischen Schäden zu schützen - so wird beispielsweise der zerebrale Blutfluss in Sauerstoffmangelsituationen stark gesteigert, um dem Gehirn eine Grundversorgung mit Sauerstoff zu garantieren. Während bei einer akuten Hypoxie meist keine Adaptation möglich ist, kann der Organismus eine chronische Hypoxie besser und länger tolerieren. Erreichen die Kompensationsmechanismen jedoch ihre Grenzen, beginnt auch eine chronische Hypoxie den Körper zu schädigen - es kommt zu zerebralen morphologischen Veränderungen mit neurologischen Auswirkungen. So zeigten neugeborene Ratten, die in ihren ersten Lebensstagen einer chronischen Hypoxie ausgesetzt waren, im Vergleich mit Kontrollen signifikant weniger Neurone und niedrigere zerebrale Volumina (61), sowie eine fortschreitende Ventrikulomegalie (45). Vergleichbare Daten vom Menschen existieren nicht – mehrere Studien berichten jedoch von einem ungünstigeren motorischen und kognitiven *Outcome* als zerebrale Auswirkung einer chronischen Hypoxie. In einem Review fanden Bass et al. (5) in 40 von mehr als 50 untersuchten Studien eine schlechtere neurokognitive Leistungsfähigkeit bei Kindern, die einer chronischen Hypoxie ausgesetzt waren. So zeigten Patienten mit reduzierten Sauerstoffsättigungswerten durch angeborene Herzfehler eine verzögerte motorische Entwicklung (2) und niedrigere Intelligenzquotienten (IQ) (18). Kinder mit nächtlichen hypoxischen Episoden durch schlafbezogene Atemstörungen erbrachten bei standardisierten neurokognitiven Tests signifikant schlechtere Leistungen als Kontrollen (8). In einer weiteren Studie fand sich ein Zusammenhang zwischen dem Grad des Leitungsdefizits und der Tiefe der nächtlichen Sauerstoffsättigungsabfälle (76).

Durch eine Anämie sinkt die absolute Sauerstofftransportkapazität des Blutes, damit steigt das Risiko einer Hypoxie. Untersuchungen an Zwillingen mit fetto-fetalem Transfusionssyndrom

zeigten signifikant niedrigere IQ-Werte der intrauterin anämischen Kinder (15). In einer weiteren Studie berichteten Lozoff et al. (38) von schlechteren standardisierten neurokognitiven Leistungstests bei 5jährigen Kindern mit postnataler Eisenmangelanämie und damaligen Hb-Konzentrationen von unter 10 g/dl.

Während die Kompensationsmöglichkeiten bei einer akuten Anämie begrenzt sind, kann sich der Körper bei einem chronisch anämischen Verlauf besser an die Sauerstoffmangelsituation anpassen und deutlich niedrigere Hb-Konzentrationen tolerieren. Ab welchen Werten eine langfristig zustande gekommene Anämie jedoch mit einer Gewebhypoxie einhergeht, ist bis heute nicht genau bekannt - Neugeborene stellen in jedem Falle eine besondere Risikogruppe für hypoxische Schäden dar. Der Erkennung des Überganges von Norm- zur Hypoxie im Verlaufe einer Anämie kommt daher entscheidende Bedeutung bei der Beurteilung der Schwere einer Anämie zu. Die Therapie durch Erythrozytentransfusion noch vor dem Stadium der Gewebhypoxie könnte wesentlich zur Verbesserung des *Outcome* von Neugeborenen beitragen.

1.1.4 Zusammenfassung: Anämien in der Neonatologie

Die Anämie ist ein häufiges Krankheitsbild der Neonatalperiode und im Besonderen ein Problem von frühgeborenen Kindern. Sie schädigt den Organismus über die Ausbildung einer Gewebhypoxie. Ätiologisch kann man eine akute von einer chronischen Anämie unterscheiden. Ab welchem Schweregrad eine chronische Anämie zu einer schädigenden Hypoxie führt ist nicht genau bekannt.

1.2 Therapie von Anämien in der Neonatalperiode

Die Erythrozytentransfusion ist die einzige Therapieoption der klinisch relevanten Anämie. Prophylaktische Konzepte wie die frühzeitige Gabe von rekombinatem EPO (51), das verzögerte Abnabeln des Neugeborenen (54) oder die Zurückhaltung bei diagnostischen Blutentnahmen (50) bzw. Nutzung blutsparender diagnostischer Methoden (39) können helfen, eine Anämie zu verhindern oder deren Ausprägungsgrad zu mindern. Meist sind diese Maßnahmen jedoch nicht effizient genug, um eine Erythrozytentransfusion zu verhindern.

1.2.1 Risiken von Erythrozytentransfusionen

Eine Erythrozytentransfusion ist mit nicht zu vernachlässigenden Risiken assoziiert. Laut „Leitlinie der Bundesärztekammer zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten“ (10) ist daher jede Transfusion kritisch zu prüfen. Vor deren Beginn ist die *„Ursache der Anämie zu klären und gegebenenfalls eine kausale Therapie zu beginnen.“* Die Transfusion mit Erythrozytenkonzentraten ist nur dann einzuleiten, wenn *„solche Patienten ohne Transfusion einen gesundheitlichen Schaden erleiden würden und eine andere, gleichwertige Therapie nicht möglich ist.“* Allerdings wird in dieser Empfehlung nicht definiert, ab welchem Schweregrad einer Anämie mit einem gesundheitlichen Schaden zu rechnen ist.

Die Risiken von Erythrozytentransfusionen sind vielschichtig, an erster Stelle sind immunologische Reaktionen bei Blutunverträglichkeit sowie die Übertragung infektiöser Erreger zu nennen. Durch unterschiedlichste Maßnahmen konnte die Häufigkeit solcher transfusionsassoziiierter Komplikationen in den letzten Jahren insgesamt deutlich gesenkt werden (Tabelle 2). Durch Aufteilung der Blutkonserve eines Spenders in bis zu 10 Satellitenbeutel sowie durch die verlängerte Lagerungsdauer der Konserven konnte die Spenderexposition pro Kind in den letzten Jahren ebenfalls erheblich reduziert werden (42). Mit der Anzahl der Spender sank besonders das Risiko immunologischer und infektiöser Komplikationen. Dennoch kommt es immer wieder zu unerwünschten Wirkungen durch Erythrozytentransfusionen. Wichtige Risiken werden im Folgenden näher besprochen.

Tabelle 2: Risiken für transfusionsassoziierte Nebenwirkungen. Zahlen von der Bundesärztekammer (10) bzw. Roth und Seifried (58)*

Unerwünschte Wirkungen	Risiko je transfundierte Einheit
Akute hämolytische Transfusionsreaktion <ul style="list-style-type: none"> • ohne tödlichen Ausgang • mit tödlichem Ausgang 	1 : 6.000 – 1 : 80.000 1 : 250.000 – 1 : 600.000
Verzögerte hämolytische Transfusionsreaktion	1 : 1000 – 1 : 4000
Allergische Transfusionreaktion <ul style="list-style-type: none"> • mit mildem Verlauf • mit schwerem Verlauf 	1 : 33 – 1 : 333 1 : 20.000 – 1 : 50.000
Transfusionsassoziierte <i>Graft-versus-host-disease</i> (GvHD)	1 : 400.000 – 1 : 1.200.000
Transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz (TRALI)	1 : 5.000 – 1 : 7.200
Bakterielle Kontamination von Erythrozytenkonzentraten	1 : 500.000 – 1 : 4.700.000
Transfusionsassoziierte Virusinfektionen durch <ul style="list-style-type: none"> • HIV • HBV • HCV 	1 : 20.000.000* 1 : 100.000 – 1 : 1.000.000 1 : 20.000.000*
Transfusionsassoziierte Parasitosen	< 1 : 1.000.000

1.2.1.1 Unverträglichkeitsreaktionen

a) Hämolytische Transfusionsreaktion

Durch wiederholte Überprüfung der Blutgruppenkompatibilität mit Hilfe des *Bed-Side-Tests* sollen hämolytische Zwischenfälle vermieden werden, dennoch wird deren Vorkommen heute mit 1 : 6.000 bis 1 : 80.000 angegeben. In 1 : 250.000 bis 1 : 600.000 der Fälle endet diese Komplikation tödlich (10). Bei bereits durch vorherige Erythrozytentransfusionen immunisierten Patienten kann sich eine relevante Hämolyse auch erst bis zu 14 Tage nach erneuter Erythrozytentransfusion ausbilden. Im Vergleich mit den akuten treten diese verzögerten hämolytischen Transfusionszwischenfälle zwar häufiger auf (1 : 1.000 bis 1 : 4.000), verlaufen jedoch seltener tödlich (1 : 1.800.000) (10).

b) Allergische Transfusionsreaktion

Antikörper des Empfängers gegen Leukozyten oder Plasmapbestandteile des Spenders können eine akute allergische Reaktion auslösen, die mit Hautrötung, Pruritus sowie Urtikaria einhergeht und sich bis zum anaphylaktischen Schock entwickeln kann. Vereinzelt kann auch ein angeborener IgA-Mangel Ursache der allergischen Transfusionsreaktion sein, welche mit 1 : 200 insgesamt relativ häufig auftritt.

c) Transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz (TRALI)

Die Symptomatik der TRALI ähnelt mit Dyspnoe, Zyanose, Fieber und Blutdruckabfall der des *acute respiratory distress syndrom* (ARDS) und beginnt etwa 1-2 Stunden nach Transfusionsbeginn. Die Ätiologie ist weitgehend unbekannt (59). Mit 1 : 5.000 aller transfundierten Einheiten tritt die TRALI relativ häufig auf - bei Neugeborenen wurde bisher jedoch von keinem Fall berichtet (59).

1.2.1.2 Transfusionsassoziierte „Graft-versus-host-disease“ (TA-GvHD)

Bei der TA-GvHD greifen T-Lymphozyten des Spenders körpereigene Strukturen des Empfängers an. Meist kann dieser die schädigenden Zellen aufgrund einer Immunschwäche nicht eliminieren. Etwa 4 Wochen nach Transfusion zeigt sich das Krankheitsbild bei Neugeborenen mit Fieber, makulopapulösem Erythem mit Blasenbildung der Haut, Lymphadenopathie und Panzytopenie. Da die Krankheit meist letal endet, kommt der Prävention eine besondere Bedeutung zu. Durch Leukozytenreduktion und vor allem durch vorherige Bestrahlung der Blutprodukte von Risikopatienten wie Frühgeborenen kann die TA-GvHD heute relativ sicher verhindert werden (71).

1.2.1.3 Infektionen

Durch immer intensiveres Screening von Spender und Blutkonserve konnte die Übertragung infektiöser Erreger durch Bluttransfusionen in den letzten Jahren stark reduziert werden und stellt heute eine außerordentlich seltene Komplikation dar.

a) Transfusionsassoziierte bakterielle Infektionen

Die Inzidenz einer bakteriellen Kontamination eines Erythrozytenkonzentrates schwankt erheblich zwischen verschiedenen Ländern (56), für Deutschland wird sie mit 1:500.000 bis 1:4.700.000 angegeben (10).

b) Transfusionsassoziierte virale Infektionen

Human immunodeficiency virus (HIV) / Hepatitisviren B und C (HBV/HCV)

Durch intensive serologische Diagnostik sowie durch Einführung der PCR-Untersuchung auf die Genome von HIV und HCV konnte die Übertragungswahrscheinlichkeit dieser Viren stark gesenkt werden – das Risiko einer transfusionsassoziierten Infektion mit HBV, HCV oder HIV gilt heute als außerordentlich gering (Tabelle 2).

Cytomegalievirus (CMV)

Eine besondere Rolle für Frühgeborene spielt das Cytomegalievirus. Während die postnatale Erstinfektion mit dem CM-Virus bei Immunkompetenten meist unauffällig verläuft, kann diese bei Risikogruppen wie Frühgeborenen zum schweren, teilweise letal endenden Krankheitsbild der Sepsis führen. Die postnatale Übertragung erfolgt horizontal, laktogen oder durch Transfusion. Zur Prävention bekommen Früh- und Reifgeborene heute nur CMV-negativ getestete und leukozytendepletierte Blutprodukte. Doch auch trotz dieser Maßnahmen kann man vereinzelte Übertragungsfälle von CMV durch Erythrozytentransfusion nicht vollkommen vermeiden.

c) Weitere transfusionsassoziierte Infektionen

Mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 : 1.000.000 kommen transfusionsassoziierte Parasitosen außerordentlich selten vor (10). Theoretisch ist die Übertragung von Prionen, den Erregern der Creutzfeldt-Jacob-Krankheit, durch eine Bluttransfusion denkbar. Eine Risikoabschätzung erscheint bisher jedoch nicht möglich, da noch kein solcher Fall bekannt geworden ist (10).

1.2.1.4 Sonstige Risiken

a) Eisenüberladung

Hypertransfusion kann zum Krankheitsbild der sekundären Hämochromatose führen. Frühgeborene Kinder gehören zu den am häufigsten transfundierten Patientengruppen überhaupt. Des Weiteren weisen sie aufgrund niedriger Spiegel eisenbindender Proteine wie Transferrin sowie aufgrund ihres noch unreifen Antioxidationsystems weitere Risikofaktoren für eine transfusionsbedingte Eisenüberladung auf (55).

b) Volumenüberladung

Eine wichtige Komplikation der Transfusionstherapie bei Neugeborenen ist die Hypervolämie, die durch zu schnelle Infusion oder zu großes Infusionsvolumen entsteht. Klinisch fallen die Kinder durch Herzinsuffizienz, Zyanose, Dyspnoe und Lungenödem auf. Eine zu schnelle Ausdehnung des Plasmavolumens ist zudem mit einer erhöhten Rate von Hirnblutungen assoziiert (64).

c) Retinopathia praematurorum (ROP)

Häufige Bluttransfusionen gelten als Risikofaktor für die Entwicklung einer ROP (62). Dabei wird unter anderem die niedrigere Sauerstoffbindungskapazität des infundierten adulten Hb diskutiert (72).

1.2.2 Indikationen zur Erythrozytentransfusion

Aufgrund der vielen Risiken sollte die Indikation zur Erythrozytentransfusion möglichst eng gestellt werden.

Prinzipiell wird eine Transfusion nötig, wenn eine Anämie beginnt, den Körper durch die Ausbildung einer relevanten Gewebhypoxie zu schädigen. Aktuelle Indikationsempfehlungen in Europa und Nordamerika basieren weitgehend auf Expertenmeinungen und sind nicht pathophysiologisch validiert (10, 17, 25, 40, 57, 68). Kriterien bei der Entscheidung für oder gegen eine Transfusion sind in der Regel der klinische Zustand des Kindes sowie definierte Grenzwerte von Hb oder Hkt. Diese wiederum sind vom aktuellen Alter des Kindes abhängig, wobei gilt: je älter die Kinder sind, desto niedriger ist der Grenzwert, der eine Transfusion rechtfertigt. Zusätzlich sind in den meisten Leitlinien eine Reihe klinischer

Situationen definiert, in welchen die Indikation zur Erythrozytentransfusion liberaler gestellt werden kann. Zeigt das Kind beispielsweise lebensbedrohliche Symptome der Anämie, ist die Indikation zur Erythrozytentransfusion unabhängig vom Hb-Wert gegeben.

Für Deutschland hat die Bundesärztekammer ein Schema veröffentlicht, das im Entscheidungsprozess für oder gegen eine Erythrozytentransfusion bei Früh- und Reifgeborenen helfen soll (Abbildung 1).

Alter (Tage)	Mittlerer HK-Normwert (%)	Transfusionsindikation:	
		HK-Grenze	Indikationsliste
1	56	< 40	<ul style="list-style-type: none"> • Beatmung, O₂-Bedarf (FiO₂) > 40 % oder • lebensbedrohliche Symptome durch Anämie und/oder Hypovolämie • geplante Operationen
<15	50	< 35	
15-28	45	< 30	
> 28	40	< 25	

Abbildung 1: Transfusionsleitlinien für Früh- und Reifgeborene, nach der Bundesärztekammer (10)

Diese Leitlinien stellen jedoch nur Empfehlungen dar. Letztlich muss die Entscheidung für oder gegen eine Erythrozytentransfusion immer für jeden Patienten individuell getroffen werden. In der aktuellen Leitlinie der Bundesärztekammer (10) heißt es dazu: *„Für die Indikation zur Erythrozytentransfusion lassen sich keine absoluten und allgemein gültigen kritischen Grenzwerte für Hämoglobin oder Hämatokrit festlegen. [...] Angaben hier oder in anderen Richt- und Leitlinien beruhen zum erheblichen Teil auf klinischer Erfahrung und bedürfen der kritischen Reflexion im Einzelfall.“*

Dies hat dazu geführt, dass die Transfusionspraxis von Klinik zu Klinik oft stark variiert. Ein Vergleich der Transfusionsrichtlinien 6 neonatologischer Zentren in den USA zeigte in beinahe allen untersuchten Parametern signifikante Unterschiede (6). Besonders interessante Abweichungen wurden bei der absoluten Anzahl der Transfusionen (1 - 5,5 / Kind), bei der durchschnittlichen Transfusionsmenge (35,0 - 95,5 ml/kg Körpergewicht), sowie beim Hkt vor Transfusion (32,9 - 37,1 %) beschrieben.

