

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

DISSERTATION

Untersuchungen zur Erythropoietin-Konzentration im Urin
Frühgeborener nach Applikation von rekombinantem Erythropoietin

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Juliane Langer

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. C. Dame
 2. Prof. Dr. R.-D. Stenger
 3. Prof. Dr. H. Fahnenstich

Datum der Promotion: 07.09.2012

Geduld ist das Schwerste und das Einzige,
was zu lernen sich lohnt.

Alle Natur, alles Wachstum, aller Friede,
alles Gedeihen und Schöne in der Welt beruht auf Geduld,
braucht Zeit, braucht Stille, braucht Vertrauen.

(Hermann Hesse)

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG.....	3
1.1 Frühgeborenenanämie.....	3
1.2 Erythropoietin (Epo).....	4
1.3 Regulation der Epo-Synthese.....	6
1.4 Rekombinantes Erythropoietin (rEpo).....	8
1.4.1 rEpo in der Prävention und Therapie der Frühgeborenenanämie	9
1.4.2 Einsatz von rEpo als neuroprotektives Medikament.....	12
1.5 Pharmakokinetik von rEpo.....	19
1.6 Zielsetzung.....	25
2 METHODEN UND PATIENTEN.....	26
2.1 Untersuchung der Epo-Konzentration im Urin.....	26
2.1.1 Detektion von rEpo nach Asservierung mit watte- und zellstoffbasiertem Trägermaterial vs Plastikbeutel.....	26
2.1.1.1 Salivette®	27
2.1.1.2 Absorption von rEpo durch Watterollen.....	28
2.1.1.3 Absorption von rEpo durch Slipelinlagen	28
2.1.2 ELISA.....	29
2.1.3 Statistische Datenauswertung	30
2.2 Klinische Studie zur Epo-Konzentration im Urin nach i.v.- vs s.c.-Applikation von Epoetin-β zur Behandlung bzw. Prävention der Frühgeborenenanämie	30
2.2.1 Studienprotokoll.....	30
2.3 Studie zur renalen Epo-Ausscheidung unter rEpo-Therapie zur Neuroprotektion bei sehr unreifen Frühgeborenen.....	32
2.3.1 Studienprotokoll.....	32
2.3.2 Urinsammlung.....	34
3 ERGEBNISSE	35

3.1	Prüfung der Auffang-Materialien für die Analyse der rEpo-Konzentrationen im Urin.....	35
3.1.1	Watterollen.....	35
3.1.2	Slipereinlagen.....	35
3.2	Untersuchung der Epo-Konzentration im Urin nach i.v.- vs s.c.-Applikation von Epoetin- β zur Behandlung bzw. Prävention der Frühgeborenenanämie	36
3.2.1	Untersuchung der Epo-Konzentration im Urin unter Berücksichtigung des Gestationsalters	37
3.2.2	Berechnung des Verhältnisses von Epo im Urin zur applizierten rEpo-Menge	40
3.3	Untersuchung der Epo-Konzentration im Urin nach hochdosierter rEpo-Therapie zur Neuroprotektion bei Frühgeborenen.....	41
3.3.1	Epo-Konzentration im Urin nach hochdosierter i.v.-Applikation von rEpo	41
3.3.2	Epo-Konzentration im Urin in Relation zur Menge des applizierten rEpo	44
3.3.3	Vergleich der Epo-Konzentrationen im Urin nach hoch- bzw. niedrigdosiertem rEpo.....	45
4	DISKUSSION	46
4.1	Methode der Urinsammlung	46
4.2	Epo im Urin nach Applikation von 250 U rEpo/kg zur Behandlung der Frühgeborenenanämie.....	46
4.3	Epo im Urin nach Applikation von 3 x 3.000 U rEpo/kg zur Neuroprotektion bei sehr unreifen Frühgeborenen.....	51
4.4	Ausblick	55
5	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	58
6	TABELLENVERZEICHNIS	59
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	60
8	REFERENZEN	62
	VERÖFFENTLICHUNGEN	71
	DANKSAGUNG	72
	LEBENS LAUF	74
	ERKLÄRUNG.....	75

Zusammenfassung

Seit Jahrzehnten findet rekombinantes Erythropoietin (rEpo) Einsatz in der Erwachsenenmedizin. Hierbei wird es vorrangig zur Behandlung der renalen Anämie, aber auch in der Behandlung tumorassoziierter Anämien und seit kurzem im Rahmen von klinischen Studien als neuroprotektives Medikament bei Patienten mit Schlaganfall verwendet. Bei Frühgeborenen ist rEpo zur Behandlung der Frühgeborenenanämie zugelassen. Während die Bedeutung von niedrigdosiertem rEpo in der Prävention und Therapie der Frühgeborenenanämie aufgrund mangelnder Effektivität bei der Vermeidung von Bluttransfusionen in den letzten Jahren vermehrt hinterfragt wird, gibt es eine Anzahl neuer klinischer Studien zum Einsatz von hochdosiertem rEpo zur Neuroprotektion bei reifgeborenen Kindern mit Asphyxie und bei Frühgeborenen. Studien zur Pharmakologie von rEpo bei Frühgeborenen sind rar. Über die Ausscheidung von rEpo über die Niere, insbesondere nach hochdosierter Applikation von rEpo bei Frühgeborenen, herrscht bisher noch Unklarheit. Sowohl für eine adäquate Dosisfindung von hochdosiertem rEpo zur Neuroprotektion als auch bei der Suche nach der Ursache für die mangelnde Effektivität von rEpo in der Prävention bzw. Therapie der Frühgeborenenanämie könnten Aufschlüsse über die rEpo-Ausscheidung im Urin von Bedeutung sein. Daher untersuchten wir in zwei Projekten die Erythropoietin (Epo)-Ausscheidung im Urin Frühgeborener. Im ersten Teilprojekt wurde im Rahmen der Routinebehandlung mit rEpo zur Prävention bzw. Therapie der Frühgeborenenanämie Urin (159 Proben) von 20 Frühgeborenen vor sowie 4 und 8 Stunden nach intravenöser (i.v.) oder subkutaner (s.c.) Applikation von 250 U rEpo/kg (3 x wöchentlich) longitudinal gesammelt und mittels ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) die Epo-Konzentration im Urin bestimmt. Es zeigten sich signifikant höhere rEpo-Konzentrationen im Urin nach 4 und 8 Stunden als vor rEpo-Applikation. Im Vergleich zur s.c.-Applikation fand sich nach i.v.-Applikation sowohl nach 4 als auch nach 8 Stunden eine signifikant höhere rEpo-Konzentration im Urin.

Die Epo-Konzentrationen im Urin Frühgeborener mit einem Gestationsalter < 31 Schwangerschaftswochen (SSW) waren nach i.v.-Applikation von rEpo signifikant höher als im Urin Frühgeborener mit einem Gestationsalter $\geq 31+0$ SSW. Der prozentuale Anteil der Epo-Ausscheidung innerhalb der ersten 8 Stunden nach rEpo-Gabe betrug im Median nach erster i.v.-Applikation 0,4 % (Range 0 – 2,8 %) der verabreichten rEpo-Menge. Nach s.c.-Applikation betrug er 0,36 % (Range 0 – 0,74 %). Unseren Ergebnissen nach erscheint die s.c.-Therapie mit

konstant niedrigeren Epo-Konzentrationen im Urin zur Prävention bzw. Behandlung der Frühgeborenenanämie physiologischer als die i.v.-Therapie.

