

### **3 Materialien und Methoden**

Insgesamt wurden 526 Dauerblutspender (289 Männer und 237 Frauen) in die Studie eingeschlossen.

#### **3.1 Aufklärung, Einverständniserklärung und Versicherung**

Ein positives Votum der Ethik-Kommission der Charité Universitätsmedizin Berlin lag vor. Alle Spender erfüllten die Spendetauglichkeitskriterien gemäß der Richtlinien (Richtlinien 00). Vor jeder Spende erfolgte eine ärztliche Untersuchung. Jeder Proband wurde anhand einer Probandeninformation über Studiendesign und mögliche Gefahren informiert. Die Teilnahme an der Studie war freiwillig und ein Studienabbruch war jederzeit ohne Angaben von Gründen möglich. Die Studienteilnehmer wurden gemäß § 40 Abs.1 Nr.8 und Abs.3 AMG gegen Schäden aus der Anwendung des Prüfpräparates bei der Albingia Versicherung versichert. Ebenso wurden die Probanden informiert, dass den in der Bundesrepublik Deutschland geltenden Bestimmungen des Datenschutzes nachgekommen wird. Von jedem Probanden wurde vor Beginn der studienbezogenen Maßnahmen eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt.

#### **3.2 Prüfpräparat**

Das Prüfpräparat wurde durch Phyt-Immun GmbH, Homburg, Deutschland hergestellt und bestand aus identischen Kapseln in Blister-Packungen.

##### Zusammensetzung einer Kapsel

20 mg bzw. 0 mg Elementareisen als Eisen(II)-Gluconat

1,5 mg Pyridoxal-Phosphat

2,25 µg Cyanocobalamin

400 mg Ascorbinsäure

200 µg Folsäure

75 µg Biotin

Dieses Präparat entspricht den Kriterien eines diätetischen Lebensmittels (Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke) gemäß der Zwölften Verordnung zur Änderung der Diätverordnung vom 31.03.2003 und ist somit nicht apothekenpflichtig.