Insgesamt sind die Transfusionsempfehlungen in den letzten Jahren aufgrund der Risiken einer Erythrozytentransfusion ständig restriktiver geworden. Maier et al. (42) konnten zeigen, dass in ihrer Klinik bei ELBW im Zeitraum von 1989 bis 1997 die Hkt- Ausgangswerte vor Erythrozytentransfusion stark gesunken waren (43 auf 35% bei beatmeten Kindern, 41 auf 31% bei nicht-beatmeten Kindern). Dadurch verringerte sich auch die Anzahl an Transfusionen pro Patient spürbar (7 auf 2 / Kind). Unklar ist jedoch, ob restriktivere Transfusionsempfehlungen nicht mit einer erhöhten Rate an neurologischen Komplikationen assoziiert sind (7).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die gängigen Transfusionsleitlinien nicht auf pathophysiologischen Grundlagen, sondern auf Erfahrungswerten basieren und daher stark zwischen unterschiedlichen neonatologischen Zentren variieren. Die Gefahr einer Anämie liegt in der Ausbildung einer Gewebhypoxie - diese kann mit den heutigen diagnostischen Möglichkeiten jedoch nicht quantitativ dargestellt werden. Ein Parameter, der die anämieassoziierte Gewebhypoxie reflektiert, könnte helfen, den optimalen Zeitpunkt für eine Erythrozytentransfusion objektiver zu setzen.

1.2.3 Hypoxieassoziierte Parameter

In der Vergangenheit wurden bereits mehrere Parameter auf deren Fähigkeit untersucht, die anämieassoziierte Gewebhypoxie und damit die Transfusionsbedürftigkeit von Neugeborenen darzustellen.

Das Hormon EPO kontrolliert im Knochenmark die Reifung der hämatopoetischen Stammzellen und damit das Ausmaß der Erythropoese. Es wird über den *hypoxia inducible factor 1* (HIF 1) hypoxieabhängig reguliert (34). Daher lag es nahe, EPO auf seine Fähigkeit als Indikator einer Transfusionsbedürftigkeit zu untersuchen. Man fand jedoch, dass vor allem frühgeborene Kinder auf anämische Situationen noch nicht mit adäquaten EPO-Spiegeln antworten können (9). Diese korrelieren dazu nicht mit der Schwere einer Anämie (36). Insgesamt scheint EPO damit im Neugeborenenalter nicht als Indikator einer Transfusionsbedürftigkeit nutzbar zu sein.

Mitte der 1990er Jahre wurde erstmals der Zusammenhang zwischen Blutlaktatkonzentration und Transfusionsbedürftigkeit bei Frühgeborenen untersucht. In einer prospektiven Studie wurden die Laktatwerte vor und nach Erythrozytentransfusion verglichen. Nur etwa die Hälfte der vor Erythrozytentransfusion erhöhten Werte fielen danach signifikant ab - insgesamt

zeigte sich zudem eine sehr breite Streuung der Werte (24, 32). Damit eignet sich das Blutlaktat nicht als zuverlässiger Parameter zur Einschätzung einer Transfusionsbedürftigkeit. Ende der 1990er Jahre wurde mit der *peripheral fractional oxygen extraction* (FOE) eine viel versprechende Methode zur Einschätzung der Transfusionsbedürftigkeit vorgestellt. Durch *near infrared spectroscopy* wird das Maß der Sauerstoffausschöpfung im peripheren Gewebe bestimmt. Die FOE ist bei Kindern mit klinisch relevanter Anämie signifikant höher als bei Kindern mit asymptomatischer Anämie oder bei Gesunden (78). Eine randomisierte kontrollierte Studie führte jedoch zu keinem eindeutigen Ergebnis - trotz niedriger FOE erhielten mehr als die Hälfte der untersuchten Kinder aufgrund klinischer Symptome der Anämie eine Erythrozytentransfusion (77). Ob es die FOE damit verfehlte, transfusionsbedürftige Neugeborene zu identifizieren, oder ob sich die Neonatologen der Studie mehr auf konventionelle Indikatoren der symptomatischen Anämie verließen, sollen weitere Untersuchungen klären. Bisher konnte die FOE jedoch nicht als Transfusionsindikator bei Neugeborenen etabliert werden.

Alle o.g. Hypoxieparameter konnten sich bisher nicht durchsetzen. Grundsätzlich könnten Parameter der anämieassoziierten Hypoxie jedoch wichtige Informationen über die aktuelle Sauerstoffsituation der Gewebe und damit über die Indikation zur Erythrozytentransfusion erbringen.

1.2.4 Zusammenfassung: Therapie von Anämien der in Neonatalperiode

Trotz Prävention ist die Erythrozytentransfusion als Therapie der Anämie von neugeborenen Kindern häufig nötig. 85 % aller ELBW benötigen während ihres Krankenhausaufenthaltes im Minimum eine Erythrozytentransfusion. Die Zahl aller während der Neonatalperiode transfundierten Kinder ist noch höher zu vermuten. Die Indikation zur Erythrozytentransfusion sollte aufgrund nicht unerheblicher Risiken sehr streng erfolgen. Derzeitige Transfusionsleitlinien basieren neben dem klinischen Zustand des Kindes vor allem auf den Werten von Hb und Hkt, ohne die dabei zugrunde liegenden komplexen pathophysiologischen Prozesse zu berücksichtigen. Ein Parameter, der die anämieassoziierte Hypoxie quantitativ darstellt, könnte helfen, den idealen Zeitpunkt einer Transfusion besser zu erkennen.

1.3 VEGF als Parameter der anämieassoziierten Hypoxie

VEGF ist ein wichtiger vaskulärer Wachstumsfaktor, dessen Expression hypoxieabhängig reguliert wird (23). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob die VEGF-Plasmakonzentration die Gewebhypoxie und damit die Schwere einer Anämie quantitativ reflektiert.

1.3.1 Regulation der VEGF-Expression

Die Expression des VEGF wird durch unterschiedliche Faktoren reguliert, wobei Hypoxie den stärksten Stimulus darstellt.

Hypoxie

Der Zusammenhang zwischen Sauerstoffpartialdruck (pO_2) und der VEGF-Expression ist intensiv untersucht und sowohl *in vitro* (4, 65) als auch *in vivo* (46) gesichert worden: Sinkt der pO_2 , wird vermehrt VEGF exprimiert. Die sauerstoffabhängige Regulation wird zu einem großen Teil durch den Transkriptionsfaktor *hypoxia inducible factor 1* (HIF-1) kontrolliert (23), der auch die Produktion von EPO steuert. HIF-1 besteht aus einer α - und einer β -Untereinheit, die beide konstant in der Zelle produziert werden. Bei hohem pO_2 wird HIF-1 α durch eine sauerstoffabhängige Prolinhydroxylase hydroxiliert - dies führt zu einem verstärkten Abbau im Proteasom. Sinkt der pO_2 , nimmt die Aktivität der Hydroxylase und damit der Abbau des HIF-1 α ab. Dadurch steigt die Konzentration von HIF-1 in der Zelle an, das nun verstärkt an einen *Enhancer* bindet und dadurch die Ablesefrequenz des VEGF-Gens steigert (Abbildung 2).

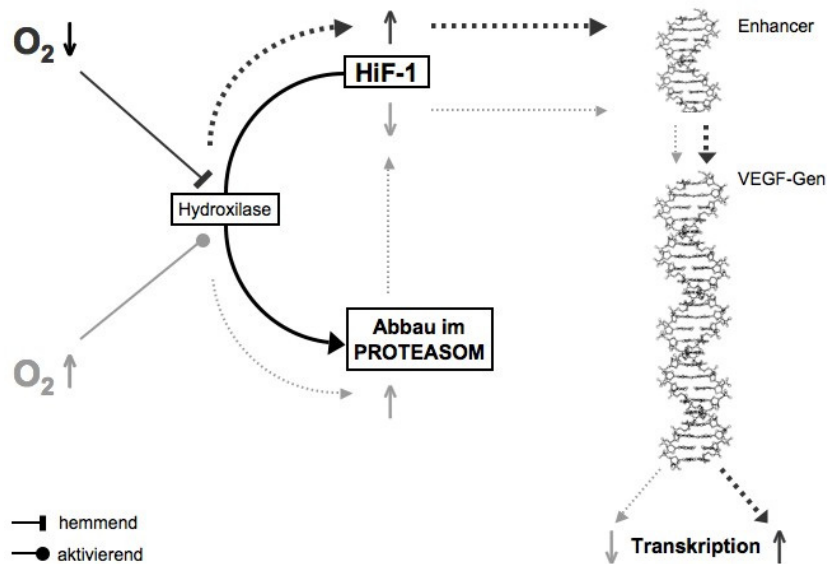


Abbildung 2: HIF-1 abhängige VEGF-Expression

Neben der HIF-1 abhängigen Aktivierung der Transkription wird VEGF unter hypoxischen Bedingungen zusätzlich durch eine Stabilisierung der VEGF-mRNA hochreguliert. Stein et al. (69) konnten zeigen, dass die Halbwertszeit der VEGF-mRNA auf diese Weise von etwa 30 Minuten unter normoxen Bedingungen auf bis zu 2,5 Stunden unter Hypoxie gesteigert werden kann.

Der pO_2 hat damit einen starken Einfluss auf die Regulation der VEGF-mRNA-Expression: Sinkt er, steigen die VEGF-mRNA-Spiegel. Es liegt somit nahe, dass damit auch eine Anämie durch die Ausbildung einer Gewebhypoxie zu einer vermehrten Ausschüttung von VEGF führt.

Weitere Einflüsse auf die VEGF-Expression

Neben dem Sauerstoffpartialdruck sind einige andere Einflussfaktoren auf die VEGF-Expression bekannt: der steigernde Einfluss einiger Wachstumsfaktoren (wie etwa *epidermal growth factor*, *transforming growth factor α und β* , *keratinocyte growth factor*, *insulin-like growth factor-1*, *fibroblast growth factor* oder *platelet-derived growth factor*) wird als Mitreaktion der Gewebe bei lokaler Hypoxie interpretiert (19). Da auch inflammatorische Zytokine wie *Interleukin-1 α* und *Interleukin-6* die VEGF-Produktion steigern, wird vermutet, dass VEGF eine zentrale Rolle in der Permeabilitätssteigerung im Rahmen von entzündlichen

Erkrankungen spielt (12). Ebenso steigern Hormone wie thyreoidea-stimulierendes Hormon (TSH) und adrenocorticotropes Hormon (ACTH) sowie eine Reihe von Onkogenen die VEGF-Expression (19). Auch eine Hypoglykämie führt zu einer erhöhten Ausschüttung von VEGF (66).

Zusammenfassend wird die VEGF-Expression von einer Reihe unterschiedlicher Faktoren beeinflusst. Der Sauerstoffpartialdruck hat dabei den stärksten Einfluss auf die VEGF-Expression (19).

1.3.2 Physiologie von VEGF

VEGF gilt als wichtigster Wachstumsfaktor von Vaskulo- und Angiogenese (47).

Zur VEGF-Genfamilie gehören die fünf Untergruppen des VEGF (benannt mit den Buchstaben A-E) sowie der *placenta growth factor* (PlGF). VEGF-A stellt das eigentlich humane VEGF dar, daher bezeichnet der Begriff VEGF in dieser Arbeit stets das VEGF-A. Das Gen, welches VEGF kodiert, besteht aus 8 Exons. Durch unterschiedliches *splicen* entstehen 5 Varianten, benannt nach ihrer Aminosäurenlänge, die man entweder an die Extrazellulärmatrix gebunden (VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆) oder ungebunden extrazellulär (VEGF₁₂₁) findet. Eine besondere Rolle spielt das VEGF₁₆₅. Es kommt sowohl ungebunden als auch gebunden vor und stellt die funktionell wichtigste *Splicingvariante* des VEGF dar.

VEGF wird in vielen verschiedenen Zellen des Körpers exprimiert, unter anderem in vaskulären Endothelzellen, in der Niere, im Ovar, in hypophysären Follikelzellen und in Makrophagen (21, 28, 48). Von besonderer klinischer Bedeutung ist die Fähigkeit fast aller humanen Tumorarten, VEGF zu produzieren, um damit die Blutversorgung des Gewebes zu sichern (19).

VEGF ist essentiell für die Entwicklung des Blutgefäßsystems – bereits bei Ausschalten eines VEGF-Allels kommt es durch fehlerhafte Angiogenese zum embryonalen Tod *in utero* (11).

Seine Wirkung im Gewebe vermittelt VEGF durch Bindung an spezifische Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (VEGFR-1 und VEGFR-2), die vorwiegend auf vaskulären Endothelzellen lokalisiert sind (33). VEGF stimuliert diese zu Proliferation, Migration und vermehrter vaskulärer Permeabilität (19) und führt damit zu einer lokalen Verbesserung der Blutversorgung. Dem VEGFR-2 kommt die Schlüsselrolle in Angio- und Vaskulogenese zu (19). Eine Inaktivierung jeweils einer der beiden Rezeptoren führt zum embryonalen Tod *in utero* (22, 63).

1.3.3 Klinische Hinweise auf den Zusammenhang von VEGF und Hypoxie bzw.

Anämie

In vitro führt eine Hypoxie zu einer verstärkten VEGF-Expression (4, 65). Im tierexperimentellen Versuch ist eine erhöhte VEGF-Produktion unter Hypoxie ebenfalls beschrieben worden (46). Beim Menschen wurden bei verschiedenen hypoxieassoziierten Erkrankungen erhöhte VEGF-Konzentrationen gefunden. So fanden Jones et al. (35) beim Vergleich mit Kontrollen signifikant höhere VEGF-Werte im Liquor von Kindern, die am *sudden infant death syndrome* (SIDS) gestorben waren (308 pg/ml vs. 85 pg/ml). Die Pathogenese des SIDS wird stark mit Hypoxie in Zusammenhang gebracht (53). Himeno et al. (29) berichteten von signifikant höheren VEGF-Plasmakonzentrationen in einer Gruppe von Kindern mit angeborenen zyanotischen Herzfehlern beim Vergleich mit gesunden Kontrollen (149 vs. 65 pg/ml).

Auch eine Anämie ist je nach Ausprägungsgrad mit einer Hypoxie assoziiert. Im Tiermodell konnten Minchenko et al. (46) zeigen, dass einer durch CO-Inhalation hervorgerufenen funktionellen Anämie ein Anstieg der VEGF-mRNA in verschiedenen Geweben folgt. Auch eine durch Hämodilution hervorgerufene Anämie führt im Rattenmodell zu erhöhten VEGF-mRNA-Konzentrationen (44). Beim Menschen wurden ebenfalls erhöhte VEGF-Plasmaspiegel bei anämischen Patienten beschrieben. So fanden Solovey et al. (67) beim Vergleich mit Kontrollen erhöhte VEGF-Plasmakonzentrationen in einer Gruppe von Kindern mit Sichelzellanämie (120 vs. 38 pg/ml). Dunst et al. (16) berichteten von erhöhten VEGF-Plasmakonzentrationen unter Patienten mit renaler Anämie (90 vs. 16 pg/ml bei gesunden Kontrollen).

Insgesamt finden sich in der Literatur zahlreiche Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der VEGF-Plasmakonzentration und einer Hypoxie bzw. Anämie.

1.3.4 Zusammenfassung: VEGF als Parameter der anämieassoziierten Hypoxie

Die Regulation des VEGF wird maßgeblich durch Hypoxie beeinflusst. In mehreren Untersuchungen fanden sich erhöhte VEGF-Konzentrationen bei Patienten mit hypoxieassoziierten Erkrankungen. Eine Anämie ist klinisch relevant, wenn sie mit einer Gewebhypoxie einhergeht. Hohe VEGF-Plasmakonzentrationen könnten daher auf eine therapiebedürftige Anämie hinweisen.

1.4 Zusammenfassung: Einleitung

Die chronische Anämie ist ein großes Problem in der Neonatologie, insbesondere bei der Betreuung frühgeborener Kinder. Maßnahmen wie die Zurückhaltung bei diagnostischen Blutentnahmen, die Gabe von rekombinantem EPO oder ein verzögertes Abnabeln haben zu einer Abnahme der Transfusionshäufigkeit geführt - die Erythrozytentransfusion ist und bleibt aber weiterhin einzige Therapieoption der klinisch relevanten Anämie von Früh- und Reifgeborenen. Trotz abnehmender Risiken können Transfusionen im Einzelfall schwerwiegende Folgen nach sich ziehen. Aus diesem Grunde sollte die Indikationsstellung sehr streng erfolgen, bisher gibt es allerdings keine objektiven Kriterien. Prinzipiell besteht immer dann die Notwendigkeit einer Erythrozytentransfusion, wenn eine Anämie mit Gewebhypoxie einhergeht. Die Möglichkeit einer quantitativen Messung der Gewebhypoxie könnte helfen, das kritische Stadium einer Anämie und damit das Risiko für hypoxische Schäden individuell besser zu erkennen. Ab welchen Hb-Werten eine Gewebhypoxie vorliegt, kann bisher nicht sicher festgestellt werden. VEGF wird unter hypoxischen Bedingungen vermehrt gebildet und ist bei erwachsenen Patienten mit chronischer renaler Anämie signifikant erhöht. Daher könnten hohe VEGF-Plasmakonzentrationen auf eine transfusionsbedürftige Anämie bei Neugeborenen hinweisen.