Im zweiten Teilprojekt wurden im Rahmen einer randomisierten, kontrollierten, doppelblinden Studie zur Neuroprotektion bei 75 Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von 25+6 bis 31+6 SSW jeweils 2 Urinproben nach Applikation von 3 x 3.000 U rEpo/kg bzw. NaCl 0,9 % als Plazebo (Applikationen 1 – 3 h, 12 – 18 h und 36 – 42 h nach Geburt) asserviert, um die Epo-Konzentration im Urin mittels ELISA zu bestimmen. Die Epo-Konzentration in den Urinproben der Frühgeborenen aus der rEpo-Gruppe war signifikant höher als in der Plazebo-Gruppe. Frühgeborene mit einem Gestationsalter < 29 SSW wiesen signifikant höhere Epo-Konzentrationen im Urin auf als Kinder mit einem Gestationsalter \geq 29+0 SSW. Die prozentualen Verluste nach der ersten i.v.-Applikation beliefen sich bei Kindern unter 29 SSW im Median auf 2,8 % (Range 0,1 – 23 %) und bei Kindern mit einem Gestationsalter \geq 29 SSW auf 1,2 % (Range 0,3 – 9,4 %). Es ergab sich kein Unterschied zwischen den Epo-Konzentrationen im Urin nach der ersten, zweiten und dritten rEpo-Applikation sowie zwischen der Epo-Konzentration im ersten und zweiten Urin nach der jeweiligen Gabe. In beiden Teilprojekten zeigten sich mit dem Gestationsalter abnehmende Epo-Konzentrationen im Urin. Die Epo-Konzentrationen im Urin nach i.v.-Applikation von 3.000 U rEpo/kg zur Neuroprotektion waren erheblich höher als nach i.v.-Applikation von 250 U rEpo/kg zur Anämiebehandlung. Die medianen prozentualen Verluste sind jedoch in beiden Fällen als gering anzusehen.

1 Einleitung

Rekombinantes humanes Erythropoietin wird in der Neonatologie zur Prävention und Behandlung der Frühgeborenenanämie eingesetzt. Während diese Anwendung wegen ihrer begrenzten Effektivität bei der Vermeidung von Bluttransfusionen und im Hinblick auf mögliche Nebenwirkungen in den letzten Jahren intensiv und zum Teil kontrovers diskutiert wurde, erfahren die nicht-hämatopoietischen, insbesondere die neuroprotektiven Eigenschaften des rEpo auch in der Neonatologie immer mehr Aufmerksamkeit.

1.1 Frühgeborenenanämie

Zum Zeitpunkt der Geburt weisen Neugeborene aufgrund des geringen intrauterinen Sauerstoffpartialdrucks (pO_2) im fetalen Blut hohe Hämoglobinkonzentrationen auf, die nach der Geburt abfallen. Es findet eine relativ ausgeprägte Hämolyse statt. Bei den sich nachbildenden Erythrozyten wechselt im Verlauf der Entwicklung die Expression von fetalem zu adultem Hämoglobin (Hb) (Stockman 1978). Nach der Geburt bedingen der hohe Hb-Wert und der gleichzeitige Anstieg der Sauerstoffsättigung einen Abfall der Erythropoietin (Epo)-Produktion und damit eine verminderte Bildung von Erythrozyten (Halvorsen 1968). Die Hämoglobinkonzentration fällt bei reifen Neugeborenen von durchschnittlich 19,5 g/dl nach der Geburt bis auf einen Tiefpunkt von 11,5 g/dl im Alter von etwa zehn Wochen ab (Muntau 2007). Durch eine Rechtsverschiebung der Sauerstoff-Dissoziationskurve und die damit erleichterte Abgabe von Sauerstoff an das Gewebe wird der Abfall des Hämoglobins kompensiert und im Normalfall symptomlos toleriert (Dallman 1981). Diese Erscheinung wird als Trimenonreduktion bezeichnet und als physiologisch verstanden (Strauss 1986). Bei Frühgeborenen fällt die Trimenonreduktion besonders schwer aus und führt zu einer ausgeprägten Anämie. Es ist wegen der resultierenden klinischen Symptome (z.B. Tachypnoe, Tachykardie) umstritten, ob sie noch als physiologisch bezeichnet werden kann. Besonders sehr unreife Frühgeborene haben im Vergleich zu reifen Neugeborenen nicht nur niedrigere Ausgangshämoglobinwerte, bei ihnen verläuft auch der postnatale Hämoglobinabfall in kürzerer Zeit. Dabei besteht eine Korrelation zum Geburtsgewicht. So zeigen Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht zwischen 1.000 und 1.500 g einen Hb-Abfall von 16 g/dl auf bis zu 8 g/dl, Kinder unter 1.000 g Geburtsgewicht können einen Hb-Wert von 7 g/dl erreichen (Dallman

1981, Stockman 1986). Die Symptome sind vielfältig. So können die Kinder durch Tachykardie und Tachypnoe, aber auch durch vermehrte Apnoen und Bradykardien auffallen. Zusätzlich zeigen sich teils eine fehlende Gewichtszunahme, eine verminderte Aktivität sowie eine erhöhte Sauerstoffzufuhr. Ca. 50 % der ELBW (*Extremely Low Birth Weight*, Geburtsgewicht < 1.000 g) Frühgeborenen müssen deshalb während der ersten Lebenswochen mit Erythrozytenkonzentrat transfundiert werden und ca. 85 % von ihnen haben am Ende ihres Krankenhausaufenthalts mindestens eine Transfusion erhalten (Ohls 2009). Die Gründe hierfür sind vielfältig. Ein oft unterschätzter Faktor, insbesondere für eine frühzeitige Anämie innerhalb der ersten 7 Lebenstage („*early anemia*“), sind häufige Blutentnahmen zu diagnostischen Zwecken (Obladen 1995). In Abhängigkeit vom Geburtsgewicht sowie vom Schweregrad der Erkrankung variiert der durchschnittliche Blutverlust als Folge von diagnostischen Blutabnahmen zwischen 7 und 51 ml/kg bezogen auf den Zeitraum von vier Wochen (Maier 2000, Lin 2000, Nexo 1981, Obladen 1988, Strauss 1990). Das entspricht bei Kindern mit einem sehr geringen Geburtsgewicht von weniger als 1.500 g (VLBW, *Very Low Birth Weight*), bei denen 1 ml Blut mehr als 1 % ihres gesamten Blutvolumens (ca. 70 ml/kg) ausmachen kann, zwischen 5 und 45 % des errechneten Blutvolumens (Nexo 1981). Ein Grund für die späte Frühgeborenenanämie (nach dem 8. Lebenstag; „*late anemia*“) sind u.a. die spärlich vorhandenen und rasch erschöpften Eisenspeicher (Finch 1982). Eisen ist jedoch für die Erythropoese zwingend notwendig. Ein weiterer Grund für die Trimenonreduktion und die Schwere der Frühgeborenenanämie ist eine supprimierte bzw. bei Frühgeborenen eine inadäquate körpereigene Epo-Synthese (Stockmann 1978, Dallmann 1981).