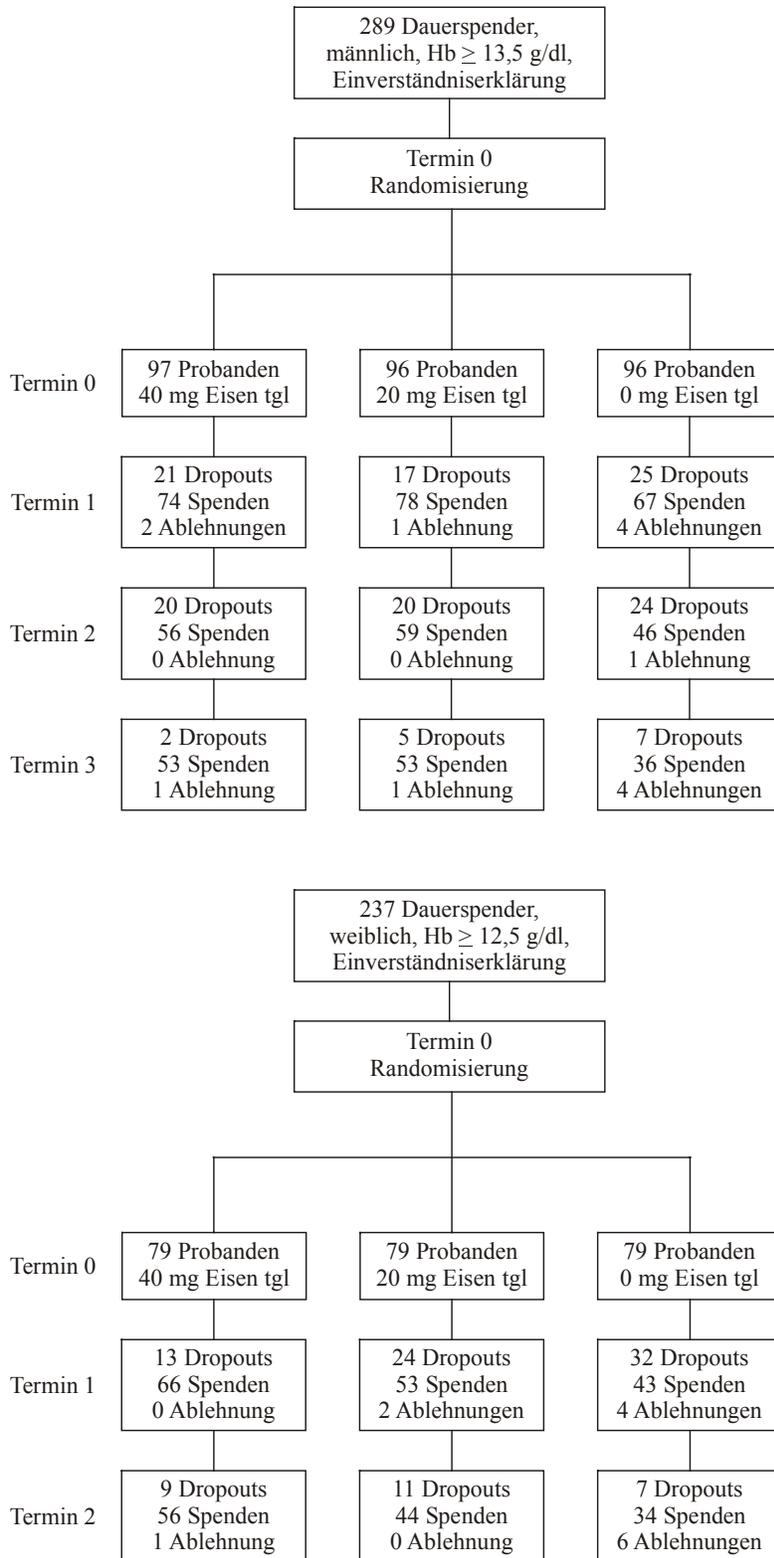
### **3.3 Studiendesign**

Die vorliegende Studie wurde als randomisierter, placebokontrollierter Parallelgruppenvergleich im Rahmen einer Anwendungsbeobachtung durchgeführt. Die Studienteilnehmer wurden in einen von drei Studienarmen randomisiert und erhielten zwei Kapseln täglich entweder mit 40 mg, 20 mg oder 0 mg elementarem Eisen über insgesamt sechs Monate. Die Untersuchung wurde als Doppelblind-Studie durchgeführt.

### **3.4 Studienablauf**

Am Termin 0 erfolgten Studieneinschluss, Randomisierung und erste Vollblutspende. Die anschließenden Termine in Verbindung mit einer Vollblutspende fanden alle acht Wochen bei Männern und alle zwölf Wochen bei Frauen statt, was insgesamt drei nachfolgenden Spenden bei Männern und zwei bei Frauen entsprach (Abbildung 4). Die Abstände zwischen zwei Blutspenden entsprachen gemäß den Richtlinien den minimal zulässigen Intervallen.

Abbildung 4: Verlaufsdiagramm der Studie



### 3.5 Zielgrößen

Bei jeder Vorstellung wurden Blutproben zur Bestimmung der Konzentration von Hämoglobin, Ferritin und löslichem Transferrin-Rezeptor entnommen. Bei Studienteilnehmern mit einer Hämoglobin-Konzentration unterhalb des vorgeschriebenen Normbereiches wurde an dem entsprechenden Termin keine Spende durchgeführt. Eine neue Vorstellung in 2 Wochen wurde vereinbart, bei der erneut die Spendetauglichkeit überprüft wurde. Bei einer ausreichenden Hämoglobin-Konzentration wurde eine Vollblutspende durchgeführt. Lag die Hämoglobin-Konzentration weiterhin unterhalb des zulässigen Schwellen-Wertes, fand die nächste Vorstellung erst 8 bzw. 12 Wochen später statt.

#### 3.5.1 Hämoglobin-Bestimmung

Die Hämoglobin-Konzentration in Kapillarblutproben wurde mit der Azid-Methämoglobinmethode in einem HemoCue Hämoglobin B-Photometer (HemoCue, Großostheim, Deutschland) oder in einem Biotest Hemoglobin Tester (Biotest Medizintechnik GmbH, Alzenau, Deutschland) bestimmt. Die Kapillarblutproben wurden in sitzender Position durch Punktion der Fingerbeere mit einer Lanzette gewonnen.

Nach den Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion (Richtlinien 00) werden Spendewilligen mit Hämoglobin-Konzentration  $\geq 8,4$  mmol/l ( $\geq 13,5$  g/dl) (Männer) und  $\geq 7,8$  mmol/l ( $\geq 12,5$  g/dl) (Frauen) zur Spende zugelassen.