1.4.1 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob eine chronische Anämie mit erhöhten VEGF-Plasmaspiegeln einhergeht. Dazu wurde bei neugeborenen Kindern, bei welchen nach den gängigen Transfusionsrichtlinien (an der Klinik sowie den Werten von Hb und Hkt orientiert) die Indikation zur Erythrozytentransfusion gestellt worden war, die Konzentration von VEGF im Plasma bestimmt. Folgende Fragestellungen sollten beantwortet werden:

Hauptfragestellung

- (1) Korreliert die VEGF-Plasmakonzentration mit der Hb-Konzentration, dem Hkt oder der Hkt-Abfallgeschwindigkeit?

Bei einem direkten Zusammenhang dieser Werte würde die Bestimmung des VEGF-Plasmaspiegels keine zusätzliche Information bei der Entscheidung für oder gegen eine Erythrozytentransfusion erbringen.

- (2) Haben Neugeborene mit chronischer Anämie höhere VEGF-Plasmakonzentrationen als Kinder ohne bzw. mit akuter Anämie?

Aus ethischen Gründen war es nicht möglich, gesunde Neugeborene als Kontrollgruppe zu rekrutieren. Tierexperimentelle Untersuchungen deuten darauf hin, dass ein Anstieg der VEGF-Plasmakonzentrationen nach einem akut anämischen Ereignis erst einige Stunden verzögert messbar wird. Aus diesem Grunde wurden unter anderem Kinder mit akuten Anämien als Kontrollgruppe rekrutiert. Als Grenzwert zwischen akuter und chronischer Anämie wurde eine Hkt-Abfallgeschwindigkeit von 5 Prozent pro Tag definiert.

Nebenfragestellung

- (3) Gibt es Hinweise auf einen VEGF-„*Cut-off*“-Wert, dessen Überschreiten eine relevante anämieassoziierte Gewebhypoxie anzeigt?

Ein solcher Grenzwert könnte in der klinischen Praxis helfen, die Entscheidung für oder gegen eine Erythrozytentransfusion objektiver zu stellen.

- (4) Fällt die VEGF-Plasmakonzentration von Kindern mit chronischer Anämie nach Erythrozytentransfusion ab?

Nach Ausgleich der Sauerstoffmangelsituation durch Erythrozytentransfusion müssten sich erhöhte VEGF-Plasmaspiegel wieder normalisieren.

2 Patienten und Methoden

Um zu überprüfen, ob VEGF als Marker einer transfusionsbedürftigen Anämie von Neugeborenen nutzbar ist, wurde eine prospektive klinische Studie entworfen, in welcher die Plasmawerte von VEGF und EPO bei neugeborenen Kindern mit klinischer Indikation zur Erythrozytentransfusion untersucht werden sollten. Die Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin genehmigte die Studie in ihrer Sitzung am 15. 05. 2004 (Nr. 2138).

2.1 Studienpopulation

2.1.1 Einschlusskriterien

In die Studie eingeschlossen werden konnten Neugeborene der Klinik für Neonatologie, Campus Mitte, Charité Universitätsmedizin Berlin bei denen aufgrund einer Anämie die klinische Indikation zur Erythrozytentransfusion gestellt wurde. Vor Aufnahme in die Studie wurden die Eltern des Kindes schriftlich und mündlich über den Inhalt und mögliche Risiken der Studie aufgeklärt (siehe Anhang). Ihre schriftliche Einverständniserklärung war die weitere Voraussetzung für die Teilnahme des Kindes an der Studie.

2.1.2 Ausschlusskriterien

Ausgeschlossen wurden Kinder mit Austausch- und Notfalltransfusionen sowie Kinder, die während einer Operation transfundiert worden waren.

2.1.3 Fallzahlberechnung

Die Fallzahlberechnung entstand prospektiv in Zusammenarbeit mit dem Koordinierungszentrum für Klinische Studien der Charité auf der Basis eines Unterschiedes der VEGF-Plasmakonzentrationen zwischen Kontroll- und Anämiegruppe von 40 pg/ml (angenommen wurden VEGF-Werte von 50 pg/ml in der Kontrollgruppe (37), sowie von 90 pg/ml in der Anämiegruppe (16)). Bei einem Alpha-Fehler von 5%, sowie einer Power von 80% ergab sich eine Fallzahl von 24 Patienten pro zu untersuchender Gruppe. Zur Sicherheit (nachträglicher Ausschluss von Proben) wurde die Fallzahl auf 30 pro Gruppe erhöht.

2.2 Datenerhebung

Zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen von VEGF und EPO wurden den Studienpatienten zu festgelegten Zeitpunkten Blut entnommen (siehe 2.2.1). Parallel wurde der klinische Zustand der Kinder anhand prospektiv definierter Parameter charakterisiert.

2.2.1 Abnahme und Aufbereitung der Proben

Die Entnahme der Studienprobe erfolgte im Rahmen der Routinediagnostik bei klinischem Verdacht auf eine transfusionsbedürftige Anämie. Neben der Kreuzprobe wurde zusätzlich 0,7 ml Citratblut zur VEGF- und EPO-Bestimmung abgenommen. Bestand klinisch die Notwendigkeit, den Transfusionserfolg zu kontrollieren, erfolgte 24 - 36 Stunden nach Transfusion die Abnahme einer weiteren Studienprobe.

Nach Zentrifugation wurde das Plasma abpipettiert und bei -20°C eingefroren. Die Zeit zwischen Abnahme der Probe und Einfrieren des Plasmas betrug weniger als 60 Minuten. Innerhalb von 14 Tagen nach Probengewinnung erfolgte die endgültige Lagerung bei -75°C bis zur späteren Bestimmung von VEGF und EPO (30).

2.2.2 Messung von VEGF und EPO

Die Plasmakonzentrationen von VEGF und EPO wurden mit Hilfe eines kommerziellen quantitativen Sandwich Enzym Immunoassay der Firma R&D Systems (Minneapolis, USA) gemessen. Zur Bestimmung wurden 100 µl Plasma benötigt. Es erfolgte eine Doppelbestimmung.

Die Messung wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Kurz zusammengefasst: Die Proben wurden auf die Mikroplatte des Assays gegeben, die durch den Hersteller mit einem monoklonalen Antikörper gegen das gesuchte Protein bestückt worden war. Nach 2 Stunden Inkubationszeit, in der die Proteine an die Antikörper binden konnten, wurden alle bis dahin ungebundenen Substanzen durch Waschen entfernt. Im nächsten Schritt wurde ein polyklonaler Antikörper hinzugegeben, der mit dem Enzym *horseradish-Peroxidase* gekoppelt und ebenfalls spezifisch für das gesuchte Protein war. Nach weiteren 2 Stunden Inkubationszeit wurden wiederum alle ungebundenen Antikörper ausgewaschen und den Proben anschließend *Tetramethylbenzidine* und *Hydrogen-Peroxid* zugesetzt, welches die *horseradish-Peroxidase* in Farbe umsetzen konnte. Das Ausmaß der entstandenen Farbe

entsprach der Konzentration des gesuchten Proteins und konnte mit Hilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 450 Nanometern bestimmt werden.

2.2.3 Patientendaten

Zur Dokumentation der individuellen klinischen Situation der Kinder wurden prospektiv Daten definiert, welche anschließend parallel zur Probenentnahme aus den Patientenakten erfasst wurden (Tabelle 3). Neben den perinatalen Daten waren dies vor allem Daten zum Zeitpunkt der Probengewinnung, wie Alter und Gewicht, Laborwerte, Therapien und Grunderkrankungen.

Die Hkt-Abfallgeschwindigkeit wurde aus den beiden zuletzt erhobenen Hkt-Werten und dem Zeitraum zwischen beiden Messungen errechnet. Als Einheit wurde Prozent pro Tag festgelegt.

Tabelle 3: Erhobene Daten aus den Patientenakten

A Stammdaten	
-Geburtsgewicht (in Gramm)	-Geburtsmodus (spontan / per sectio)
-Gestationsalter (in SSW)	-APGAR-Score (nach 1, 5 und 10 min.)
-Einling/Mehrling	-Nabelarterien-pH
-Geschlecht	
B Daten zum Zeitpunkt der Probenentnahme	
-Gewicht (in Gramm)	-Erythrozyten (in $\cdot 10^{12}/l$)
-Alter (in Lebenstagen)	-Retikulozyten (in Prozent der Erythrozyten)
-Sauerstoffbedarf (in FiO_2)	-Hb (in g/dl)
-Beatmungssituation (Kategorien: \emptyset Beatmung, O_2 -Brille, CPAP, konventionelle Beatmung)	-Hkt (in %)
- pO_2 (in mmHg)	-Abfallgeschwindigkeit des Hkt (in %/d)
-periphere O_2 -Sättigung (Tagesdurchschnitt in %)	-Messzeitraum der Abfallgeschwindigkeit des Hkt (in h)
C Transfusionen	
-Volumen der aktuellen Erythrozytentransfusion (in ml)	D Medikamente
-Verhältnis zwischen aktuellem Gewicht und Volumen der aktuellen Erythrozytentransfusion (in ml / kg Körpergewicht)	
-Bisherige Transfusionen (Absolute Anzahl der Bluttransfusionen vor Abnahme der ersten Studienprobe)	
E Morbiditätsdaten	
-Operationen (nach Diagnosen)	-Herzfehler (nach Diagnosen)
-Zeitraum zwischen letzter Operation und Abnahme der ersten Studienprobe (in d)	-Retinopathia praematurorum (Internationale Klassifikation)
	-Intraventrikuläre Hämorrhagie (Klassifikation nach Papile)
	-Bronchopulmonale Dysplasie (Klassifikation nach Bancalari und Shennan)

2.3 Datenauswertung

2.3.1 Patientengruppen

Zur Auswertung wurden die Patienten in 4 prospektiv definierte Studiengruppen eingeteilt (Abbildung 3), deren VEGF-Plasmakonzentrationen miteinander verglichen wurden.

Die Gruppenzuordnung orientierte sich vorwiegend am zeitlichen Verlauf der Anämie, repräsentiert durch die Hkt-Abfallgeschwindigkeit. Die Grenze zwischen akuter und chronischer Anämie wurde bei einer Hkt-Abfallgeschwindigkeit von 5 Prozent pro Tag festgelegt. Kinder, bei welchen die Hkt-Abfallgeschwindigkeit aufgrund fehlender Vorwerte (Abnahme der Studienprobe bei der ersten Blutentnahme am 1. oder 2. Lebenstag) nicht berechnet werden konnte, wurden getrennt ausgewertet. Neugeborene, die trotz Anämiediagnostik aus klinischen Gründen keine Transfusion erhielten, wurden ebenfalls gesondert betrachtet.

Im Einzelnen wurden folgende Gruppenkriterien prospektiv definiert:

(1) „*Postnatale VEGF-Werte*“

- Hkt-Abfallgeschwindigkeit nicht berechenbar (durch fehlende Vorwerte)
- Klinische Indikation zur Erythrozytentransfusion am 1. oder 2. Lebenstag
- Hkt > 40% (um eine perinatale Hypoxie weitestgehend auszuschließen)
- keine zyanotischen Herzfehler (da als Referenzwertgruppe geplant)

(2) „*Akute Blutung*“

- Hkt-Abfallgeschwindigkeit $\geq 5\%/d$ und anschließende Erythrozytentransfusion
- keine zyanotischen Herzfehler (da als Referenzwertgruppe geplant)

(3) „*Anämiegruppe*“

- Hkt-Abfallgeschwindigkeit < 5%/d und anschließende Erythrozytentransfusion

(4) „*Keine Transfusion*“

- trotz Anämiediagnostik keine durchgeführte Erythrozytentransfusion

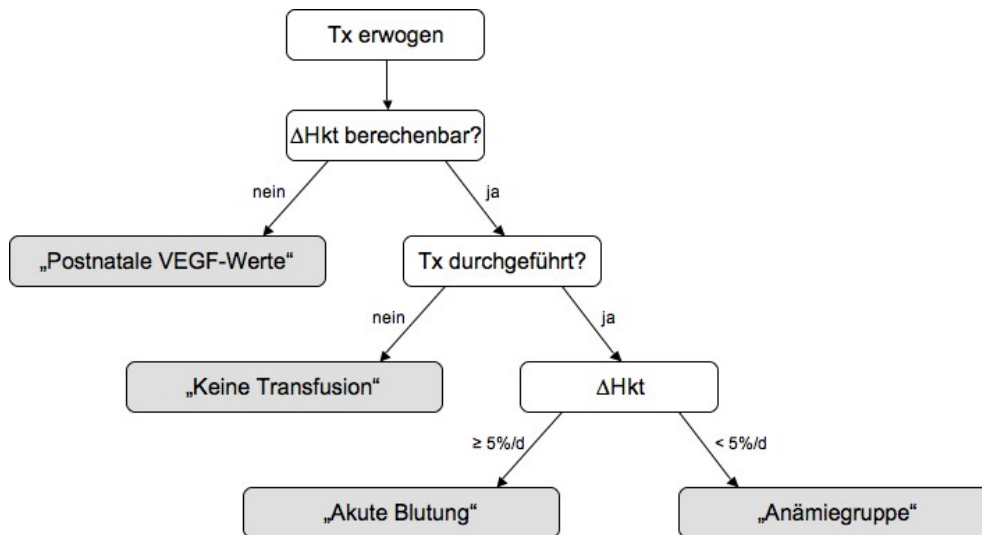


Abbildung 3: Flussdiagramm zur Gruppendifinition. LT: Lebensstage; Tx: Transfusion; ΔHkt: Hkt-Abfallgeschwindigkeit

2.3.2 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS 13.0 für Microsoft Windows der Firma SPSS Inc. (Chicago, USA) ausgewertet.

Bei Normalverteilung wurden jeweils 2 Gruppen mit Hilfe des t-Tests auf signifikante Unterschiede geprüft. War keine Normalverteilung gegeben, wurde der U-Test nach Mann und Whitney angewendet. Bei abhängigen Stichproben kamen der t-Test, sowie bei fehlender Normalverteilung der Wilcoxon-Test zum Einsatz. Statistische Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung in den einzelnen Studiengruppen wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests berechnet. Zur Korrelationsanalyse wurde der Korrelationskoeffizient r nach Pearson berechnet. Als Signifikanzgrenze wurde $p < 0,05$ angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenpopulation

Die Rekrutierungsphase erstreckte sich vom 01.06.2004 bis zum 30.06.2005. Laut Blutbank der Charité Universitätsmedizin Berlin erfolgten in der Klinik für Neonatologie am Campus Mitte während dieses Zeitraumes insgesamt 496 Bluttransfusionen. Bei 352 Transfusionen wurde die VEGF-Probe nicht abgenommen. Gründe dafür lagen in den Ausschlusskriterien der Studie (Austauschtransfusionen, intraoperative Transfusionen, Notfalltransfusionen), sowie im fehlenden Einverständnis der Eltern. Damit erfolgte bei 144 Erythrozytentransfusionen die Abnahme der VEGF-Probe.

Durch die zum Teil mehrfache Probenabnahme je Transfusion kamen im Zeitraum der Datenerhebung insgesamt 234 VEGF-Proben von 100 Kindern zusammen.

Vor der Auswertung wurden 65 Proben ausgeschlossen, da sie nicht den definierten Kriterien zur Gruppeneinteilung entsprachen.

Zusammenfassend wurden 169 Proben von 75 Kindern ausgewertet. Durch die zum Teil zweimalige Probenentnahme pro Erythrozytentransfusion (Abnahme jeweils einer Probe vor und nach Transfusion) resultieren daraus 125 Datensätze (Abbildung 4).

Im Mittelwert kamen die Studienteilnehmer nach 30 ± 5 SSW zur Welt (Abbildung 5 A) - über 90 % der Proben stammten von frühgeborenen Kindern, die Mehrheit davon wurde vor der 30. SSW geboren. Das mittlere Geburtsgewicht betrug 1365 ± 828 Gramm (Abbildung 5 B) - 90 % der Proben stammten von untergewichtigen Neugeborenen, etwa die Hälfte davon von ELBW. Es fand sich keine Korrelation der VEGF-Plasmakonzentrationen mit dem Gestationsalter ($r=-0,136$; $p=0,142$), dem Geburtsgewicht ($r=-0,146$; $p=0,115$), dem aktuellen Alter ($r=-0,006$; $p=0,945$) und dem aktuellen Gewicht ($r=0,181$; $p=0,050$).

Kein Kind wurde während des Studienzeitraumes mit rekombinantem EPO behandelt.