1.2 Erythropoietin (Epo)

Epo ist der primäre humorale Regulator der Bildung roter Blutkörperchen. Es handelt sich um ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 30,4 kDa. Es besteht zu 60 % aus Protein und zu 40 % aus Kohlenhydraten, die in Form von vier Kohlenhydratseitenketten an die Aminosäuren gekoppelt sind. Nicht-glykosylierte Epo-Moleküle sind *in vivo* biologisch inaktiv (Jelkmann 2004). Epo ist sowohl auto- und endokrin als auch parakrin wirksam (Brines 2006). Die primäre Produktionsstätte des Epo ist beim Fetus die Leber. Noch vor der Geburt beginnt ein Wechsel der Epo-Produktion von der Leber zur Niere. Der Zeitpunkt des Beginns dieses Wechsels ist speziesspezifisch. Beim Schaf beispielsweise beginnt die Umstellung der Epo-Synthese von der Leber zur Niere im letzten Trimenon und ist etwa 60 Tage nach der Geburt

abgeschlossen. Zu diesem Zeitpunkt finden sich etwa 85 % der Epo-Produktion in der Niere und 15 % in der Leber (Zanjani 1980, 1981). Aus einem Rattenmodell ist bekannt, dass zum Zeitpunkt der Geburt noch ca. 95 % der Epo-Produktion in der Leber erfolgten. Erst etwa 3 – 4 Wochen nach der Geburt findet der Wechsel der Epo-Produktion von der Leber zur Niere statt. Am 54. Tag nach der Geburt wird in der Niere ca. 12-fach mehr Epo produziert als in der Leber (Eckardt 1992). Im späten Säuglingsalter finden bei der Ratte etwa 10 % der Epo-Produktion in der Leber und 90 % in der Niere statt (Tan 1991). Beim Menschen hingegen beginnt etwa ab der 20. Schwangerschaftswoche der Wechsel der Epo-Produktion zur Niere. Zum Zeitpunkt der Geburt hat die Niere bei Reifgeborenen die Epo-Produktion zu ca. 20 % übernommen (Dame 1998). Es wird angenommen, dass dieser Wechsel der Epo-Synthesstätte ein wichtiger Faktor für die Trimenonreduktion ist, der sich bei Frühgeborenen aufgrund der noch unreifen Niere verstärkt auswirkt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass bei Neugeborenen auch die Induktion der Epo-Produktion unter Hypoxie bzw. bei niedrigem pO_2 , dem Hauptstimulus für die Epo-Synthese, inadäquat ist (Brown 1983). In der Niere ist die Epo-Produktion nach gegenwärtigem Verständnis in fibroblastenähnlichen peritubulären Zellen lokalisiert (Maxwell 1997). Neuere Untersuchungen an transgenen Mausmutanten weisen darauf hin, dass diese peritubulären interstitiellen Zellen eine neuronähnliche Morphologie aufweisen und neuronale Marker exprimieren (Obara 2008). Des Weiteren wird das Epo-Gen in Astrozyten, Neuronen und Mikrogliazellen (Genc 2004, Masuda 1994), in Zellen von Lunge und Milz (Tan 1991), Kupfferschen Sternzellen (Eckhart 1994), in Makrophagen des Knochenmarks (Jelkmann 1992), Trophoblastzellen der Plazenta (Fairchild Benyo 1999), in Zellen des Eileiters, des Ovars sowie in Sertoli-Zellen des Hodens exprimiert (Chong 2002).

1.3 Regulation der Epo-Synthese

Der stärkste Stimulus für die Epo-Produktion ist ein sinkender pO_2 in den Epo-exprimierenden Organen (Fandrey 2004) (Abb. 1).

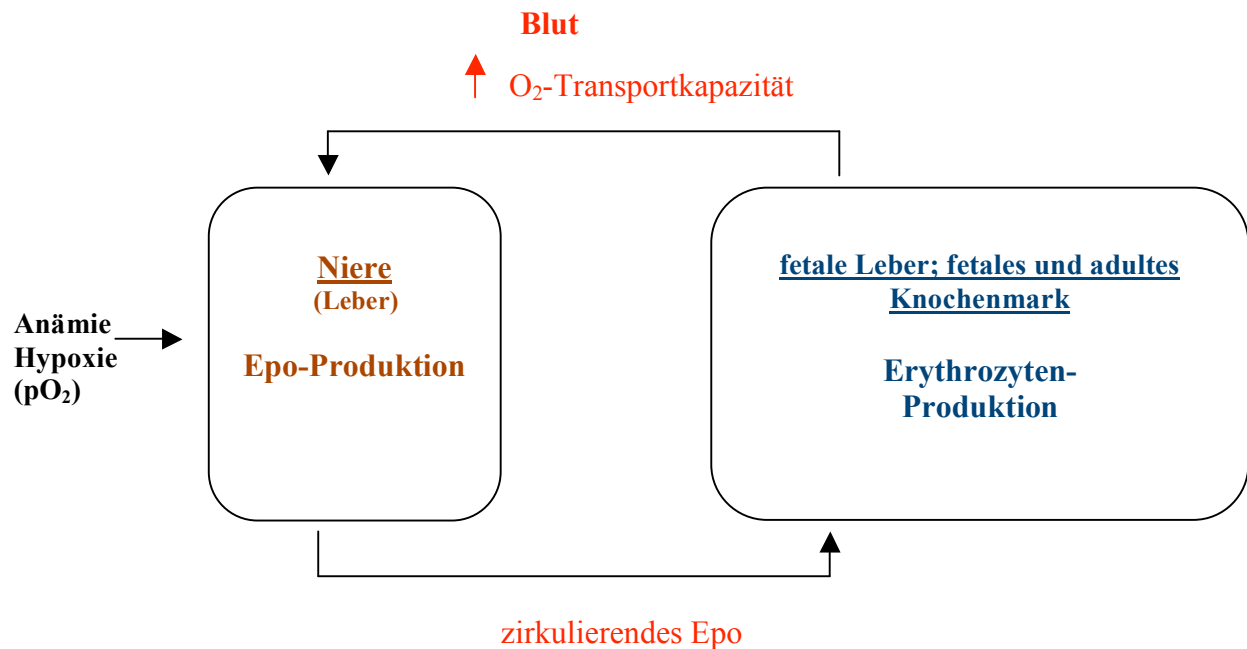


Abb. 1: Regelkreis der Erythropoese (modifiziert nach Ebert und Bunn 1999)

Unter Hypoxie kommt es zur Bildung eines aktiven hypoxieinduzierten Faktor (HIF)-Proteinkomplexes, der an den 3'-Enhancer des *Epo*-Gens bindet (Wang 1993). Ist der Proteinkomplex aktiv, wird die Genexpression rasch gesteigert und Epo *de novo* synthetisiert. Im Knochenmark (bzw. beim Fetus in der Leber) bindet Epo an die Epo-Rezeptoren (EpoR) auf erythrozytären Vorläuferzellen. Epo ist für die Proliferation und Differenzierung dieser Vorläuferzellen, der BFU-E (*Erythroid Burst Forming Unit*) und CFU-E (*Erythroid Colony Forming Unit*), essentiell. Diese werden durch Epo vor der Apoptose geschützt (Koury 1992).