#### 3.5.2 Bestimmung von Ferritin und löslichem Transferrin-Rezeptor im Serum

Venöse Blutproben ohne Zusatz von Antikoagulantien wurden im Anschluß an die Vollblutspende entnommen. Die Blutentnahme erfolgte aus der Cubitalvene. Im Fall einer Rückstellung von der Spende wurde eine zusätzliche Venenpunktion durchgeführt. Binnen 2 Stunden nach der Blutentnahme wurden die Proben abzentrifugiert und das Serum innerhalb von 24 h bei  $-30^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Die Konzentration von Ferritin (in  $\mu\text{g/l}$ ) und löslichem Transferrin-Rezeptor (in  $\text{mg/l}$ ) im Serum wurde immun-nephelometrisch in einem BN Prospec Automatic Analyzer (Dade Behring, Marburg, Deutschland) gemessen.

Die Ferritinbestimmung ist nicht standardisiert. Es gibt jedoch eine Referenzpräparation der WHO, mit der die Hersteller der Tests ihre Kalibration abgleichen können. Die in unserer Studie verwendeten Ferritin-Assays waren unter Bezug auf die internationale Referenz-

Präparation WHO 80/578 kalibriert. Eine Serumferritin-Konzentration unter 12 µg/l wurde als Zeichen einer kompletten Speichereisendepletion definiert.

Für die Konzentration des löslichen Transferrin-Rezeptors gibt es keine standardisierten Normbereiche und im Gegensatz zu Ferritin, keine Referenzpräparation. Nach Angaben der Firma Dade Behring wurde bei einer Untersuchung der Proben von 456 gesunden Erwachsenen aus Zentraleuropa mit der N Latex sTfR Reagenz ein Referenzbereich von 0,76 bis 1,76 (2,5-97,5 Perzentile) ermittelt.

Zur Abschätzung des Gesamtkörpereisenbestandes wurde der  $\log(\text{TfR}/\text{F})$  (Logarithmus des Quotienten aus Konzentration von löslichem Transferrin-Rezeptor und Ferritin-Konzentration,

$\text{Log}\left(\frac{\text{TfR}(\mu\text{g}/\text{l})}{\text{Ferritin}(\mu\text{g}/\text{l})}\right)$  berechnet (Cook 2003, Skikne 90).

Aufgrund der fehlenden Standardisierung der Transferrin-Rezeptor-Assays und des  $\log(\text{TfR}/\text{F})$  wurden die Änderungen des sTfR und des  $\log(\text{TfR}/\text{F})$  d.h. die Differenzen zum Vorwert in der Auswertung berücksichtigt. Zielgröße war die Veränderung des  $\log(\text{TfR}/\text{F})$  als Maß für das Speichereisen. Wegen der umgekehrten Korrelation zwischen  $\log(\text{TfR}/\text{F})$  und Speichereisen bedeutet eine Zunahme des  $\log(\text{TfR}/\text{F})$  eine Abnahme des Speichereisens.

### **3.6 Compliance**

Die Compliance wurde durch Befragung und durch Zählen der zurückgebrachten Kapseln geprüft. Sie wurde als gut eingestuft, wenn mehr als 90% der Kapseln eingenommen wurden.

### **3.7 Statistik**

Die Fallzahlberechnung, die Randomisierung und die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Stata for Windows (Stata Corp., College Station, Texas, USA). Der Randomisationsplan wurde mit Hilfe einer Blockrandomisierung mit variabler Blocklänge erstellt.

Bezogen auf die Ferritin-Konzentration als Zielgröße wurde die Fallzahl unter Annahme einer Teststärke von 0,9, einem Signifikanzniveau von 0,0167 (Bonferroni-Adjustierung für drei Gruppen), einer kleinsten bedeutsamen Ferritin-Differenz zwischen den Gruppen von 10 µg/l, drei (Männer) bzw. zwei (Frauen) Nachfolgeuntersuchungen, einem intraindividuellen Korrelationskoeffizienten von 0,8 und einer Standardabweichung der Ferritin-Konzentration von 26 µg/l (Männer) bzw. 22 µg/l (Frauen) berechnet. Unter Annahme einer Dropout-Rate von 50% ergab sich eine Fallzahl von 98 Männern bzw. 80 Frauen pro Behandlungsgruppe.

Die statistische Auswertung erfolgte als „intent-to-treat“-Analyse für alle Studienteilnehmer, die sich zu mindestens einem Nachfolgetermin vorgestellt hatten, mit Hilfe eines linearen Regressionsmodells für longitudinale Daten (cross-sectional time-series regression model with generalized estimating equation analysis (Twisk 2003)). Zielgröße war die Veränderung (Differenz zum Vorwert) des  $\log(TfR/F)$  als Maß für das Speichereisen. Unabhängige Variable (Prädiktor) in dem statistischen Modell war die Art der Studienmedikation (dummy-kodiert).