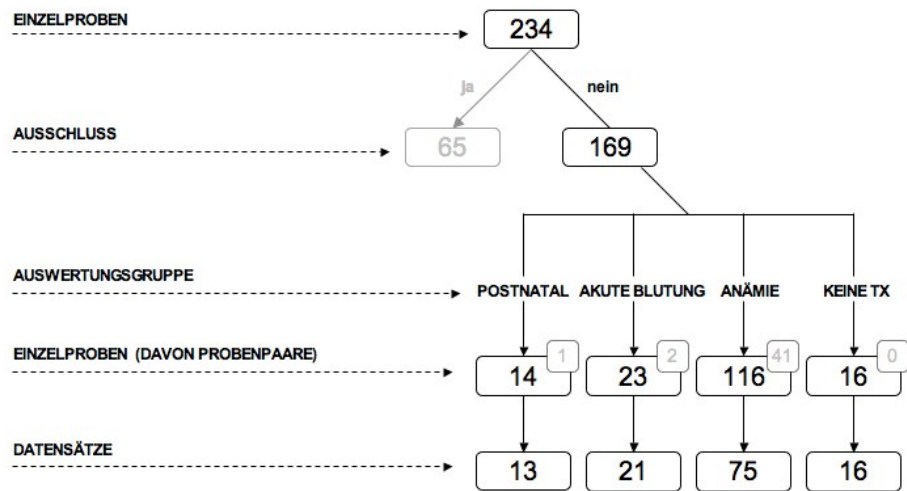
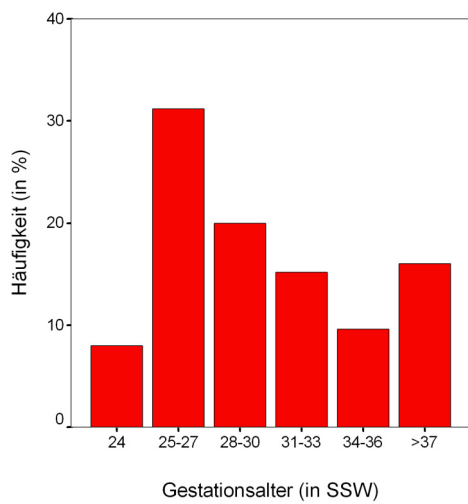
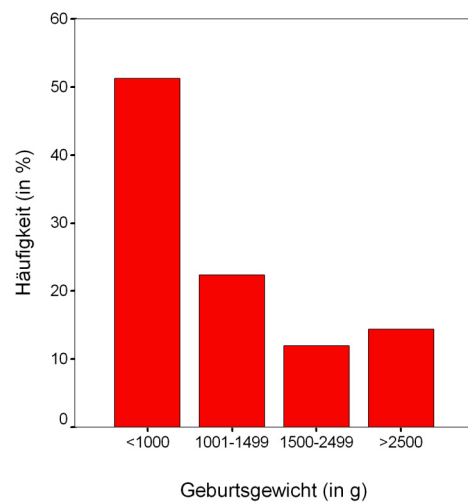


Abbildung 4: Zusammensetzung der Studienpopulation. Datensätze bestehen aus Einzelproben oder Probenpaaren (Abnahme jeweils einer Probe vor und nach Erythrozytentransfusion); TX: Transfusion



(A)



(B)

Abbildung 5: Aufteilung des Studienkollektives nach Gestationsalter (A) und Geburtsgewicht (B). (n=125)

3.2 Abhängigkeit der Hb-Konzentration, des Hkt und der Hkt-Abfallgeschwindigkeit von den VEGF- bzw. EPO-Plasmawerten

Zu Beginn sollte eine Korrelation von Hb-Konzentration, Hkt und Hkt-Abfallgeschwindigkeit mit den VEGF-Plasmawerten ausgeschlossen werden. Bei einem linearen Zusammenhang dieser Parameter würde die Bestimmung des VEGF keine zusätzliche Information bei der Einteilung der Schwere einer Anämie erbringen. Eine Korrelation der EPO-Plasmawerte mit Hb-Konzentration, Hkt und Hkt-Abfallgeschwindigkeit sollte ebenfalls ausgeschlossen werden.

Die VEGF-Spiegel zeigten keine Korrelation mit der Hb-Konzentration ($r=-0,046$; $p=0,622$) (Abbildung 6 A) und dem Hkt ($r=-0,030$; $p=0,747$) (Abbildung 6 B). Bei Betrachtung des Streudiagramms der VEGF-Plasmakonzentration in Abhängigkeit der Hkt-Abfallgeschwindigkeit fiel eine Werteverteilung im Sinne einer exponentiellen Funktion auf (Abbildung 7), die statistische Analyse zeigte jedoch keine signifikante Korrelation ($r=0,078$; $p=0,431$).

Ebenso fand sich kein linearer Zusammenhang der EPO-Plasmaspiegel mit der Hb-Konzentration ($r=0,153$; $p=0,121$), dem Hkt ($r=0,155$; $p=0,115$) und der Hkt-Abfallgeschwindigkeit ($r=0,063$; $p=0,552$).

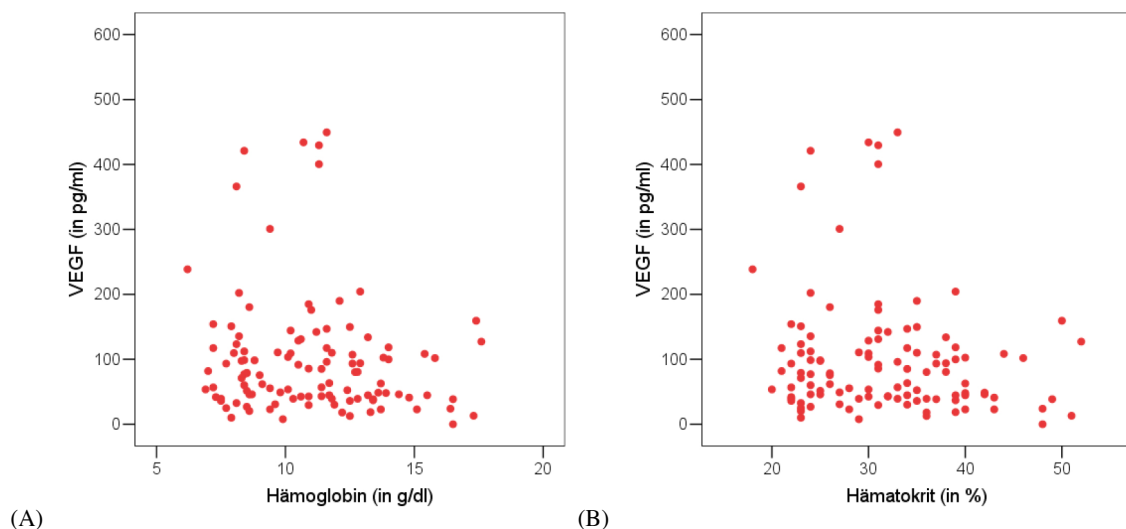


Abbildung 6: VEGF-Plasmakonzentration in Abhängigkeit von Hb-Konzentration (A) und Hkt (B). (n=118, da Datensätze von Kindern mit zyanotischen Herzfehlern zur Korrelationsanalyse ausgeschlossen wurden)

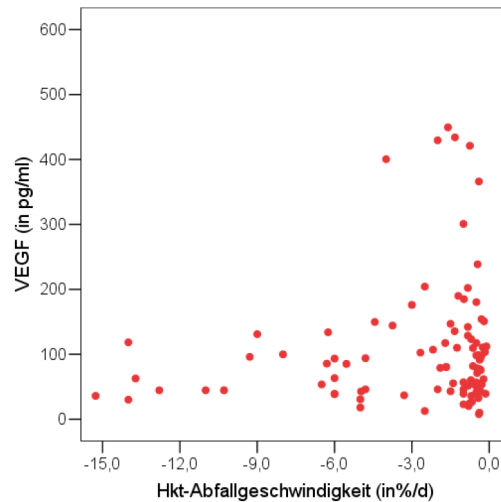


Abbildung 7: VEGF-Plasmakonzentration in Abhängigkeit von der Hkt-Abfallgeschwindigkeit. (n=105, da Datensätze von Kindern mit zyanotischen Herzfehlern zur Korrelationsanalyse ausgeschlossen wurden und bei den Kinder der Gruppe „Postnatale VEGF-Werte“ keine Hkt-Abfallgeschwindigkeit berechnet werden konnte)

3.3 Erstellung einer Kontrollgruppe zur Definition eines Referenzwertes für die VEGF-Plasmakonzentration

Um einen Referenzwert für die VEGF-Plasmakonzentration von Neugeborenen zu erhalten, wurden zunächst die Proben der Gruppe „Postnatale VEGF-Werte“ (n=13) untersucht. Es fanden sich VEGF-Plasmakonzentrationen von im Median 40 pg/ml (Interquartilenabstand (IQR) 23-75).

Um herauszufinden, ob eine akute Blutung zu erhöhten VEGF-Plasmakonzentrationen führt, wurden die Werte der Gruppe „Postnatale VEGF-Werte“ mit den Werten der Gruppe „Akute Blutung“ verglichen. Bei den Neugeborenen der Gruppe „Akute Blutung“ (n=21) lag die VEGF-Plasmakonzentration bei 54 pg/ml (IQR 33-95). Die VEGF-Plasmakonzentrationen beider Gruppen unterschieden sich nicht signifikant (p=0,27).

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden daher beide Patientenpopulationen unter dem Namen „Kontrollgruppe“ (n=34) zusammengefasst. Die Kinder der Kontrollgruppe hatten VEGF-Plasmakonzentrationen von 45 pg/ml (IQR 30-94).

3.4 Einfluss von chronischer Anämie auf die Plasmaspiegel von VEGF und EPO

Um den Einfluss einer chronischen Anämie auf die Plasmawerte von VEGF und EPO zu untersuchen, wurden beide Parameter zwischen Anämie- und Kontrollgruppe verglichen.

3.4.1 Patientencharakteristik

Bei der Betrachtung beider Gruppen zeigten sich signifikante Unterschiede (Tabelle 4). Die Kinder der Anämiegruppe waren bei Geburt unreifer als die Kinder der Kontrollgruppe und zeigten folglich ein niedrigeres Geburtsgewicht und Gestationsalter - zum Zeitpunkt der Probenentnahme waren sie jedoch signifikant älter als die Kinder der Kontrollgruppe (Tabelle 4 A+B). Zum Zeitpunkt der Probenentnahme benötigten die Kinder der Kontrollgruppe häufiger eine Atemunterstützung und wurden dabei signifikant häufiger konventionell beatmet (Tabelle 4 B). In allen erhobenen hämatologischen Parametern wiesen die Kinder der Anämiegruppe niedrigere Werte auf (Tabelle 4 C). Während die Kinder in der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt der Probenentnahme häufiger Antibiotika erhielten, wurden die Kinder der Anämiegruppe vermehrt mit Eisen behandelt (Tabelle 4 E). Vor Abnahme der VEGF-Probe wurden die Kinder der Kontrollgruppe signifikant häufiger operiert; die Eingriffe lagen dabei signifikant kürzer zurück als, bei den Kindern der Anämiegruppe (Tabelle 4 E).

Tabelle 4: Parameter von Kontroll- und Anämiegruppe

	Kontrollgruppe	Anämiegruppe	p
Anzahl (n)	34	75	
A Perinatale Parameter			
Weiblich (%)	56	47	0,413
Gestationsalter (SSW)	32 [24-40]	28 [24-39]	0,010
Geburtsgewicht (g)	1385 [590-3485]	980 [550-3470]	0,005
Sectiorate (%)	71	76	0,637
Rate an Mehrlingen (%)	18	33	0,112
Nabelarterien-pH	7,29 [6,79-7,42]	7,29 [6,91-7,43]	0,948
APGAR nach 1 min	6 [1-10]	5 [1-10]	0,053
APGAR nach 5 min	8 [4-10]	7 [2-10]	0,435
APGAR nach 10 min	9 [6-10]	8 [4-10]	0,560
B Aktuelle Parameter			
Alter (d)	2 [1-47]	34 [3-94]	<0,001
Gewicht (g)	1430 [600-3885]	1534 [506-4670]	0,278
O ₂ -Bedarf (%)	38	21	0,100
FiO ₂ = 0,22 - 0,30 (%)	26	17	0,308
FiO ₂ > 0,30 (%)	12	4	0,201
Atemunterstützung (%)	85	51	0,001
O ₂ -Sonde (%)	3	12	0,168
CPAP (%)	12	23	0,294
Konventionelle Beatmung (%)	71	16	<0,001
O ₂ -Sättigung (%)	94,3 ± 4,4	95,4 ± 3,8	0,084
Arterieller pO ₂ (mmHg) [n]	64,2 ± 20,0 [32]	55,2 ± 14,4 [29]	0,093
C Hämatologische Parameter			
Erythrozyten (*10 ¹² /l)	3,74 ± 0,68	3,11 ± 0,52	<0,001
Hämoglobin (g/dl)	13,7 ± 2,9	9,8 ± 1,9	<0,001
Hämatokrit (%)	39,4 ± 8,3	28,4 ± 5,7	<0,001
Hkt-Abfallgeschwindigkeit (%/d)	-16,1 ± 26,4	-1,3 ± 1,2	<0,001
D Frühgeburtsassoziierte Erkrankungen			
ROP (%) [n]	12 [4]	4 [3]	0,201
IVH (%) [n]	24 [8]	19 [14]	0,610
BPD (%) [n]	41 [14]	45 [34]	0,835
E Therapien vor Probengewinnung			
Aktuelle Antibiotikatherapie (%) [n]	79 [27]	25 [19]	<0,001
Dauer (d)	1 [1-9]	3 [1-17]	0,003
Corticoidtherapie (%) [n]	15 [5]	11 [4]	0,539
Zeitraum seit letzter Gabe (d)	1 [1-2]	28 [1-70]	0,012
Anzahl bisheriger Gaben (n)	2 [1-4]	4 [1-4]	0,174
Eisentherapie (%) [n]	3 [1]	47 [35]	0,001
Zeitraum seit letzter Gabe (d)	1	1 [1-24]	0,689
Anzahl bisheriger Gaben (n)	6	9 [1-47]	0,499
Operationen (%) [n]	32 [11]	13 [10]	0,034
Zeitraum seit letzter Operation (d)	1 [1-19]	21 [1-47]	0,010

Alle Werte als Median [Range] bzw. Mittelwert ± Standardabweichung; ROP: Retinopathia praematurorum; IVH: Intraventrikuläre Hämorrhagie; BPD: Bronchopulmonale Dysplasie

3.4.2 Die Neugeborenen mit chronischer Anämie hatten höhere VEGF-Plasmakonzentrationen als die Kinder der Kontrollgruppe

Beim Vergleich der VEGF-Plasmakonzentrationen zeigten sich signifikant höhere Werte in der Anämiegruppe (93 pg/ml (IQR 46-151) als in der Kontrollgruppe (45 pg/ml (IQR 30-94), $p < 0,001$) (Abbildung 8).

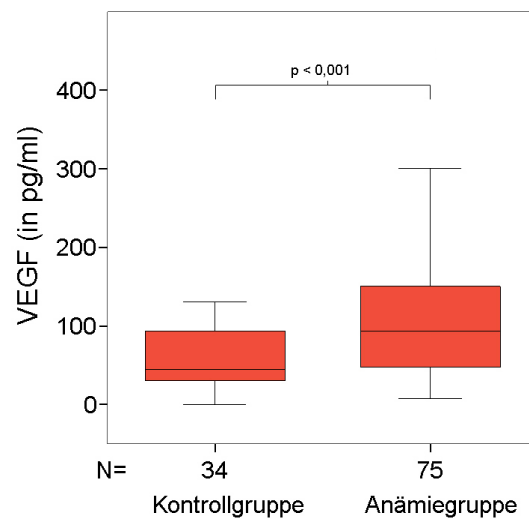


Abbildung 8: Boxplot bezüglich der VEGF-Plasmakonzentrationen in Kontroll- und Anämiegruppe. Die Box wird jeweils vom ersten und dritten Quartil begrenzt; innerhalb der Box ist der Median markiert; oberer und unterer *whisker* enden mit dem größten bzw. kleinsten Wert innerhalb der inneren Eingrenzung; Ausreißer sind ausgeblendet.

3.4.3 Eine chronische Anämie führte nicht zu höheren EPO-Spiegeln im Plasma

Beim Vergleich der EPO-Werte von Kontroll- und Anämiegruppe fanden sich keine signifikanten Unterschiede (187 pg/ml (IQR 108-251) vs. 148 pg/ml (IQR 92-210), $p=0,11$) (Abbildung 9).

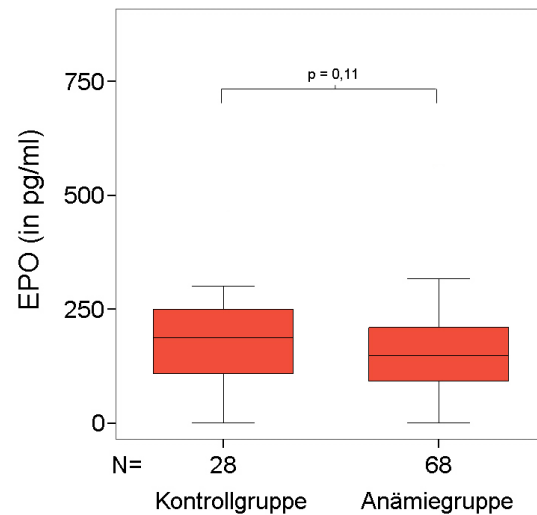


Abbildung 9: Boxplot bezüglich der EPO-Plasmakonzentrationen in Kontroll- und Anämiegruppe. Die Box wird jeweils vom ersten und dritten Quartil begrenzt; innerhalb der Box ist der Median markiert; oberer und unterer *whisker* enden mit dem größten bzw. kleinsten Wert innerhalb der inneren Eingrenzung; Ausreißer sind ausgeblendet.

3.5 VEGF-„Cut-off“-Wert bei kritischer Anämie

3.5.1 Erstellung eines „Cut-off“-Wertes

Geht man davon aus, dass die Kontrollgruppe die physiologische Verteilung der VEGF-Plasmakonzentrationen bei Neugeborenen widerspiegelt, so würden die VEGF-Referenzwerte zwischen 0 und 131 pg/ml liegen. Damit kann spekuliert werden, dass Werte über 140 pg/ml Ausdruck einer Gewebhypoxie und damit pathologisch sind.