Bei dem EpoR handelt es sich um einen extrazellulären, membrangebundenen Rezeptor. Er gehört zur Familie der Typ-1-Zytokinrezeptoren. Durch Bindung von Epo verbinden sich je zwei EpoR zu einem Dimer (Homodimerisierung), und es wird eine Reihe von intrazellulären Signaltransduktionskaskaden aktiviert, darunter die Tyrosin-Phosphorylierung von verschiedenen mit dem EpoR assoziierten Proteinen (z.B. Janus-Kinase 2, JAK-2). An die phosphorylierten Tyrosinreste des EpoR können unterschiedliche intrazelluläre Proteine, u.a. STAT-5 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 5*) binden, um von JAK-2

phosphoryliert zu werden und weitere Signaltransduktionswege in Gang zu setzen (Lacombe 1998). Es wird angenommen, dass die Epo/EpoR-Komplexe nach der Bindung von Epo internalisiert und degradiert werden (Jelkmann 2002).

Der EpoR wurde zunächst nur auf erythrozytären Vorläuferzellen lokalisiert (Landschulz 1989). Inzwischen wurde der EpoR auf diversen anderen Zelltypen identifiziert (Tab. 1).

Tab. 1: Gewebe, in dem der EpoR nachgewiesen wurde, unter Angabe der jeweiligen Nachweismethode und der Spezies (Mensch/Ratte/Maus). PCR = Polymerasekettenreaktion, IHC = Immunhistochemie, WB = Western Blot

	PCR	IHC	WB	Iod-markiertes rEpo	Ratte/Maus	Mensch
Erythrozytäre Vorläuferzellen (Landschulz 1989; Fraser 1988)				X	X	X
Endothelzellen (Anagnostou 1994)	X					X
Peri- und Epikardzellen (Wu 1999)		X			X	
Renale Mesangium- und Epithelzellen (Westenfelder 1999)	X		X			X
Langerhans'sche Inseln (Pankreas) (Fenjves 2003)	X	X	X		X	X
Leydig-Zellen (Minoi 1992)				X	X	
Trophoblastzellen (Plazenta) (Sawyer 1989)				X	X	X
Neuronen, Astrozyten, Mikroglia (Li 1996)	X	X			X	X
Kardiomyozyten (Wright 2004)	X	X			X	
Tubuluszellen (Westenfelder 1999)	X				X	X
Ovar (Yasuda 2001)	X					

Die Expression des *EpoR* in nicht-hämatopoietischen Geweben ist in den letzten Jahren vermehrt untersucht worden, da sie für die zellprotektiven Effekte von Epo und die Entwicklung bestimmter Organsysteme (insbesondere Herz und Gehirn) essentiell ist. Transgene Maus-Mutanten mit homozygoter *EpoR*-Deletion (*EpoR*^{-/-}) sterben bereits intrauterin mit einem Gestationsalter von 13,5 Tagen aufgrund des Ausbleibens der Erythropoese (Wu 1999). Des Weiteren fand sich eine abnorme Herz- und Gehirnentwicklung mit ausgedehnter neuronaler Apoptose (Yu 2001). Bei konditionalen *EpoR* Knock-out-Mutanten mit einer Deletion des *EpoR*

in radialen Gliazellen des sich entwickelnden Cortex, Rauten- und Kleinhirns kam es zu einer signifikant verminderten Zellproliferation in der subventrikulären Zone des adulten Gehirns. Im adulten Gehirn dieser Mausmutanten fand sich nach einem Infarkt eine verminderte Neurogenese (Tsai 2006). Dem gegenüber stehen die Daten von Suzuki *et al.*, die eine transgene Maus entwickelten, bei welcher der *EpoR* ausschließlich auf hämatopoietischen Geweben exprimiert wird. Diese Mäuse entwickelten sich normal und zeigten keine neurologischen Auffälligkeiten (Suzuki 2002).

1.4 Rekombinantes Erythropoietin (rEpo)

Seit 1985 ist es möglich, Epo rekombinant herzustellen (Jacobs 1985, Lin 1985). Heute wird rEpo überwiegend aus gentechnisch veränderten Ovarzellen des chinesischen Streifenhamsters gewonnen (Epoetin- α und - β) (Egrie 1986). Die Herstellung durch homologe Rekombination in humanen Fibrosarkomzellen ist neu und wird bisher nur bei einer bestimmten Art des rekombinanten Epo (Epoetin- δ) angewandt (Jelkmann 2009). Epoetin- α und - β unterscheiden sich nur unwesentlich in Molekülmasse und Sialylierungsgrad. Die Halbwertszeiten liegen nach i.v.-Applikation bei 7 bzw. 9 Stunden. Mittlerweile sind unterschiedlich modifizierte rEpo-Varianten erhältlich, die sich durch komplexere Glykosylierungsmuster und damit längere Halbwertszeiten vom endogenen Molekül unterscheiden. So wurde beispielsweise mit Darbepoetin- α (Molekulargewicht 37,1 kDa) ein Epo-Derivat entwickelt, bei dem das Verhältnis von Kohlenhydraten (51 %) zu Aminosäuren (49 %) durch vermehrte Glykosylierungen erhöht ist. Hierdurch besitzt es eine ca. 3-fach längere Plasmahalbwertszeit (MacDougall 2007). Eine noch längere Wirkungsdauer wurde durch Verknüpfung des Epo-Moleküls mit Polyethylenglykol (PEGylierung) erreicht. Das Epo-Derivat CERA (*Continuous Erythropoiesis Receptor Activator*) hat mit 66 kDa ein annähernd doppelt so hohes Molekulargewicht wie natives Epo und eine Plasmahalbwertszeit von ca. 135 h (ca. 15-mal länger als rEpo). CERA bindet nur sehr kurz an den EpoR, aktiviert ihn dabei, wird jedoch nicht internalisiert, sondern löst sich schnell wieder von dem EpoR (Bunn 2006). Auch Epoetin- δ hat eine Halbwertszeit von mehr als 130 h. Die Rezeptorbindungsaffinität von Epoetin- δ ist zwar deutlich niedriger als die von Epoetin- β , doch die Assoziationsgeschwindigkeit an den Rezeptor ist langsamer. Durch den langsamen Verbrauch werden an den Epo-Rezeptoren der Zielzellen höhere Konzentrationen erreicht (Smith 2007, Jelkmann 2009). Es wirkt dadurch erheblich potenter. Inzwischen existieren auch vollständig synthetisch hergestellte Epo-Präparate. Hierzu gehört z.B. das SEP

(*Synthetic Erythropoiesis Protein*), welches eine 2,5-mal längere Plasmahalbwertszeit als endogenes Epo aufweist (Bunn 2006).

Zunächst fand rEpo Einsatz in der Therapie der Anämie bei chronischer Niereninsuffizienz im Erwachsenen- und Kindesalter (Eschbach 1987, Winearls 1986). Es wird bis heute routinemäßig zur Behandlung der Anämie chronisch hämo- oder peritonealdialysierter Patienten sowie niereninsuffizienter Patienten im Prädialysestadium eingesetzt, erlangt jedoch immer mehr Bedeutung für andere Indikationen (z.B. Stimulation der Erythropoese im Rahmen der Eigenblutspende).

1.4.1 rEpo in der Prävention und Therapie der Frühgeborenenanämie

Da eine inadäquat niedrige körpereigene Epo-Synthese eine der primären pathophysiologischen Ursachen für die Frühgeborenenanämie ist (Stockmann 1978, Dallmann 1981), hat man Anfang der 1990er Jahre erstmals Frühgeborene mit rEpo behandelt. Hauptziel ist die Reduktion der Transfusionsmenge sowie der Transfusionshäufigkeit und damit auch der Spenderexposition. Mit abnehmender Zahl der Transfusionen sinken das Risiko für die Transmission von Infektionen (u.a. HIV, HCV), für Inkompatibilitätsreaktionen, für Störungen des Säure-Basen-Haushalts sowie die Kosten (Aher 2006).

Zur Prävention bzw. Therapie der Frühgeborenenanämie sind jedoch deutlich höhere rEpo-Konzentrationen/kg Körpergewicht als bei Erwachsenen mit renaler Anämie notwendig. Frühgeborene eliminieren das Medikament schneller und haben ein relativ größeres Verteilungsvolumen im Körper als Erwachsene (Ohls 2000). So werden in der Therapie der renalen Anämie Dosierungen zwischen 175 und 350 U/kg/Woche eingesetzt, wobei in klinischen Studien zur Therapie der Frühgeborenenanämie Dosierungen zwischen 70 (Obladen 1991) und 2.100 (Haiden 2005) U/kg/Woche untersucht wurden. Bei Frühgeborenen ist umstritten, ob rEpo i.v. oder s.c. appliziert werden sollte. Häufig wird es i.v. appliziert, solange ein i.v.-Zugang vorhanden ist, anschließend wird auf die s.c.-Applikation umgestellt. Auch der Zeitpunkt des Beginns der Therapie variiert. Es wird der frühzeitige Beginn der rEpo-Therapie innerhalb der ersten 7 Lebenstage (LT) vom späten Therapiebeginn nach 8 bis 28 Lebenstagen unterschieden. Lange Zeit bestand ein gewisser Konsens für die frühzeitige Applikation von 3-mal 250 U/kg/Woche i.v. bzw. s.c. (abhängig von einem venösen Zugang) bei Kindern mit einem Geburtsgewicht < 1.500 g (Obladen 2006). Im Allgemeinen wird die rEpo-Therapie bis zum Erreichen eines Alters von 37+0 SSW fortgeführt. Da die Verfügbarkeit von Eisen insbesondere

bei Frühgeborenen mit unzureichenden Eisenspeichern unter rEpo-Therapie sinkt, wird zur Vorbeugung eines Eisenmangels, abhängig von der Transferrinsättigung, Eisen substituiert (Finch 1982, Shannon 1995).

In den letzten 10 Jahren wurde die Therapie der Frühgeborenenanämie mit rEpo bezüglich ihrer Wirksamkeit und eventueller Nebenwirkungen kritisch diskutiert. 2006 erschienen 3 Metaanalysen (Cochrane Database), die diesen Sachverhalt genauer überprüften. Eine der Metaanalysen schließt sämtliche Studien mit einem frühzeitigen Beginn der rEpo-Therapie ein (Beginn < 7. LT; „*early* rEpo“) (Ohlsson 2006). Die zweite Metaanalyse beinhaltet die Studien, in denen die rEpo-Therapie später angefangen wurde (Beginn 8. – 28. LT; „*late* rEpo“) (Aher 2006). In einer dritten Metaanalyse werden die frühe und die späte rEpo-Therapie verglichen („*early vs late* rEpo“) (Aher 2006) (Tab. 2). In allen 3 Analysen wurden die Studien unabhängig von der Applikationsweise des Medikaments, also mit i.v.-, s.c.- oder auch mit i.v.-Applikation und späterer Umstellung auf s.c.-Applikation, eingeschlossen. Maßstab für die Effektivität von rEpo war 1.) die Reduktion des totalen Transfusionsvolumens pro Kind, 2.) die Verminderung der Anzahl an Transfusionen pro Kind und 3.) die Verminderung der Anzahl an Spenderexpositionen pro Kind. Alle 3 Analysen werteten die Studien bezüglich spezieller Nebenwirkungen (z.B. Retinopathie der Frühgeborenen (ROP), Nekrotisierende Enterokolitis (NEC), Bronchopulmonale Dysplasie (BPD), Intraventrikuläre Hämorrhagie (IVH), Periventrikuläre Leukomalazie (PVL)) aus (Tab. 2). Sowohl bei früh als auch bei spät begonnener rEpo-Behandlung fand sich eine signifikante Verminderung des Transfusionsvolumens und der Anzahl an Transfusionen. In beiden Fällen maßen die Autoren den Ergebnissen jedoch nur eingeschränkte klinische Relevanz bei, da durchschnittlich nur eine Verminderung um weniger als eine Transfusion pro Kind erreicht wurde. Zusätzlich hatte ein Großteil der Kinder bereits vor Therapiebeginn mit rEpo Transfusionen erhalten, was die Aussagekraft dieser Studien einschränkt (Aher 2006). In der Analyse zur frühen rEpo-Gabe berichten 6 Studien über die Inzidenz der ROP. Bei rEpo-behandelten Kindern wurde ein signifikant höheres Risiko festgestellt, an einer ROP \geq Stadium 3 zu erkranken. Auch in der vergleichenden Analyse „*early vs late* rEpo“ erkrankten bei frühzeitiger rEpo-Gabe signifikant mehr Kinder an einer ROP (Stadium 1 – 3) als in der Kontrollgruppe (Aher 2006) (Tab. 2).

Tab. 2: Zusammenstellung wesentlicher Ergebnisse der 3 Cochrane-Analysen bezüglich Sicherheit und Effektivität von rEpo (Aher 2006, Ohlsson 2006) KI = Konfidenzintervall; RR = relatives Risiko

	<i>early</i> rEpo (< 7. Lebenstag)	<i>late</i> rEpo (8. - 28. Lebenstag)	<i>early vs late</i> rEpo
Anzahl der Studien Anzahl der Kinder	23 2.074	28 1.302	2 262
Effektivität: Reduktion des Transfusionsvolumens/Kind	<i>signifikant</i> (-6 ml/kg; 95% KI -1/ -11)	<i>signifikant</i> (-7ml/kg; 95% KI -12/ -3)	nicht signifikant
Reduktion der Transfusionen/Kind	<i>signifikant</i> (-0,27 Transfusionen; 95% KI -0,1/ -0,42)	<i>signifikant</i> (-0,8 Transfusionen 95% KI -0,97/ -0,6)	<u>early:</u> nicht signifikant <u>late:</u> nicht signifikant
Reduktion der Spenderexpositionen	<i>signifikant</i> (-0,63 Spender; 95% KI -1,07/ -0,19)	nicht signifikant	nicht signifikant
Sicherheit: ROP (jedes Stadium)	nicht signifikant	nicht signifikant	<u>early:</u> <i>signifikant</i> (RR 1,40; 95% KI 1,05/ 1,86) <u>late:</u> nicht signifikant
ROP (\geq Stadium 3)	<i>signifikant</i> (RR 1,71; 95% KI 1,15/ 2,54)	nicht signifikant	nicht signifikant
andere unerwünschte Wirkung	keine	keine	keine