Zur weiteren Analyse wurde die Anämiegruppe anhand dieses „Cut-off“-Wertes in zwei Untergruppen mit VEGF-Werten vor Transfusion von weniger als 140 pg/ml (n=52) und mehr als 140 pg/ml (n=23) eingeteilt. Zwischen beiden Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich Gestationsalter, Geburtsgewicht und sonstigen perinatalogischen Parametern (Tabelle 5 A). Ebenso fanden sich keine wesentlichen Unterschiede beim aktuellen Sauerstoffbedarf und der Beatmungssituation (Tabelle 5 B). Es fiel eine signifikant höhere Hkt-Abfallgeschwindigkeit in der Gruppe „VEGF>140pg/ml“ auf (p=0,011). Bis auf eine gehäufte Eisentherapie bei den Kindern mit VEGF<140 pg/ml (p=0,024) zeigten sich in den restlichen Parametern keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 5 D-E).

Tabelle 5: Parameter in den zwei Subgruppen der Anämiegruppe

	VEGF < 140 pg/ml	VEGF > 140 pg/ml	p
Anzahl (n)	52	23	
A Perinatale Parameter			
Weiblich (%)	42	56	0,319
Gestationsalter (SSW)	30 [24-37]	27 [24-39]	0,678
Geburtsgewicht (g)	988 [550-2825]	850 [550-3470]	0,661
Sectiorate (%)	79	70	0,395
Rate an Mehrlingen (%)	33	35	1,000
Nabelarterien-pH	7,30 [7,10-7,43]	7,29 [6,91-7,43]	0,092
APGAR nach 1 min	6 [1-10]	4 [1-9]	0,346
APGAR nach 5 min	8 [5-10]	7 [2-10]	0,743
APGAR nach 10 min	9 [6-10]	8 [4-10]	0,379
B Aktuelle Parameter			
Alter (d)	38 [3-92]	15 [5-94]	0,136
Gewicht (g)	1735 [590-4670]	1265 [506-3640]	0,156
O ₂ -Bedarf (%)	23	17	0,762
FiO ₂ = 0,22 - 0,30 (%)	19	13	0,743
FiO ₂ > 0,30 (%)	4	4	1,000
Atemunterstützung (%)	44	65	0,133
O ₂ -Sonde (%)	12	13	1,000
CPAP (%)	15	39	0,036
Konventionelle Beatmung (%)	17	13	0,745
O ₂ -Sättigung (%)	95,7 ± 4,2	95,0 ± 3,0	0,492
Arterieller pO ₂ (mmHg) [n]	55,9 ± 14,6 [17]	54,4 ± 14,8 [12]	0,176
C Hämatologische Parameter			
Erythrozyten (*10 ¹² /l)	3,06 ± 0,53	3,21 ± 0,49	0,251
Hämoglobin (g/dl)	9,7 ± 2,0	10,2 ± 1,8	0,262
Hämatokrit (%)	27,9 ± 5,8	29,6 ± 5,4	0,142
Hkt-Abfallgeschwindigkeit (%/d)	-1,1 ± 1,1	-1,7 ± 1,2	0,011
D Frühgeburtsassozierte Erkrankungen			
ROP (%) [n]	4 [2]	4 [1]	1,000
IVH (%) [n]	21 [11]	13 [3]	0,529
BPD (%) [n]	40 [21]	57 [13]	0,218
E Therapien vor Probengewinnung			
Aktuelle Antibiotikatherapie (%) [n]	29 [15]	17 [4]	0,393
Dauer (d)	3 [1-17]	4 [1-7]	0,267
Corticoidtherapie (%) [n]	10 [5]	13 [3]	0,695
Zeitraum seit letzter Gabe (d)	25 [1-70]	31 [21-50]	0,657
Anzahl bisheriger Gaben (n)	2 [1-4]	4 [3-4]	0,249
Eisentherapie (%) [n]	56 [29]	26 [6]	0,024
Zeitraum seit letzter Gabe (d)	1 [1-24]	1 [1-1]	0,535
Anzahl bisheriger Gaben (n)	9 [1-47]	9 [4-28]	0,976
Operationen (%) [n]	17 [9]	4 [1]	0,162
Zeitraum seit letzter Operation (d)	22 [1-48]	16	0,800

Alle Werte als Median [Range] bzw. Mittelwert ± Standardabweichung; ROP: Retinopathia praematurorum; IVH: Intraventrikuläre Hämorrhagie; BPD: Bronchopulmonale Dysplasie

3.5.2 Anwendung des „Cut-off“-Wertes auf die Kinder der Anämiegruppe

Beruhend auf den erhöhten VEGF-Werten in der Anämiegruppe auf einer Gewebeshypoxie, so sollten diese nach Erythrozytentransfusion abfallen.

Bestand klinisch die Notwendigkeit, den Transfusionserfolg zu kontrollieren, wurde den Studienteilnehmern neben der VEGF-Probe vor Transfusion eine weitere Blutprobe mindestens 36 Stunden nach Transfusion abgenommen, um mögliche Änderungen der VEGF-Plasmakonzentration nach Ausgleich der Anämie feststellen zu können. In der Anämiegruppe kamen insgesamt 41 Probenpaare zusammen. Die Zeit zwischen Abnahme der ersten und zweiten Studienprobe betrug im Mittelwert 52 ± 21 Stunden.

Die 41 Probenpaare wurden anhand des „Cut-off“-Wertes in 2 Subgruppen unterteilt. Dabei fanden sich 31 Probenpaare mit einem VEGF-Wert vor Transfusion von weniger als 140 pg/ml, sowie 10 Probenpaare mit einem VEGF-Wert vor Transfusion von mehr als 140 pg/ml.

Die VEGF-Plasmakonzentrationen in der Gruppe „VEGF>140 pg/ml“ sanken nach Erythrozytentransfusion signifikant um 45% ab (233 pg/ml auf 160 pg/ml, $p=0,037$) (Abbildung 10). Im Gegensatz dazu stiegen die VEGF-Werte in der Gruppe „VEGF<140 pg/ml“ um 67% an (57 pg/ml auf 95 pg/ml, $p=0,003$).

Beide Gruppen unterschieden sich dabei weder in der Transfusionsmenge bezogen auf das Körpergewicht, noch in der Differenz der Hkt-Werte vor und nach Transfusion, sowie den absoluten Hkt-Werten nach Transfusion (Tabelle 6).

Tabelle 6: Transfusionsbezogene Parameter in den zwei Subgruppen der Anämiegruppe

	VEGF < 140 pg/ml	VEGF > 140 pg/ml	p
Anzahl (n)	31	10	
Tx-Menge/Körpergewicht (ml/kgKG)	25 ± 8	21 ± 8	0,251
Differenz der Hkt-Werte vor/nach Tx (%)	15 ± 5	13 ± 5	0,172
Hkt-Werte nach Tx (%)	42 ± 5	40 ± 4	0,605

Alle Werte als Mittelwert ± Standardabweichung; Tx: Transfusion

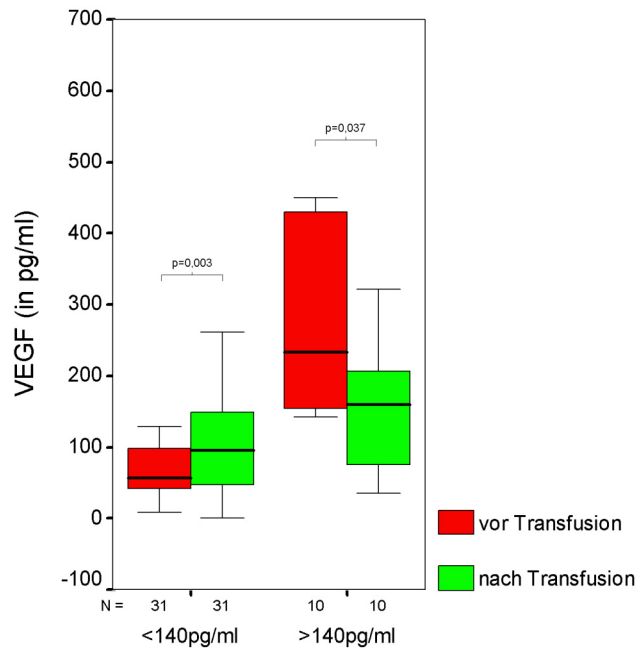


Abbildung 10: Boxplot bezüglich der VEGF-Werte vor und nach Transfusion in den zwei Subgruppen der Anämiegruppe. Die Box wird jeweils vom ersten und dritten Quartil begrenzt; innerhalb der Box ist der Median markiert; oberer und unterer *whisker* enden mit dem größten bzw. kleinsten Wert innerhalb der inneren Eingrenzung; Ausreißer sind ausgeblendet.

3.5.3 Anwendung auf nicht transfundierte Kinder mit Anämie

Einer Gruppe von 16 Kindern wurde zwar zusammen mit der Kreuzprobe die VEGF-Probe abgenommen, aus klinischen Gründen erhielten sie anschließend jedoch keine Erythrozytentransfusion.

Auch diese Patienten wurden anhand des „*Cut-off*“-Wertes in zwei Gruppen unterteilt. Dabei zeigten 9 Patienten VEGF-Werte vor Transfusion von weniger als 140 pg/ml, sowie 7 Patienten VEGF-Werte vor Transfusion von mehr als 140 pg/ml.

Bei relativ kleiner Population fanden sich in der Gruppe „VEGF < 140 pg/ml“ mehr weibliche Kinder ($p=0,041$). In sämtlichen anderen untersuchten Parametern zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Subgruppen (Tabelle 7 A-E).

Tabelle 7: Parameter in den zwei Subgruppen der Gruppe „Keine Transfusion“

	VEGF < 140 pg/ml	VEGF > 140 pg/ml	p
Anzahl (n)	9	7	
A Perinatale Parameter			
Weiblich (%)	78	14	0,041
Gestationsalter (SSW)	31 [26-40]	31 [24-39]	0,723
Geburtsgewicht (g)	1030 [610-3800]	1040 [580-3055]	0,812
Sectiorate (%)	67	86	0,585
Rate an Mehrlingen (%)	11	43	0,262
Nabelarterien-pH	7,36 [6,91-7,41]	7,27 [6,93-7,34]	0,280
APGAR nach 1 min	6 [3-9]	6 [1-9]	0,690
APGAR nach 5 min	7 [6-9]	7 [7-9]	0,662
APGAR nach 10 min	9 [6-9]	8 [8-10]	0,789
B Aktuelle Parameter			
Alter (d)	29 [3-84]	47 [1-66]	0,928
Gewicht (g)	1960 [825-3655]	1855 [640-3070]	0,717
O ₂ -Bedarf (%)	11	43	0,262
FiO ₂ = 0,22 - 0,30 (%)	0	43	0,063
FiO ₂ > 0,30 (%)	11	0	1,000
Atemunterstützung (%)	22	71	0,126
O ₂ -Sonde (%)	11	0	1,000
CPAP (%)	0	43	0,063
Konventionelle Beatmung (%)	11	29	0,550
O ₂ -Sättigung (%)	95,0 ± 5,9	93,3 ± 5,5	0,564
Arterieller pO ₂ (mmHg) [n]	54,9 ± 11,1 [6]	40,73 ± 11,8	0,132
C Hämatologische Parameter			
Erythrozyten (*10 ¹² /l)	3,66 ± 0,76	4,19 ± 0,76	0,201
Hämoglobin (g/dl)	11,98 ± 2,53	13,14 ± 2,70	0,389
Hämatokrit (%)	34,6 ± 7,1	38,29 ± 7,4	0,324
Hkt-Abfallgeschwindigkeit (%/d)	-3,00 ± 3,55	-5,20 ± 7,65	0,501
D Frühgeburtsassoziierte Erkrankungen			
ROP (%) [n]	0	14 [1]	0,438
IVH (%) [n]	0	14 [1]	0,438
BPD (%) [n]	11 [1]	14 [1]	1,000
E Therapien vor Probengewinnung			
Aktuelle Antibiotikatherapie (%) [n]	22 [2]	71 [5]	0,126
Dauer (d)	5 [5-5]	4 [1-15]	0,693
Corticoidtherapie (%) [n]	0	14 [1]	0,438
Zeitraum seit letzter Gabe (d)	0	25	/
Anzahl bisheriger Gaben (n)	0	1	/
Eisentherapie (%) [n]	22 [2]	29 [2]	1,000
Zeitraum seit letzter Gabe (d)	1 [1-1]	1 [1-1]	1,000
Anzahl bisheriger Gaben (n)	13 [4-21]	19 [10-27]	0,667
Operationen (%) [n]	0	29 [2]	0,175
Zeitraum seit letzter Operation (d)	/	9 [1-17]	/

Alle Werte als Median [Range] bzw. Mittelwert ± Standardabweichung; ROP: Retinopathia praematurorum; IVH: Intraventrikuläre Hämorrhagie; BPD: Bronchopulmonale Dysplasie

3.6 Zusammenfassung: Ergebnisse

Es kann festgehalten werden, dass in der vorliegenden Arbeit ...

Hauptfragestellung

(1) ... die VEGF-Plasmakonzentrationen nicht mit den Werten von Hb, Hkt und Hkt-Abfallgeschwindigkeit korrelierten.

(2) ... die Neugeborenen mit chronischer Anämie signifikant höhere VEGF-Plasmawerte als die Kinder der Kontrollgruppe hatten.

Nebenfragestellung

(3) ... die VEGF-Plasmakonzentrationen bei den Neugeborenen der Kontrollgruppe immer unter 140 pg/ml lagen.

(4) ... die VEGF-Plasmakonzentrationen bei den Neugeborenen mit chronischer Anämie und VEGF-Werten vor Transfusion von über 140 pg/ml durch Erythrozytentransfusion signifikant reduziert wurden.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Hauptaussagen

4.1.1 VEGF korrelierte nicht mit der Hb-Konzentration, dem Hkt und der Hkt-Abfallgeschwindigkeit

In der klinischen Routine wird der Hkt zur Einschätzung der Sauerstofftransportkapazität und des Bedarfes einer Erythrozytentransfusion bestimmt. Mit Hilfe der Sauerstofftransportkapazität lässt sich in etwa die periphere Sauerstoffversorgung der Gewebe, nicht jedoch die individuelle Schwelle zur Gewebhypoxie abschätzen. Bevor VEGF auf seine Fähigkeit, eine solche anämieassoziierte Gewebhypoxie reflektieren zu können untersucht werden konnte, sollte zuerst ein möglicher direkter Zusammenhang zwischen Hkt bzw. Hb-Wert und der VEGF-Plasmakonzentration ausgeschlossen werden. In der Literatur finden sich mehrere Untersuchungen bezüglich einer solchen Korrelation - die Ergebnisse sprechen gegen einen Zusammenhang. Maroeska Te Loo et al. (43) und Theodoridou et al. (73) fanden keine Korrelation zwischen den Konzentrationen von VEGF und Hb. Zwei weitere Autoren berichteten zwar von einem linearen Zusammenhang, dieser war jedoch entweder nur in einer Subgruppe zu bestimmen (29) oder durch Multivarianzanalyse und Kategorisierung der Hb-Werte in 3 Gruppen errechnet worden (16). Zudem berichteten Himeno et al. (29) von einer positiven, Dunst et al. (16) jedoch von einer negativen Korrelation des Hb-Wertes mit der VEGF-Plasmakonzentration. Zusammenfassend zeigen die bisher veröffentlichten Ergebnisse, dass kein direkter Zusammenhang zwischen Hkt/Hb-Wert bzw. Sauerstofftransportkapazität und den VEGF-Plasmawerten besteht. Die vorliegende Arbeit stützt diese Ergebnisse - auch hier konnte keine Korrelation zwischen der Hb-Konzentration, bzw. dem Hkt und den VEGF-Plasmakonzentrationen festgestellt werden.

Da der zeitliche Verlauf einer Anämie maßgeblichen Einfluss auf die Adaptation an eine anämieassoziierte Hypoxie hat, wurde auch ein möglicher Zusammenhang zwischen der Abfallgeschwindigkeit des Hkt und den VEGF-Plasmaspiegeln überprüft. In der Literatur wurde ein solcher Zusammenhang bisher erst einmalig untersucht - Dunst et al. (16) beschrieben eine Korrelation zwischen den VEGF-Werten und der Hb-Abfallgeschwindigkeit. Der Zeitraum zwischen erster und zweiter Messung der Konzentrationen von Hb und VEGF war mit 3-4 Wochen jedoch sehr groß. Da die VEGF-Plasmaspiegel schneller reguliert werden (4), ist eine Wertung dieses Ergebnisses nicht

möglich. In der vorliegenden Arbeit fand sich keine Korrelation zwischen der Hkt-Abfallgeschwindigkeit und der VEGF-Plasmakonzentration.

Die in der Literatur untersuchten Patienten waren ausnahmslos Erwachsene bzw. Kleinkinder, Daten für neonatologische Patienten lagen bisher nicht vor. Mit dieser Arbeit ist nun zum ersten Mal eine größere Population von Neugeborenen auf einen Zusammenhang zwischen Plasma-VEGF und Hb-Wert/Hkt bzw. Hkt-Abfallgeschwindigkeit untersucht worden. Eine Korrelation wurde nicht gefunden - die Daten aus der Literatur und der vorliegenden Arbeit sprechen übereinstimmend gegen einen direkten Zusammenhang des Plasma-VEGF mit dem Hb-Wert/Hkt und der Hkt-Abfallgeschwindigkeit.

4.1.2 Die Neugeborenen mit chronischer Anämie zeigten signifikant höhere VEGF-Plasmawerte als die Kinder der Kontrollgruppe

In der Anämiegruppe fanden sich signifikant höhere VEGF-Plasmakonzentrationen als in der Kontrollgruppe. Diese bestand unter anderem aus Früh- und Reifgeborenen mit akuter Anämie, die meist durch eine Operation oder eine akute Blutung zustande gekommen war. Damit zeigten auch die Kontrollen für ihr Lebensalter niedrige Hkt-Werte (im Mittelwert $39,4 \pm 8,3 \%$) - der Abfall des Hkt erfolgte aufgrund der akuten Genese der Anämie allerdings deutlich schneller ($\geq 5\%/d$).

Tierexperimentelle Daten deuten darauf hin, dass die VEGF-Plasmakonzentration nach einem akuten hypoxischen Reiz erst nach einigen Stunden ansteigt (4, 44). Bei einer akut zustande gekommenen Anämie und einem Messzeitpunkt kurz nach Beginn der anämischen Situation ist daher noch nicht mit erhöhten VEGF-Plasmakonzentrationen zu rechnen. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Probenabnahme zur VEGF-Bestimmung bei den Kindern der Kontrollgruppe zeitnah nach Beginn der Anämie. Die gemessenen VEGF-Plasmaspiegel sind zudem mit Daten aus der Literatur von Neugeborenen ohne Anämie vergleichbar (Tabelle 8).

Auch die erhöhten VEGF-Werte in der Anämiegruppe werden durch die Literatur gestützt, wobei jedoch keine neonatologischen Daten existieren. Neben tierexperimentellen Untersuchungen (44) wurden zum direkten Zusammenhang zwischen Anämie und der VEGF-Plasmakonzentration bisher zwei klinische Studien veröffentlicht. Solovey et al. (67) fanden in einer Gruppe von erwachsenen Patienten mit Sichelzellanämie beim Vergleich mit Kontrollen signifikant höhere VEGF-Plasmakonzentrationen (120 vs. 38 pg/ml).

Dunst et al. (16) berichteten ebenfalls von höheren VEGF-Plasmaspiegeln unter erwachsenen Patienten mit renaler Anämie (90 vs. 16 pg/ml bei gesunder Kontrollgruppe).

Tabelle 8: VEGF-Plasmakonzentrationen in der Literatur

Autor	n	Alter, Pathologie	VEGF
Lassus et al. (1999) (37)	24	7 Lebenstage, gesunde Frühgeborene (27 SSW)	48 pg/ml
Abrahamov et al. (2000) (1)	3	4 Lebenstage - 6 Lebenswochen, gesunde Reifgeborene	< 35 pg/ml
Tsao et al. (2005) (75)	30	wenige Lebensminuten, gesunde Frühgeborene (30 SSW)	43 pg/ml
Solovey et al. (1999) (67)	21	>18 Lebensjahre, Sichelzellanämie	120 pg/ml
Dunst et al. (2002) (16)	23	50 Lebensjahre, renale Anämie	90 pg/ml
Himeno et al. (2003) (29)	65	3 Lebensmonate - 40 Lebensjahre, zyanotische Herzfehler	149 pg/ml

Darüber hinaus existieren indirekte Hinweise darauf, dass eine Hypoxie zu einem Anstieg der VEGF-Plasmakonzentration führt. Man findet beispielsweise hohe VEGF-Werte bei Patienten mit hypoxieassoziierten Erkrankungen - so berichteten Himeno et al. (29) von VEGF-Plasmakonzentrationen um rund 150 pg/ml in einer Patientengruppe mit zyanotischen Herzfehlern.

Um auszuschließen, dass die Unterschiede in den VEGF-Plasmakonzentrationen in der vorliegenden Arbeit durch andere Faktoren zu erklären sind, wurden beide Studiengruppen verglichen. Dabei fiel auf, dass die Kinder in der Anämiegruppe ein signifikant niedrigeres Geburtsgewicht und Gestationsalter hatten. Allerdings waren sowohl das aktuelle Gewicht, als auch das korrigierte Gestationsalter zum Zeitpunkt der Probenentnahme gleich. Bisher existieren keine Daten darüber, ob die VEGF-Konzentration von Geburtsgewicht, sowie von Gestations- und Lebensalter abhängig ist - in der vorliegenden Arbeit wurde keine Korrelation dieser Parameter mit den VEGF-Plasmaspiegeln gefunden.

Die Kinder der Kontrollgruppe benötigten signifikant häufiger eine Atemunterstützung - gleichzeitig erhielten sie jedoch nicht signifikant mehr zusätzlichen Sauerstoff als die Kinder in der Anämiegruppe. Über die Beeinflussung der VEGF-Spiegel durch unterschiedliche Beatmungsformen existieren keine Hinweise - da die Gruppen keinen signifikant unterschiedlichen Sauerstoffbedarf hatten, erscheint eine relevante Verfälschung der VEGF-Werte unwahrscheinlich.

Zusammenfassend finden sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen beiden Studiengruppen. Zudem sind sowohl die VEGF-Plasmakonzentrationen der Kontrollgruppe,

als auch die erhöhten Werte der Anämiegruppe mit Daten aus der Literatur vergleichbar (Tabelle 8).

HIF-1 reguliert in Abhängigkeit von Hypoxie nicht nur VEGF sondern auch EPO (34). Aus diesem Grund wurde neben VEGF auch EPO im Plasma der Studienteilnehmer gemessen. Anders als die VEGF-Spiegel unterschieden sich die Plasmawerte von EPO jedoch nicht signifikant zwischen Kontroll- und Anämiegruppe. Ebenso fand sich keine Korrelation des EPO mit der Hb-Konzentration, dem Hkt und der Hkt-Abfallgeschwindigkeit. Diese Ergebnisse werden durch Daten aus der Literatur gestützt. Vor allem frühgeborene Kinder können in den ersten Lebensmonaten auf eine Anämie noch nicht mit adäquaten EPO-Spiegeln antworten - trotz des Abfalles der Hb-Konzentration durch die Trimenonreduktion auf die niedrigsten Werte in der gesamten Wachstumsphase unterscheiden sich die EPO-Spiegel von Frühgeborenen und Erwachsenen zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant voneinander (9). Die EPO-Werte korrelieren zudem nicht mit dem Schweregrad einer Anämie (36). Die Daten aus Literatur und dieser Arbeit deuten damit übereinstimmend darauf hin, dass EPO nicht als Marker einer Transfusionsbedürftigkeit von Neugeborenen zu nutzen ist.

In der vorliegenden Arbeit fiel auf, dass nicht alle Kinder in der Anämiegruppe hohe VEGF-Plasmakonzentrationen zeigten. Spiegeln die VEGF-Plasmaswerte das Ausmaß einer Gewebhypoxie und damit den Bedarf einer Erythrozytentransfusion wider, dann hätten diejenigen Kinder der Anämiegruppe mit niedrigen VEGF-Plasmakonzentrationen zum Zeitpunkt der Probenentnahme noch keine ausgeprägte Gewebhypoxie entwickelt und aus diesem Grund noch keine Erythrozytentransfusion benötigt. Es könnte somit über einen VEGF-Grenzwert spekuliert werden, dessen Überschreiten die Transfusionsbedürftigkeit einer Anämie anzeigt.

4.1.3 Definition eines VEGF-, „Cut-off“-Wertes bei 140 pg/ml

Alle Kinder in der Kontrollgruppe hatten VEGF-Plasmakonzentrationen von unter 140 pg/ml. Wenn man davon ausgeht, dass diese Kinder bisher eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Gewebe hatten, kann spekuliert werden, dass sie damit „Normalwerte“ für VEGF darstellen. Wendet man diese „Normalwerte“ auf die Kinder der Anämiegruppe an, so zeigt sich, dass 69 % dieser Kinder keine erhöhten VEGF-Werte und damit wahrscheinlich keine Gewebhypoxie hatten. Dies würde bedeuten, dass bei gut zwei Dritteln der Kinder, die nach den aktuellen Transfusionsrichtlinien eine Erythrozytentransfusion erhalten hatten, noch keine

relevante Gewebhypoxie bestand und diese Kinder keine Transfusion benötigt hätten. Im Gegensatz dazu zeigten 44 % der Kinder aus der Gruppe „keine Transfusion“ VEGF-Werte über 140 pg/ml und hätten somit bei kritischer anämieassoziierter Gewebhypoxie eventuell von einer Transfusion profitiert.

Es ist jedoch nicht völlig auszuschließen, dass bei den Kindern der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt der Probenentnahme nicht doch eine Hypoxie bestanden hat, da bisher kein Goldstandard zur Erkennung einer Hypoxie vorliegt. Eine Möglichkeit, diese zu quantifizieren besteht in der Messung der FOE (78). In einer zukünftigen Studie könnten die Bestimmungen des Plasma-VEGF mit der Messung der FOE kombiniert werden, um damit das Vorliegen einer Hypoxie zu verifizieren.

4.1.4 VEGF-Werte über 140 pg/ml sanken nach Transfusion signifikant ab

Geht man davon aus, dass hohe VEGF-Werte mit einer relevanten Gewebhypoxie assoziiert sind, dann müssten die Werte nach Normalisierung der Sauerstoffversorgung des Gewebes durch Erythrozytentransfusion wieder absinken. Tatsächlich fielen die vor Erythrozytentransfusion über 140 pg/ml erhöhten VEGF-Werte in der vorliegenden Arbeit nach Transfusion signifikant ab.

Auf der anderen Seite stiegen die vor Erythrozytentransfusion unter 140 pg/ml gelegenen VEGF-Plasmakonzentrationen nach Transfusion an. Hypothetisch könnte eine vorübergehende Aufhebung der Anämiekompensation durch die Erythrozytentransfusion zu einer kurzzeitigen Gewebhypoxie und damit zu höheren VEGF-Plasmakonzentrationen geführt haben. Der Mechanismus dieser VEGF-Erhöhung bleibt letztendlich unklar und muss in weiteren Studien untersucht werden.

Ein Einfluss der Transfusionspraxis auf die Änderung der VEGF-Werte erscheint unwahrscheinlich - es fielen keine signifikanten Unterschiede beim relativen Transfusionsvolumen und bei den durch Erythrozytentransfusion erreichten Hkt-Werten auf.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Änderung der VEGF-Plasmakonzentrationen vor und nach Erythrozytentransfusion auf die Existenz eines diagnostischen Grenzbereiches schließen lässt, der eine schädigende Gewebhypoxie anzeigt. Ob dieser „Cut-off“-Wert tatsächlich bei 140 pg/ml liegt, müssen weitere Studien klären. Auch muss untersucht werden, ob ein durch VEGF geleitetes Transfusionsregime letztendlich zu einem besseren klinischen *Outcome* der Kinder führt.

4.2 Regulation der VEGF-Expression

In der vorliegenden Studie fanden sich signifikant erhöhte VEGF-Plasmakonzentrationen bei neugeborenen Kindern mit chronischer Anämie, die als Ausdruck der Gewebehypoxie bei insuffizienter Sauerstoffversorgung interpretiert wurden. VEGF wird allerdings auch durch eine ganze Reihe anderer Faktoren beeinflusst.

a) Entzündung und Infektion

VEGF spielt eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Gefäßpermeabilität bei entzündlichen Erkrankungen (19). Des Weiteren stimulieren inflammatorische Zytokine wie Interleukin-6 die VEGF-Expression (12). Um den Einfluss einer akuten Entzündung auf die VEGF-Werte zu erfassen, wurde untersucht, ob zum Zeitpunkt der Probenentnahme eine Infektion (definiert als Antibiotikatherapie) vorlag. Es zeigte sich, dass die Kinder in der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt der Probenentnahme signifikant häufiger mit Antibiotika behandelt wurden, als die Kinder der Anämiegruppe (79 % vs. 25 %, $p < 0,001$). Die Neugeborenen in der Kontrollgruppe waren zu diesem Zeitpunkt im Median 2 Lebenstage alt - es ist daher anzunehmen, dass einige Kinder aufgrund einer maternalen Infektion eine prophylaktische antibiotische Therapie erhalten hatten, ohne dass eine gesicherte Infektion des Kindes vorlag. Da eine Entzündung die VEGF-Spiegel steigert, wäre zudem in der Kontrollgruppe eine Erhöhung der Werte zu erwarten.

Während der Wundheilung finden sich hohe VEGF-Konzentrationen im Wundserum (31). Dabei wird vermutet, dass neben der Neuproduktion auch gespeichertes VEGF aus Thrombozyten (52) freigesetzt wird. Die Kinder der Anämiegruppe wurden vor Abnahme der VEGF-Probe seltener operiert, zudem lagen deren Eingriffe länger zurück als bei den Kindern der Kontrollgruppe. Eine Erhöhung der VEGF-Plasmakonzentration wäre daher auch hier eher in der Kontrollgruppe zu erwarten - dennoch zeigten sich die VEGF-Werte dort signifikant niedriger als in der Anämiegruppe. Darüber hinaus waren die VEGF-Plasmakonzentrationen der Kontrollgruppe gut mit Werten aus der Literatur vergleichbar (1, 37, 75).

b) Hormone und Neoplasien

Eine Reihe von Hormonen, wie etwa TSH, Gonadotropine oder ACTH können die VEGF-Expression induzieren (19). Die relative Anzahl an Neugeborenen, die mit Corticoiden

behandelt wurden, unterschied sich nicht zwischen Kontroll- und Anämiegruppe. Ein direkter Einfluss von systemischen Corticoiden auf die VEGF-Plasmakonzentrationen ist nicht bekannt. Da insgesamt lediglich 15 % der Kinder aus der Kontrollgruppe und 11 % der Kinder aus der Anämiegruppe Corticoide erhalten hatten, ist eine Verfälschung der VEGF-Werte durch die Cortisontherapie eher unwahrscheinlich.

Eine ganze Reihe von Tumorerkrankungen haben starken Einfluss auf die Plasmawerte des VEGF (20). Neoplasien waren jedoch bei keinem Studienteilnehmer bekannt.

Zusammenfassend finden sich in den einzelnen Gruppen auch andere Faktoren, die neben Hypoxie die VEGF-Produktion stimulieren könnten. Diese fanden sich jedoch eher in der Kontrollgruppe, so dass sich die Unterschiede der VEGF-Plasmakonzentrationen zwischen Kontroll- und Anämiegruppe dadurch nicht erklären lassen. Die VEGF-Plasmawerte waren zudem mit ähnlichen Populationen aus der Literatur vergleichbar (1, 37, 75).

4.3 Methodendiskussion

4.3.1 Probenaufarbeitung

a) Zeitraum bis zur Zentrifugation

Die VEGF-Konzentrationen unterscheiden sich zwischen Serum- und Plasmaproben. Dafür ursächlich sind am ehesten große Mengen an VEGF in Thrombozyten, die während deren Aktivierung im Rahmen der Koagulation freigesetzt werden (30, 80). Um eine Blutgerinnung und Thrombozytenaggregation zu vermeiden, erfolgte die Bestimmung des VEGF im Plasma. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Antikoagulanz Citrat beeinflusst die VEGF-Konzentration nicht (30).

Je länger Proben bei Zimmertemperatur ruhig stehen, desto höher steigt deren VEGF-Konzentration. Während die VEGF-Werte nach 30 - 60 Minuten noch nicht erhöht sind, führt ein Zeitraum von 2 - 6 Stunden zwischen Abnahme und Weiterverarbeitung der Probe zu signifikant erhöhten VEGF-Spiegeln (30). Aus diesem Grund wurden die Proben in der vorliegenden Studie innerhalb der ersten Stunde nach Abnahme im Labor zentrifugiert und anschließend eingefroren.

b) Zentrifugation

Eine hohe Zentrifugalkraft beim Aufteilen der Probe in Plasma und korpuskuläre Bestandteile ist mit einer Reduktion des VEGF-Plasmaspiegels assoziiert, denn durch die Zentrifugation wird mit den Thrombozyten der potentiell stärkste VEGF-Speicher größtenteils entfernt. Je länger und stärker zentrifugiert wird, desto weniger Thrombozyten verbleiben in der Probe. Zentrifugiert man die Proben jedoch zu lange und mit zu hoher Zentrifugalkraft, steigen die VEGF-Werte wieder an (30). Dies ist durch eine mechanische Aktivierung der Thrombozyten mit nachfolgender Ausschüttung von VEGF durch die Zentrifugation zu erklären (30). Eine Zentrifugation von 2904g für 5 Minuten führt zu den niedrigsten VEGF-Werten direkt nach Zentrifugation, sowie zu akzeptablen Restbeständen an Thrombozyten (30). Die VEGF-Proben in der vorliegenden Studie wurden für 10 min mit einer Kraft von etwa 1400 - 2150 g zentrifugiert.

c) Lagerung

Niedrige Temperaturen können bei Thrombozyten zur Schädigung der Zellmembran mit daraus resultierender Freisetzung der Zellbestandteile führen. Mit einer solchen Zytolyse und nachfolgenden VEGF-Konzentrationsänderungen ist erst ab etwa 6 Zyklen von Einfrieren und Auftauen der Proben zu rechnen (80). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmaproben enthalten nur noch Spuren von Thrombozyten, niedrige Temperaturen haben deshalb nur noch minimale Auswirkungen auf die VEGF-Konzentration der Probe.

4.3.2 Studienpopulation

Die Einteilung der Kinder in die einzelnen Studiengruppen war vorwiegend an der Abfallgeschwindigkeit des Hkt orientiert. Eine chronische Anämie zeichnete sich durch eine niedrige, eine akute durch eine hohe Hkt-Abfallgeschwindigkeit aus. Prinzipiell fand sich keine Korrelation zwischen der Hkt-Abfallgeschwindigkeit und der VEGF-Plasmakonzentration. Bisher existieren jedoch keine allgemeingültigen Definitionen einer chronischen Anämie, daher wurden auch in der vorliegenden Arbeit die Grenzen zwischen akutem und chronischem Verlauf empirisch gesetzt.