Aufgrund der unzureichenden Effektivität und der Gefahr der ROP wird die Therapie der Frühgeborenenanämie mit rEpo von den Autoren der Cochrane-Metaanalysen nicht empfohlen. Gründe für die mangelnde Effektivität des Medikaments sind bisher nicht erwiesen. Viele pharmakokinetische Daten zu rEpo stammen aus Studien mit Erwachsenen. So ist nach jahrelanger Diskussion bisher nicht geklärt, ob i.v. oder s.c. appliziertes rEpo in der Therapie der Frühgeborenenanämie wirksamer ist. Es ist unklar, ob eine unzureichende Dosis, die Art der Applikation oder eine eventuell erhöhte renale Epo-Ausscheidung bei Frühgeborenen, deren

Nierenfunktion noch nicht vollständig entwickelt ist, Grund für die unzureichende Effektivität des Medikaments sein könnten.

1.4.2 Einsatz von rEpo als neuroprotektives Medikament

Seit einigen Jahren rücken die nicht-hämatopoietischen Wirkungen von rEpo immer mehr in den Fokus der Forschung und der (prä-) klinischen Anwendung von rEpo. Einer der nicht-hämatopoietischen Aspekte des rEpo ist die mögliche Anwendung als neuroprotektive Substanz. Eine hypoxisch-ischämische Schädigung des zentralen Nervensystems (ZNS), wie bei der Asphyxie, ist eine der häufigsten Ursachen für die Mortalität bei reifen Neugeborenen, für Störungen der neuronalen Verschaltung und Integrität und für Störungen der psychomotorischen Entwicklung sowie lebenslange Behinderung. Eine Asphyxie tritt bei ca. 4/1.000 Reifgeborenen auf (Vanucci 1997). Folgen sind Lernbehinderungen, Epilepsien, geistige Behinderung oder die infantile Zerebralparese. Bisher gibt es nur begrenzte Therapiemöglichkeiten. Erste kontrollierte Multicenter-Studien zeigen bei reifen Neugeborenen nach 18 Monaten signifikant verminderte neurologische Behinderungen nach Behandlung der Asphyxie mittels Hypothermie (Gluckman 2005, Shankaran 2005). Bei Frühgeborenen kann es im Rahmen von pre- sowie postnatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschädigungen zur Ausbildung einer PVL kommen. Pathologisch-anatomisch handelt es sich hierbei um nekrotische Läsionen der periventrikulären weißen Substanz, die im Verlauf zu schweren neurologischen Störungen bis hin zur Entwicklung einer Zerebralparese führen kann (Volpe 2009). Eine Evidenz-basierte Therapie für Frühgeborene mit hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung existiert bisher nicht, da die therapeutische Hypothermie nur bei reifen Neugeborenen anwendbar ist. Eine neue Therapiemöglichkeit für Frühgeborene stellt die Behandlung mit rEpo dar. Sowohl in Tiermodellen als auch in ersten klinischen Studien beim Erwachsenen wurden neuroprotektive Eigenschaften beschrieben.

Epo wird im ZNS synthetisiert. Anhand von immunhistochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Epo in frühen Entwicklungsstadien (5 bis 6 Wochen *post conceptionem* (p.c.)) in der periventrikulären Keimzone des Gehirns exprimiert wird (Juul 1999). Später (ca. 20 Wochen p.c.) findet sich die *Epo*-Genexpression insbesondere in Gebieten des Thalamus, des Hippocampus, des Corpus geniculatum laterale, des Kortex und des Rückenmarks (Juul 1999). Auch mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Technik konnte *Epom*RNA (*messenger*-Ribonukleinsäure) in verschiedenen Arealen des sich entwickelnden menschlichen Gehirns nachgewiesen werden. Hierbei fand sich die *Epo*-Genexpression vor allem in Rückenmark,

Kleinhirn, Hypophyse, Basalganglien, Thalamus, Hippocampus, Corpora geniculata, Corpora amygdala und Kortex (Dame 2000, 2001). Im Erwachsenenalter wird *Epo*mRNA besonders im Temporallappen, den Corpora amygdala und im Hippocampus exprimiert (Marti 1996). Bei Erwachsenen mit einer schweren traumatischen Verletzung des Gehirns fand sich in allen Liquor-Proben Epo-Protein. Marti *et al.* beschrieben, dass die Epo-Konzentration im Liquor mit dem Grad der Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke, gemessen an dem Liquor/Serum-Albumin-Quotienten, korrelierte. Da es im Liquor zu einem Anstieg der Epo-Konzentration kam, während dieser im Serum ausblieb, ist davon auszugehen, dass es sich um im Gehirn synthetisiertes Epo handelt (Marti 1997).

Ebenso wie im Knochenmark wirkt Epo auch im Gehirn über die Bindung an den EpoR. Dieser wird in verschiedenen Arealen des humanen embryonalen ZNS exprimiert (Li 1996). Bei Mäusen ist die EpoR-Expression im embryonalen Gehirn (Tag 13 der intrauterinen Entwicklung) 10-mal höher als im Gehirn adulter Mäuse. Sie sinkt jedoch nach der Geburt signifikant ab (Knabe 2004, Wallach 2009). Zum aktuellen Zeitpunkt scheinen verlässliche Daten zur Lokalisation des *EpoR* im ZNS nur die Untersuchungen mit PCR-Technologie im perfundierten Gewebe zu liefern. Immunhistochemische Analysen zur EpoR-Expression (Juul 1998, 1999) (Tab. 1) sind kritisch zu bewerten, da sich die verwendeten EpoR Antikörper als unspezifisch herausstellten. Sie färbten auch Gewebe von *EpoR*^{-/-} Embryonen an (Elliott 2006).

Liu *et al.* konnten sowohl im embryonalen (Liu 1994) als auch im adulten (Liu 1997) Gehirn der Maus *EpoR*mRNA nachweisen. Auch Digicaylioglu *et al.* und Marti *et al.* konnten *EpoR*mRNA im adulten Gehirn von Mäusen, besonders in der weißen Substanz, detektieren (Digicaylioglu 1995, Marti 1996). Wallach *et al.* konnten *EpoR*mRNA in neuronalen Stammzellen bei der Maus sowie in primären Neuronen, Astrozyten und Mikroglia der Ratte nachweisen (Wallach 2009).