Optimal wäre eine Kontrollgruppe aus gesunden Neugeborenen. Diese wurde jedoch von der Ethikkommission der Charité nicht genehmigt, da eine Blutentnahme bei sonst gesunden Kindern nicht vertretbar ist. VEGF wird in hypoxischen Situationen erst nach mehreren

Stunden bis Tagen hochreguliert (4, 44). Aus diesem Grund wurden für die Kontrollgruppe der vorliegenden Arbeit unter anderem Kinder mit akuten Anämien rekrutiert. Durch die zeitnahe Probenentnahme nach Beginn der Anämie erscheint eine Verfälschung der VEGF-Plasmakonzentrationen unwahrscheinlich.

4.3.3 Untersuchungsmaterial

In der vorliegenden Studie wurden die VEGF-Werte im Blutplasma bestimmt. Die Entnahme vor Transfusion erfolgte zusammen mit der Kreuzprobe, die zweite Probe wurde 24-36 Stunden nach Transfusion gemeinsam mit der Probe zur Kontrolle des Transfusionserfolges abgenommen. Beide Abnahmen erfolgten damit im Rahmen der Routineblutentnahmen bei geplanter Erythrozytentransfusion. Das für die Bestimmung der Konzentrationen von VEGF und EPO zusätzlich entnommene Blutvolumen von 0,7 ml war für die Kinder gut zu tolerieren. Häufigere Blutentnahmen zur longitudinalen Betrachtung der VEGF-Werte würden allerdings mit einem nicht unerheblichen Blutverlust einhergehen. VEGF ist im Urin messbar (79), ob eine Korrelation zwischen den Urin- und den Plasmawerten des VEGF besteht, ist jedoch noch unklar. Aus diesem Grund wird derzeit - als Fortsetzung der vorliegenden Arbeit - untersucht, ob eine Bestimmung des VEGF im Urin zur Einschätzung der Transfusionbedürftigkeit möglich ist.

4.4 Fazit

4.4.1 Klinische Relevanz

Die Anämie stellt ein großes Problem in der Neonatologie dar. Für den optimalen Zeitpunkt einer Therapie durch Erythrozytentransfusion gibt es bis heute keinen geeigneten Indikator. Prinzipiell sollte eine Transfusion erfolgen, wenn eine Anämie mit Gewebehypoxie einhergeht. Diese Hypoxie ist mit den gängigen diagnostischen Möglichkeiten bis heute jedoch nicht ausreichend zu quantifizieren. Bisher werden zur Entscheidung für oder gegen eine Erythrozytentransfusion meist die Werte von Hb und Hkt herangezogen. Diese korrelieren zwar in etwa mit der Sauerstofftransportkapazität, nicht jedoch mit dem Vorhandensein einer Gewebehypoxie. Niedrige Hkt-Werte können eine Anämie lediglich definieren, die individuelle Entscheidung über eine Therapie durch Erythrozytentransfusion muss immer im Zusammenhang mit dem klinischen Zustand des Kindes getroffen werden. Tachykardie, Tachypnoe, mangelnde Gewichtszunahme und Apnoen sind dabei u.a.

klassische Zeichen der symptomatischen Anämie. Oft zeigt diese Klinik jedoch nicht den eigentlichen Beginn des Sauerstoffmangels an - schon bei klinisch noch stabilen anämischen Kindern findet man eine erhöhte kardiale Auswurfleistung als Zeichen der unzureichenden Sauerstoffversorgung (3). In der vorliegenden Arbeit fiel auf, dass einige Kinder schon bei Hkt-Werten um 30% mit erhöhten VEGF-Spiegeln reagierten, während andere bei Hkt-Werten um 20% noch niedrige VEGF-Konzentrationen aufwiesen. Dies spricht dafür, dass die Hypoxieschwelle individuell sehr unterschiedlich und mit den gängigen diagnostischen Möglichkeiten nicht genau darzustellen ist. Eine alleinige Einschätzung der Transfusionsbedürftigkeit von neugeborenen Kindern anhand der Klinik und der Werte von Hb und Hkt erscheint nicht ausreichend, um einen beginnenden Sauerstoffmangel rechtzeitig zu erkennen.

Bisher untersuchte Parameter, die eine anämiebedingte Hypoxie genauer darstellen sollten, konnten sich nicht durchsetzen. Die gemessenen Werte der FOE sind zwar bei Kindern mit symptomatischer Anämie erhöht (78) und die FOE damit prinzipiell als Transfusionsindikator geeignet - aufgrund nicht eindeutiger Studienergebnisse (77) ist diese Methode bis heute allerdings nicht etabliert. Die Blutlaktatkonzentration steht ebenfalls in engem Zusammenhang mit Hypoxie - in Studien konnte sie jedoch nicht als verlässlicher Parameter überzeugen (24). Auch EPO eignet sich nicht als Indikator einer Transfusionsbedürftigkeit - im Neugeborenenalter ist der Organismus noch nicht fähig, auf eine Anämie mit einem ausreichenden EPO-Anstieg zu reagieren (9). In dieser Studie unterschieden sich die EPO-Spiegel von Anämie- und Kontrollgruppe nicht signifikant.

Die vorliegende Arbeit beschreibt zum ersten Mal VEGF als Transfusionsindikator von anämischen Neugeborenen. Es konnte gezeigt werden, dass die Neugeborenen mit chronischer Anämie signifikant höhere VEGF-Plasmakonzentrationen als die Kinder der Kontrollgruppe hatten. Wenn die VEGF-Spiegel die Sauerstoffsituation der Gewebe reflektieren, dann sind erhöhte Werte als Zeichen der anämieassoziierten Gewebhypoxie zu werten. Das Überschreiten bestimmter VEGF-Grenzwerte könnte somit auf das Vorliegen einer relevanten Gewebhypoxie und damit auf den Bedarf einer Erythrozytentransfusion hinweisen - in der vorliegenden Arbeit fand sich ein solcher VEGF-„Cut-off“- Wert bei 140 pg/ml.

Damit kommt der Bestimmung des VEGF theoretisch eine entscheidende klinische Bedeutung zu. Aufgrund nicht unerheblicher Risiken für die Kinder muss die Indikation zur Erythrozytentransfusion sehr eng gestellt werden – mit den heute gängigen diagnostischen

Mitteln ist diese Entscheidung objektiv jedoch nicht zu treffen. Die Möglichkeit der Quantifizierung der anämieassoziierten Gewebhypoxie durch Bestimmung der VEGF-Plasmakonzentration könnte helfen, die individuelle Hypoxieschwelle genauer darzustellen und damit den pathophysiologisch sinnvollen Zeitpunkt einer Therapie durch Erythrozytentransfusion exakter zu setzen. Zur klinischen Nutzung bedarf es jedoch zuerst größerer Studien. Dabei sollte grundsätzlich untersucht werden, ob eine durch definierte VEGF-Grenzwerte geleitete Transfusionsrichtlinie zu einem schnelleren Wachstum bzw. zu einem besseren klinischen *Outcome* der Kinder führt. Möglicherweise kann eine Gewebhypoxie dabei durch die Kombination der Bestimmungen von VEGF-Konzentration und FOE genauer quantifiziert werden. Für eine longitudinale VEGF-Messung wäre es zudem interessant, ob der Zusammenhang zwischen chronischer Anämie und VEGF im Plasma auch auf die Urinspiegel übertragbar ist.

4.4.2 Ausblick

Wenn VEGF tatsächlich die Gewebhypoxie reflektiert, sind weitere Nutzungsmöglichkeiten denkbar. VEGF findet sich vermehrt im Plazentagewebe von Müttern neugeborener Kinder mit hypoxisch-ischämischer Enzephalopathie (74) - es ist daher denkbar, VEGF als Asphyxiemarker zu nutzen, mit Hilfe dessen die Indikation zur Entbindung objektiver gestellt werden könnte. Auch ein Einsatz bei Patienten mit zyanotischen Herzfehlern ist denkbar: bis heute basieren die Sauerstoffsättigungsgrenzen ebenfalls nicht auf pathophysiologischen Grundlagen - VEGF könnte helfen, diese objektiver zu setzen.

5 Zusammenfassung

Bis heute stellt die chronische Anämie ein großes Problem in der Neonatologie dar. Einzige Therapieoption ist die Erythrozytentransfusion, deren Indikation aufgrund zum Teil schwerwiegender Risiken wie Transfusionsreaktionen oder Infektionen sehr eng gestellt werden muss. Die Gefahr einer Anämie liegt in der Ausbildung einer Gewebehypoxie, welche durch die heute gängigen Transfusionsrichtlinien (basierend auf den Werten von Hb / Hkt sowie der Klinik) jedoch nicht ausreichend erkannt werden kann. Bislang ist es nicht möglich, diese anämieassoziierte Gewebehypoxie direkt zu messen. VEGF ist ein sauerstoffabhängig regulierter Wachstumsfaktor, der bei Patienten mit renaler Anämie erhöht ist. Die vorliegende Arbeit untersucht die Möglichkeit, VEGF als objektiven Indikator einer Transfusionsbedürftigkeit von Neugeborenen zu nutzen.

In einer prospektiven Studie wurden die VEGF-Plasmakonzentrationen von Früh- und Reifgeborenen mit der klinischen Diagnose einer transfusionsbedürftigen Anämie bestimmt. Zur Auswertung wurden die Kinder in 3 Studiengruppen eingeteilt: *Kontrollgruppe* (Transfusion aufgrund einer akuten Anämie - meist durch eine Blutung - mit Hkt-Abfallgeschwindigkeit $\geq 5\%/d$ und Kinder mit klinischer Indikation zur Transfusion am 1. oder 2. Lebenstag), *Anämiegruppe* (Transfusion aufgrund einer chronischen Anämie mit Hkt-Abfallgeschwindigkeit $< 5\%/d$) und *ohne Transfusion* (trotz Anämiediagnostik aus klinischen Gründen keine durchgeführte Erythrozytentransfusion). Bei allen Kindern wurden jeweils vor und nach Transfusion die Plasmakonzentrationen von VEGF und EPO bestimmt sowie der klinische Zustand anhand prospektiv definierter Parameter charakterisiert.

Es zeigte sich, dass die VEGF-Plasmaspiegel nicht mit der Hb-Konzentration, dem Hkt und der Hkt-Abfallgeschwindigkeit korrelierten. Beim Vergleich der VEGF-Plasmakonzentrationen fanden sich signifikant höhere Werte in der Anämiegruppe (Median 93 pg/ml, IQR 46-151) als in der Kontrollgruppe (45 pg/ml, IQR 30-94), während sich die EPO-Spiegel nicht unterschieden. Da alle Kinder der Kontrollgruppe VEGF-Plasmaspiegel von unter 140 pg/ml zeigten, wurde dieser Wert als obere Normgrenze („*Cut-off*“) von Neugeborenen mit suffizienter Sauerstoffversorgung der Gewebe angenommen. Insgesamt zeigten 30% der chronisch anämischen, sowie 43% der nicht transfundierten Kinder VEGF-Werte über diesem „*Cut-off*“-Wert. VEGF-Plasmaspiegel von Kindern der Anämiegruppe, welche vor

Transfusion über dem „*Cut-off*“-Wert von 140 pg/ml lagen, fielen nach Erythrozytentransfusion signifikant ab.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die These, VEGF als objektiven Transfusionsindikator von Neugeborenen nutzen zu können, unterstützen. Aus ethischen Gründen war es nicht möglich, gesunde Neugeborene als Kontrollgruppe zu rekrutieren. Da ein Anstieg der VEGF-Plasmawerte nach einem akuten hypoxischen Reiz erst innerhalb von mehreren Stunden messbar wird, wurden zum Teil Neugeborene mit akuten Anämien als Kontrollgruppe herangezogen. Die VEGF-Plasmakonzentrationen dieser Kinder stimmen mit vergleichbaren Daten aus der Literatur von Neugeborenen ohne Anämie überein. Über 140 pg/ml erhöhte VEGF-Werte könnten daher als Zeichen einer relevanten Gewebehypoxie und damit des Bedarfes einer Erythrozytentransfusion gedeutet werden.

Größere klinische Studien sollten nun untersuchen, ob 140 pg/ml wirklich der ideale VEGF-„*Cut-off*“-Wert ist, um eine schädigende Gewebehypoxie anzuzeigen. Ferner sollte geklärt werden, ob eine Transfusionsrichtlinie anhand prospektiv definierter VEGF-Grenzwerte im Vergleich mit den aktuell gängigen Richtlinien anhand von Hkt / Hb zu einem besseren klinischen *Outcome* von Neugeborenen führt.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

1. Abrahamov D, Erez E, Tamariz M, Dagan O, Pearl E, Abrahamov Y, Gendel B, Desai N, Kats J, Vidne B, Barak V. Plasma vascular endothelial growth factor level is a predictor of the severity of postoperative capillary leak syndrome in neonates undergoing cardiopulmonary bypass. *Pediatr Surg Int* 2002;18(1):54-9.
2. Aisenberg RB, Rosenthal A, Nadas AS, Wolff PH. Developmental delay in infants with congenital heart disease. Correlation with hypoxemia and congestive heart failure. *Pediatr Cardiol* 1982;3(2):133-7.
3. Alkalay AL, Galvis S, Ferry DA, Simmons CF, Krueger RC, Jr. Hemodynamic changes in anemic premature infants: are we allowing the hematocrits to fall too low? *Pediatrics* 2003;112(4):838-45.
4. Ankoma-Sey V, Wang Y, Dai Z. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 2000;31(1):141-8.
5. Bass JL, Corwin M, Gozal D, Moore C, Nishida H, Parker S, Schonwald A, Wilker RE, Stehle S, Kinane TB. The effect of chronic or intermittent hypoxia on cognition in childhood: a review of the evidence. *Pediatrics* 2004;114(3):805-16.
6. Bednarek FJ, Weisberger S, Richardson DK, Frantz ID, 3rd, Shah B, Rubin LP. Variations in blood transfusions among newborn intensive care units. SNAP II Study Group. *J Pediatr* 1998;133(5):601-7.
7. Bell EF, Strauss RG, Widness JA, Mahoney LT, Mock DM, Seward VJ, Cress GA, Johnson KJ, Kromer IJ, Zimmerman MB. Randomized trial of liberal versus restrictive guidelines for red blood cell transfusion in preterm infants. *Pediatrics* 2005;115(6):1685-91.
8. Blunden S, Lushington K, Kennedy D, Martin J, Dawson D. Behavior and neurocognitive performance in children aged 5-10 years who snore compared to controls. *J Clin Exp Neuropsychol* 2000;22(5):554-68.
9. Brown MS, Phibbs RH, Garcia JF, Dallman PR. Postnatal changes in erythropoietin levels in untransfused premature infants. *J Pediatr* 1983;103(4):612-7.
10. Bundesärztekammer. Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten. Deutscher Ärzte-Verlag; 3. Auflage; Köln 2003.
11. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996;380(6573):435-9.
12. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1996;271(2):736-41.
13. Dallman PR. Anemia of prematurity. *Annu Rev Med* 1981;32:143-60.
14. Dame C, Juul SE. The switch from fetal to adult erythropoiesis. *Clin Perinatol* 2000;27(3):507-26.
15. Dickinson JE, Duncombe GJ, Evans SF, French NP, Hagan R. The long term neurologic outcome of children from pregnancies complicated by twin-to-twin transfusion syndrome. *Bjog* 2005;112(1):63-8.

16. Dunst J, Becker A, Lautenschlager C, Markau S, Becker H, Fischer K, Haensgen G. Anemia and elevated systemic levels of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Strahlenther Onkol* 2002;178(8):436-41.
17. Faucher D. Red blood cell transfusions in newborn infants: Revised guidelines. *Paediatr Child Health* 2002;7(8):553-8.
18. Feldt RH, Ewert JC, Stickler GB, Weidman WH. Children with congenital heart disease. Motor development and intelligence. *Am J Dis Child* 1969;117(3):281-7.
19. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004;25(4):581-611.
20. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18(1):4-25.
21. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 1992;13(1):18-32.
22. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995;376(6535):66-70.
23. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996;16(9):4604-13.
24. Frey B, Losa M. The value of capillary whole blood lactate for blood transfusion requirements in anaemia of prematurity. *Intensive Care Med* 2001;27(1):222-7.
25. Gibson BE, Todd A, Roberts I, Pamphilon D, Rodeck C, Bolton-Maggs P, Burbin G, Duguid J, Boulton F, Cohen H, Smith N, McClelland DB, Rowley M, Turner G. Transfusion guidelines for neonates and older children. *Br J Haematol* 2004;124(4):433-53.
26. Goodnough LT. Risks of blood transfusion. *Crit Care Med* 2003;31(12 Suppl):S678-86.
27. Guest GM, Brown EW. Erythrocytes and hemoglobin of the blood in infancy and childhood. III. Factors in variability, statistical studies. *AMA J Dis Child* 1957;93(5):486-509.
28. Harmey JH, Dimitriadis E, Kay E, Redmond HP, Bouchier-Hayes D. Regulation of macrophage production of vascular endothelial growth factor (VEGF) by hypoxia and transforming growth factor beta-1. *Ann Surg Oncol* 1998;5(3):271-8.
29. Himeno W, Akagi T, Furui J, Maeno Y, Ishii M, Kosai K, Murohara T, Kato H. Increased angiogenic growth factor in cyanotic congenital heart disease. *Pediatr Cardiol* 2003;24(2):127-32.
30. Hormbrey E, Gillespie P, Turner K, Han C, Roberts A, McGrouther D, Harris AL. A critical review of vascular endothelial growth factor (VEGF) analysis in peripheral blood: is the current literature meaningful? *Clin Exp Metastasis* 2002;19(8):651-63.
31. Howdieshell TR, Riegner C, Gupta V, Callaway D, Grembowicz K, Sathyanarayana, McNeil PL. Normoxic wound fluid contains high levels of vascular endothelial growth factor. *Ann Surg* 1998;228(5):707-15.
32. Izraeli S, Ben-Sira L, Harell D, Naor N, Ballin A, Davidson S. Lactic acid as a predictor for erythrocyte transfusion in healthy preterm infants with anemia of prematurity. *J Pediatr* 1993;122(4):629-31.
33. Jakeman LB, Winer J, Bennett GL, Altar CA, Ferrara N. Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest* 1992;89(1):244-53.

34. Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med* 2004;43(8):649-59.
35. Jones KL, Krous HF, Nadeau J, Blackbourne B, Zielke HR, Gozal D. Vascular endothelial growth factor in the cerebrospinal fluid of infants who died of sudden infant death syndrome: evidence for antecedent hypoxia. *Pediatrics* 2003;111(2):358-63.
36. Keyes WG, Donohue PK, Spivak JL, Jones MD, Jr., Oski FA. Assessing the need for transfusion of premature infants and role of hematocrit, clinical signs, and erythropoietin level. *Pediatrics* 1989;84(3):412-7.
37. Lassus P, Ristimaki A, Ylikorkala O, Viinikka L, Andersson S. Vascular endothelial growth factor in human preterm lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159(5 Pt 1):1429-33.
38. Lozoff B, Jimenez E, Wolf AW. Long-term developmental outcome of infants with iron deficiency. *N Engl J Med* 1991;325(10):687-94.
39. Madan A, Kumar R, Adams MM, Benitz WE, Geaghan SM, Widness JA. Reduction in red blood cell transfusions using a bedside analyzer in extremely low birth weight infants. *J Perinatol* 2005;25(1):21-5.
40. Maier RF, Obladen M, Kattner E, Natzschka J, Messer J, Regazzoni BM, Speer CP, Fellman V, Grauel EL, Groneck P, Wagner M, Moriette G, Salle BL, Verellen G, Scigalla P. High-versus low-dose erythropoietin in extremely low birth weight infants. The European Multicenter rhEPO Study Group. *J Pediatr* 1998;132(5):866-70.
41. Maier RF, Obladen M, Muller-Hansen I, Kattner E, Merz U, Arlettaz R, Groneck P, Hammer H, Kossel H, Verellen G, Stock GJ, Lacaze-Masmonteil T, Claris O, Wagner M, Matis J, Gilberg F. Early treatment with erythropoietin beta ameliorates anemia and reduces transfusion requirements in infants with birth weights below 1000 g. *J Pediatr* 2002;141(1):8-15.
42. Maier RF, Sonntag J, Walka MM, Liu G, Metze BC, Obladen M. Changing practices of red blood cell transfusions in infants with birth weights less than 1000 g. *J Pediatr* 2000;136(2):220-4.
43. Maroeska Te Loo D, Bosma N, Van Hinsbergh V, Span P, De Waal R, Clarijs R, Sweep C, Monnens L, Van Den Heuvel L. Elevated levels of vascular endothelial growth factor in serum of patients with D+ HUS. *Pediatr Nephrol* 2004;19(7):754-60.
44. McLaren AT, Marsden PA, Mazer CD, Baker AJ, Stewart DJ, Tsui AK, Li X, Yucel Y, Robb M, Boyd SR, Liu E, Yu J, Hare GM. Increased expression of HIF-1alpha, nNOS, and VEGF in the cerebral cortex of anemic rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;292(1):R403-14.
45. Ment LR, Schwartz M, Makuch RW, Stewart WB. Association of chronic sublethal hypoxia with ventriculomegaly in the developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 1998;111(2):197-203.
46. Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest* 1994;71(3):374-9.
47. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* 1999;13(1):9-22.
48. Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Hayashi Y, Yamashita T, Yamashita J, Yamamoto H. Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes. *J Biol Chem* 1995;270(47):28316-24.

49. Obladen M, Diepold K, Maier RF. Venous and arterial hematologic profiles of very low birth weight infants. *European Multicenter rhEPO Study Group. Pediatrics* 2000;106(4):707-11.
50. Obladen M, Sachsenweger M, Stahnke M. Blood sampling in very low birth weight infants receiving different levels of intensive care. *Eur J Pediatr* 1988;147(4):399-404.
51. Ohlsson A, Aher SM. Early erythropoietin for preventing red blood cell transfusion in preterm and/or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;3:CD004863.
52. Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 1993;4(12):1317-26.
53. Prandota J. Possible pathomechanisms of sudden infant death syndrome: key role of chronic hypoxia, infection/inflammation states, cytokine irregularities, and metabolic trauma in genetically predisposed infants. *Am J Ther* 2004;11(6):517-46.
54. Rabe H, Reynolds G, Diaz-Rossello J. Early versus delayed umbilical cord clamping in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2004(4):CD003248.
55. Rao R, Georgieff MK. Perinatal aspects of iron metabolism. *Acta Paediatr Suppl* 2002;91(438):124-9.
56. Reading FC, Brecher ME. Transfusion-related bacterial sepsis. *Curr Opin Hematol* 2001;8(6):380-6.
57. Roseff SD, Luban NL, Manno CS. Guidelines for assessing appropriateness of pediatric transfusion. *Transfusion* 2002;42(11):1398-413.
58. Roth W, Seifried E. Infektionsrisiken durch Blutkomponenten und Blutprodukte. *Hämotherapie* 2003;1/03:22-35.
59. Sanchez R, Toy P. Transfusion related acute lung injury: a pediatric perspective. *Pediatr Blood Cancer* 2005;45(3):248-55.
60. Schulman I. The anemia of prematurity. *J Pediatr* 1959;54(5):663-72.
61. Schwartz ML, Vaccarino F, Chacon M, Yan WL, Ment LR, Stewart WB. Chronic neonatal hypoxia leads to long term decreases in the volume and cell number of the rat cerebral cortex. *Semin Perinatol* 2004;28(6):379-88.
62. Seiberth V, Linderkamp O. Risk factors in retinopathy of prematurity. a multivariate statistical analysis. *Ophthalmologica* 2000;214(2):131-5.
63. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995;376(6535):62-6.
64. Shalak L, Perlman JM. Hemorrhagic-ischemic cerebral injury in the preterm infant: current concepts. *Clin Perinatol* 2002;29(4):745-63.
65. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992;359(6398):843-5.
66. Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E. Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(3):768-72.
67. Solovey A, Gui L, Ramakrishnan S, Steinberg MH, Hebbel RP. Sick cell anemia as a possible state of enhanced anti-apoptotic tone: survival effect of vascular endothelial growth factor on circulating and unanchored endothelial cells. *Blood* 1999;93(11):3824-30.

68. Stehling L, Luban NL, Anderson KC, Sayers MH, Long A, Attar S, Leitman SF, Gould SA, Kruskall MS, Goodnough LT, et al. Guidelines for blood utilization review. *Transfusion* 1994;34(5):438-48.
69. Stein I, Neeman M, Shweiki D, Itin A, Keshet E. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. *Mol Cell Biol* 1995;15(10):5363-8.
70. Strauss RG. Transfusion therapy in neonates. *Am J Dis Child* 1991;145(8):904-11.
71. Strauss RG. Data-driven blood banking practices for neonatal RBC transfusions. *Transfusion* 2000;40(12):1528-40.
72. Teoh SL, Boo NY, Ong LC, Nyein MK, Lye MS, Au MK. Duration of oxygen therapy and exchange transfusion as risk factors associated with retinopathy of prematurity in very low birthweight infants. *Eye* 1995;9 (Pt 6):733-7.
73. Theodoridou S, Vyzantiadis T, Vakalopoulou S, Perifanis V, Tziomalos K, Vyzantiadis A, Garipidou V. Elevated levels of serum vascular endothelial growth factor in patients with polycythaemia vera. *Acta Haematol* 2003;110(1):16-9.
74. Trollmann R, Amann K, Schoof E, Beinder E, Wenzel D, Rascher W, Dotsch J. Hypoxia activates the human placental vascular endothelial growth factor system in vitro and in vivo: up-regulation of vascular endothelial growth factor in clinically relevant hypoxic ischemia in birth asphyxia. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188(2):517-23.
75. Tsao PN, Wei SC, Chou HC, Su YN, Chen CY, Hsieh FJ, Hsieh WS. Vascular endothelial growth factor in preterm infants with respiratory distress syndrome. *Pediatr Pulmonol* 2005;39(5):461-5.
76. Urschitz MS, Wolff J, Sokollik C, Eggebrecht E, Urschitz-Duprat PM, Schlaud M, Poets CF. Nocturnal arterial oxygen saturation and academic performance in a community sample of children. *Pediatrics* 2005;115(2):e204-9.
77. Wardle SP, Garr R, Yoxall CW, Weindling AM. A pilot randomised controlled trial of peripheral fractional oxygen extraction to guide blood transfusions in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2002;86(1):F22-7.
78. Wardle SP, Yoxall CW, Crawley E, Weindling AM. Peripheral oxygenation and anemia in preterm babies. *Pediatr Res* 1998;44(1):125-31.
79. Wasilewska A, Zoch-Zwierz W. Glucocorticoid receptor and vascular endothelial growth factor in nephrotic syndrome. *Acta Paediatr* 2006;95(5):587-93.
80. Webb NJ, Bottomley MJ, Watson CJ, Brenchley PE. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is released from platelets during blood clotting: implications for measurement of circulating VEGF levels in clinical disease. *Clin Sci (Lond)* 1998;94(4):395-404.

6.2 Elterninformation/Aufklärung

Liebe Eltern,

Ihr Kind liegt auf der Intensivstation eines neonatologischen Zentrums der Universitätsklinik Charité. Dank der langjährigen Erfahrung und des ständig wachsenden Wissens durch intensive Forschung, kann inzwischen sowohl sehr kleinen als auch reifen Neugeborenen mit schwerwiegenden Erkrankungen, wie angeborenen Herzfehlern und Fehlbildungen im Magen/Darbereich, der Start ins Leben erleichtert werden. Trotzdem treten bei der medizinischen Versorgung dieser besonders kleinen Kinder noch einige Probleme und Fragen auf. Wir möchten durch unsere Forschung dazu beitragen, Erkrankungen und Probleme zu vermeiden oder rechtzeitig optimal behandeln zu können.

Die Blutarmut (Anämie) kann man bei sehr kleinen und kranken Frühgeborenen nur schwer verhindern. Dafür gibt es im Wesentlichen zwei Gründe. Einerseits ist die Produktion roter Blutzellen bei sehr unreifen Neugeborenen deutlich herabgesetzt, andererseits entsteht besonders bei kranken Früh- und Neugeborenen durch einen erhöhten Verbrauch an roten Blutzellen und die notwendigen Blutentnahmen ein erheblicher Blutverlust, der durch die Neuproduktion nicht ausgeglichen werden kann.

Da die roten Blutkörperchen für den Transport von Sauerstoff im Blut notwendig sind, kann ein Mangel an roten Blutzellen zu Gedeihstörungen, vermehrten Herzfrequenzabfällen und einem erhöhten Sauerstoffbedarf in der Atemluft führen. Der Kinderarzt wird abhängig von den Kontrollen der Blutwerte und den o.g. klinischen Begleitsymptomen entscheiden, wann der Zeitpunkt für eine Transfusion, d.h. der Gabe von roten Blutzellen (auch Erythrozyten genannt), gekommen ist. Zwar gibt es allgemeine Richtlinien zur Transfusion von Erythrozytenkonzentraten bei frühen und kranken Neugeborenen, aber diese beruhen nicht auf kontrollierten Studien, sondern auf Expertenmeinungen.

Obwohl man weiß, dass die Sauerstoffversorgung des Körpers von der Zahl der roten Blutzellen abhängig ist, kann die Sauerstoffversorgung trotz eines Mangels an roten Blutzellen ausreichend sein, wenn dieser Zustand sehr langsam entstanden ist. Da es bis heute kein direktes Maß für die Sauerstoffversorgung des Gewebes gibt, soll im Rahmen der geplanten Studie untersucht werden, ob ein bestimmter Stoff, der VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ein geeigneter Marker für eine „kritische“ Anämie bei Früh- und Reifgeborenen ist, d.h. für eine Anämie, die mit einem Sauerstoffmangel auf zellulärer Ebene

einhergeht. VEGF wird dann vermehrt im Blut gebildet, wenn es im Gewebe zu einer Minderversorgung mit Sauerstoff kommt.

Wir möchten die VEGF-Konzentration im Blut Ihres Kindes untersuchen, um herauszufinden, ob die VEGF-Konzentration im Blut von anämischen Kindern einen Sauerstoffmangel und damit einen Transfusionsbedarf anzeigt.

Was bedeutet es für Ihr(e) Kind(er) an der Studie teilzunehmen?

Wenn bei Ihrem Kind eine Anämie besteht und sich der Kinderarzt zu einer Gabe von roten Blutzellen entschlossen hat, wird im Rahmen der normalen Vorbereitung der Transfusion sogenanntes Kreuzblut von Ihrem Kind zur erneuten Bestimmung der Blutgruppe und „Abgleich“ mit dem zu transfundierenden Blut abgenommen. Für unsere Studie benötigen wir wenig Extrablut (ca. 0,7 ml), welches während der Entnahme des „Kreuzblutes“ mit abgenommen werden kann. Das heißt, für Ihr Kind ist kein zusätzlicher Eingriff erforderlich.

Etwa 36-48 Stunden nach Transfusion wird der Erfolg der Transfusion routinemäßig durch eine erneute Abnahme der Blutwerte kontrolliert. Es wird dadurch untersucht, ob die Zahl der roten Blutkörperchen nach erfolgter Transfusion angestiegen ist. Im Rahmen dieser routinemäßigen Kontrolle benötigen wir nochmals 0,7 ml Blut von Ihrem Kind, um auch den Verlauf der VEGF-Konzentration zu dokumentieren. Weitere Untersuchungen Ihres Kindes sind NICHT nötig.

Bitte lesen Sie sich die o.g. Ausführungen in Ruhe durch, Wenn Sie noch Fragen haben oder Ihnen etwas unklar ist, wenden Sie sich bitte an Dr.

Er/Sie wird gerne Ihre Fragen beantworten.

Ihr Einverständnis können Sie JEDERZEIT und ohne Angabe von Gründen widerrufen. Es entsteht dadurch weder für Sie noch für Ihr Kind irgendein Nachteil bei der Behandlung.

Aufklärung über den Datenschutz:

Ihre Daten werden selbstverständlich gemäß dem Datenschutzgesetz vertraulich behandelt und nicht an Dritte weitergegeben. Ein Informationsaustausch findet lediglich zwischen der Studienärztin/dem Studienarzt und der/dem behandelnden Ärztin/Arzt statt. Sofern und soweit Sie darin einwilligen, werden die im Rahmen der o.g. Studie erhobenen Daten Ihres/Ihrer Kinder von der Studienärztin/dem Studienarzt wie folgt verarbeitet:

Die im Rahmen der o.g. Studie erhobenen Angaben über Name, Geschlecht, Geburtsdatum und die Gesundheit bzw. Krankheit Ihres Kindes werden von der Studienärztin/dem

Studienarzt handschriftlich oder elektronisch aufgezeichnet. Diese Angaben bleiben bei der Studienärztin/dem Studienarzt. Die Ergebnisse der o.g. Studie werden ohne Bezugsmöglichkeit auf Ihr Kind (anonymisiert) voraussichtlich in einer medizinischen Zeitschrift veröffentlicht. Die von Ihrem/Ihren Kindern im Rahmen dieser Studie entnommenen Blutproben werden in einem Labor der Klinik untersucht und nach Studienende vernichtet.

6.3 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

6.4 Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Roland Wauer für die Möglichkeit, diese Dissertation an der Klinik für Neonatologie am Campus Mitte der Charité Berlin verfassen zu können.

Herzlich danken möchte ich Herrn PD Dr. Mario Rüdiger für die intensive und sehr gute Betreuung. Trotz eines beruflichen Ortswechsels war er über den gesamten Zeitraum dieser Arbeit jederzeit ansprechbar und immer hilfsbereit. Auch Frau Dr. Edda Tschirch sei herzlich gedankt, speziell für die wichtige Unterstützung zu Beginn der Arbeit.

Besonders bei den kleinen Patienten der Stationen 107i/108i und Ihren Eltern möchte ich mich herzlich für die Teilnahme an der Studie bedanken. Ohne ihr Mitwirken hätte diese Arbeit nicht entstehen können.

Dem gesamten Team der Klinik für Neonatologie sei für die langwierige Sammlung der Proben gedankt - besonders Herr Alexander von Gise hat dabei durch seine Ausdauer sehr geholfen. Danke auch an Evelyn Strauss für die Messung der Proben.

Herzlichen Dank.

6.5 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Benedikt Weber, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „VEGF als Indikator einer transfusionsbedürftigen Anämie bei Neugeborenen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 20. September 2007

Benedikt Weber