Die Effekte von Epo im ZNS sind vielfältig und überwiegend aus Tiermodellen bekannt. Epo reduziert die Glutamat-induzierte Toxizität (Morishita 1997), induziert anti-apoptotische und supprimiert pro-apoptotische Faktoren (Wei 2006). Des Weiteren zeigt es anti-inflammatorische (Sun 2005) und direkte antioxidative Wirkungen (Kumral 2004). Die Bedeutung von Epo für die normale neuronale Entwicklung wurde in unterschiedlichen Modellen analysiert, wobei ein Teil der Ergebnisse widersprüchlich ist. Wu *et al.* zeigten an transgenen Mäusen, dass sich die zelluläre Proliferationsrate im Gehirn von *EpoR*^{+/+}- und *EpoR*^{-/-}-mutierten Embryonen nicht unterscheiden. *EpoR*^{-/-}-, aber auch *Epo*^{-/-}-Mausmutanten starben jedoch an Tag 13 aufgrund einer unzureichenden Erythropoese (Wu 1999). Suzuki *et al.* entwickelten eine transgene Mausmutante, bei welcher der *EpoR* ausschließlich auf hämatopoietischen Zellen exprimiert

wird. Diese Mausmutanten entwickelten sich normal und zeigten keine neurologischen Auffälligkeiten, woraus geschlossen wurde, dass die nicht-hämatopoietische *EpoR*-Expression für die neuronale Entwicklung entbehrlich ist (Suzuki 2002). Im Kontrast dazu sind die Daten von Yu *et al.* und Tsai *et al.* zu sehen. Yu *et al.* stellten bei *EpoR*^{-/-}-Embryonen eine gestörte Herz- und Gehirnentwicklung mit ausgedehnter neuronaler Apoptose fest (Yu 2001). Tsai *et al.* entwickelten eine konditionale *Knock-out*-Maus-Mutante, bei der eine Deletion des *EpoR* in radialen Gliazellen des sich entwickelnden Cortex, Rauten- und Kleinhirns zu einer signifikant verminderten Zellproliferation in der subventrikulären Zone des adulten Gehirns führte. Des Weiteren fand sich im adulten Gehirn dieser Mausmutante nach einem Infarkt eine verringerte Neurogenese (Tsai 2006). Aus Tiermodellen ist bekannt, dass sowohl die *Epo*-Genexpression als auch die *EpoRmRNA*-Expression unter Hypoxie hochreguliert werden (Digicaylioglu 1995, Marti 1996, Spandou 2004). Bei Früh- und Reifgeborenen, die einen hypoxischen Hirnschaden erlitten hatten, wurden erhöhte Epo-Konzentrationen im Liquor gemessen. Kinder mit Asphyxie hatten sowohl erhöhte Epo-Konzentrationen im Serum als auch im Liquor. Frühgeborene, bei denen eine intraventrikuläre Hämorrhagie diagnostiziert wurde, hatten erhöhte Epo-Konzentrationen im Liquor, jedoch nicht im Serum. Im Gegensatz dazu hatten Kinder mit Meningitis normale Epo-Konzentrationen im Liquor und Serum (Juul 1999).

Tiermodelle zeigen, dass die transkriptionelle Stimulation der *Epo*-Genexpression unter Hypoxie im ZNS im Vergleich zur Niere verzögert einsetzt. Während die maximale *EpomRNA*-Konzentration in der Niere unter Hypoxie bereits nach ca. 2 Stunden erreicht wird, ist dies im ZNS erst nach 4 Stunden der Fall. In der Niere fällt die Menge der *EpomRNA* nach 2 Stunden rapide ab und erreicht nach 8 Stunden nur noch ca. ein Drittel des Spitzenwertes. Im ZNS dagegen bleibt die maximale *EpomRNA*-Expression bis zur 8. Stunde konstant (Chikuma 2000). Man postuliert, dass frühzeitig appliziertes rEpo, z.B. bei Patienten mit akutem hypoxisch-ischämischen Insult, die verzögert einsetzende endogene Epo-Produktion kompensieren kann (Dame 2005, Statler 2007, McPherson 2007). An diesem Punkt soll rEpo als Neuroprotektivum eingreifen. Zahlreiche Tiermodelle zeigen die Wirkung von rEpo am sich entwickelnden Gehirn (Tab. 3). In einer tierexperimentellen Studie von zentraler Bedeutung wurde adulten Mäusen die A. cerebri media okkludiert. Erhielten die Tiere 24 Stunden vor bzw. bis zu 3 Stunden nach der Okklusion intraperitoneal (i.p.) 5.000 U rEpo/kg, konnte eine signifikante Reduktion des Infarkt volumens nachgewiesen werden. Das war jedoch nicht der Fall, wenn das rEpo später als 3 Stunden nach dem Infarkt verabreicht wurde (Brines 2000). Studien belegen auch am sich entwickelnden Gehirn einen neuroprotektiven Effekt durch rEpo. Kumral *et al.* konnten bei

neonatalen Ratten ein signifikant verringertes Infarktvolumen nach hypoxisch-ischämischer Schädigung und direkt anschließender einmaliger Applikation von 1.000 U rEpo/kg i.p. zeigen (Kumral 2003). In einer weiteren Studie konnten sie nachweisen, dass langanhaltende funktionelle Defizite nach einem hypoxisch-ischämischen Insult bei neonatalen Ratten durch sofortige Verabreichung von 1.000 U rEpo/kg (i.p.) vermindert werden können (Kumral 2004). Inzwischen zeigt eine Vielzahl von Studien die Effizienz unterschiedlicher Behandlungsstrategien für eine Neuroprotektion durch rEpo im Modell der hypoxisch-ischämischen Schädigung des neonatalen Gehirns von Maus und Ratte (Tab. 3). Bis auf eine Studie von Weber *et al.* (Weber 2005) konnten alle anderen Studien den neuroprotektiven Effekt von rEpo bestätigen.

Tab. 3: Tierexperimentelle Studien zur Neuroprotektion durch rEpo im sich entwickelnden Gehirn nach Hypoxie/Ischämie (p = postnataler Tag)

Modell	Spezies (Alter)	Methode	Effekt durch rEpo	Referenz
Hypoxie/ Ischämie	Ratte (p7)	rEpo s.c. (1-, 3- oder 7-mal 2.500, 5.000 oder 30.000 U/kg/d) direkt nach dem Insult	reduziertes Infarktvolumen nach 48 h und 1 Woche; am effektivsten neuroprotektiv 3 x 5.000 U/kg; bei 7 x 5.000 und 3 x 30.000 U/kg keine Wirkung	Kellert <i>et al.</i> 2007
Hypoxie und Hypoxie/ Ischämie	Ratte (p1)	rEpo s.c. 2.500 oder 5.000 U/kg/d) täglich von Tag 1 - Tag 5	Verminderung Dopamin-Verlust, verbessertes neurologisches Auskommen	McPherson <i>et al.</i> 2007
Ischämie	Maus (6 – 8 Wochen)	rEpo i.p. (5.000 U/kg) 24 h vor, 0 h, 3 h oder 6 h nach dem Insult	Reduktion des Infarktvolumens bei Gabe von rEpo 24 h vor bis 3 h nach dem Insult	Brines <i>et al.</i> 2000
Hypoxie/ Ischämie	Ratte (p7)	rEpo i.p. (1.000 U/kg) beim Insult	Reduktion des Infarktvolumens	Kumral <i>et al.</i> 2003
Hypoxie/ Ischämie	Ratte (p7)	rEpo i.p. (1.000 U/kg) beim Insult	besseres räumliches Erinnerungsvermögen nach 22 d	Kumral <i>et al.</i> 2004
Hypoxie/ Ischämie	Ratte (p7)	rEpo s.c. (2.500 U/kg) täglich für 3 d nach Insult	verbessertes funktionelles Auskommen nach 4 Wochen, Schutz dopaminerger Neurone vor Apoptose	Demers <i>et al.</i> 2005
Ischämie	Ratte (p7)	rEpo i.p. (10.000 U/kg) 1 h vor Insult, anschließend tägliche rEpo-Gabe für 21 d	Reduktion des Infarktvolumens	Wei <i>et al.</i> 2006
Hypoxie/ Ischämie	Ratte (p7)	rEpo i.p. (2.500 U/kg) 24 h nach dem Insult und an Tag 2 und 3 nach Insult	vermindertes Infarktvolumen und geringere Leukozyteninfiltration	Sun <i>et al.</i> 2005
Hypoxie/ Ischämie	Ratte (p7)	einmalig rEpo (2.000 U/kg) direkt nach Insult	Reduktion des Infarktvolumens, Verbesserung des funktionellen Auskommens nach 42 d	Spandou <i>et al.</i> 2005
Ischämie	Ratte (p10)	rEpo i.p. (5.000 U/kg) direkt nach Reperfusion	vermindertes Infarktvolumen, verbessertes funktionelles Auskommen nach 21 d	Chang <i>et al.</i> 2005
Hypoxie/ Ischämie	Ratte (p7)	rEpo i.v. (20 U) nach Insult	Reduktion des Infarktvolumens	Aydin <i>et al.</i> 2003
Ischämie	ausgewachsene Mäuse	100 U rEpo intranasal, 5.000 U/kg i.v., 5.000 U/kg i.p. oder 5.000 U/kg s.c. jeweils + 1.000 ng IGF-1 nach Insult	reduziertes Infarktvolumen nach 24 h und besseres neurologisches Auskommen nach 90 d	Fletcher <i>et al.</i> 2009
Hypoxie	Ratte (p6 – p8)	rEpo i.p. (20.000 U/kg) mit Beginn der Hypoxie (2 x 8 h)	signifikante Zunahme der Rate abgestorbener Neurone	Weber <i>et al.</i> 2005

Die bisherigen Studien zur Neuroprotektion durch rEpo beim Erwachsenen zeigen überwiegend vielversprechende Ergebnisse (Tab. 4).

Tab. 4: Klinische Studien zur neuroprotektiven Wirkung von rEpo bei neurologischen Erkrankungen des Erwachsenen

Einsatz rEpo bei	Methode	Effekt durch rEpo	Referenz
Schlaganfall A. cerebri med.	rEpo i.v. (3 x 33.000 U in 48 h) binnen 8 h nach Symptombeginn	besseres funktionelles Auskommen und geringere Infarktgröße nach 30 d	Ehrenreich <i>et al.</i> 2002
Schizophrenie	rEpo i.v. (40.000 U wöchentlich für 3 Monate)	Verbesserung kognitiver Leistungen; S100B-Spiegel (Marker für Zerstörung von Gliazellen) im Serum niedriger	Ehrenreich <i>et al.</i> 2007
Multiple Sklerose (MS) und Morbus Parkinson	rEpo i.v. (48.000 U oder 8.000 U) 12 Wochen 1x/Woche und 12 Wochen 2x/Woche	48.000 U: verbesserte kognitive und motorische Fähigkeiten bei MS-Patienten, Patienten mit Parkinson profitierten nicht; niedrige Dosis hat keinen Effekt	Ehrenreich <i>et al.</i> 2008
Schlaganfall	rEpo i.v. (40.000 U) teils mit rt-PA zusammen	<u>nur rEpo</u> : verminderte Infarktgröße (rEpo kein besserer Effekt als rt-PA allein) <u>rEpo+rt-PA</u> : erhöhte Mortalität, kein verbessertes neurologisches Auskommen, keine Reduktion der Infarktgröße	Ehrenreich <i>et al.</i> 2009
Subarachnoidalblutung	rEpo i.v. (3 x 30.000 U binnen 72 h nach Symptombeginn, dann alle 48 h)	verminderte Inzidenz schwerer Vasospasmen, weniger neurologische Defizite und verbessertes neurologisches Auskommen bei Entlassung	Tseng <i>et al.</i> 2009

Eine weitere Patientengruppe, welche von einer neuroprotektiven Wirkung des rEpo profitieren könnte, sind Frühgeborene. Sie haben ein signifikant höheres Risiko als Reifgeborene Behinderungen durch eine Hypoxie/PVL zu erleiden, aus der eine verzögerte oder gestörte psychomotorische und kognitive Entwicklung resultiert (Vanucci 1997, Bucher 2002, Winter 2002, Meadow 2004). Frühgeborene haben insbesondere in den ersten 5 Tagen nach der Geburt ein stark erhöhtes Risiko, eine intraventrikuläre Hämorrhagie (IVH) zu erleiden. Auch hieraus resultiert ein deutliches Risiko für neurologische Spätschäden (Vohr 1996). Bei Früh- und Neugeborenen beschreiben einzelne, teils nicht primär auf den neuroprotektiven Effekt von rEpo ausgelegte Studien die Wirkung von rEpo auf das sich entwickelnde Gehirn (Tab. 5).

Tab. 5: Klinische Untersuchungen zur Wirkung von rEpo auf das sich entwickelnde Gehirn des Früh- oder Neugeborenen

Indikation zur rEpo-Behandlung	Patientenkollektiv	Studiendesign	Effekt durch rEpo	Referenz
Frühgeborenenanämie	ELBW	rEpo i.v. oder s.c. (400 U/kg 3 x/Woche bis 34+6 SSW)	nach 18–22 Monaten höhere <i>Mental Index Scores</i> bei Kindern mit rEpo-Konzentrationen im Serum > 500 mU/ml 1–8 h nach rEpo-Applikation	Bierer <i>et al.</i> 2006
Neuroprotektion	ELBW; < 28+6 SSW	rEpo i.v. (3 x 500, 3 x 1.000 oder 3 x 2.500 U/kg in 24h-Intervallen bis zum 3. Lebenstag)	keine Nebenwirkungen, Langzeitergebnisse stehen noch aus	Juul <i>et al.</i> 2008
Neuroprotektion	Frühgeborene (24+0 bis 31+6 SSW)	rEpo i.v. (3 x 3.000 U/kg binnen 42 h nach Geburt)	keine Nebenwirkungen, Langzeitauskommen noch unklar	Fauchère <i>et al.</i> 2008
Frühgeborenenanämie	VLBW; < 30 SSW	rEpo i.v./s.c. (250 oder 400 U/kg 3x/Woche)	höhere <i>Mental Developmental Index Scores</i> nach 12 Monaten	Brown <i>et al.</i> 2009
Frühgeborenenanämie	ELBW	rEpo i.v. oder s.c. (Kumulativedosis 8.574 U/kg (Range 1.750 – 21.500 U/kg) über durchschnittlich 68 d (15 – 121 d))	nach 10 – 13 Jahren deutlich bessere Entwicklung und besseres neurologisches Auskommen bei Kindern mit IVH	Neubauer <i>et al.</i> 2010
hypoxisch-ischämische Enzephalopathie (HIE)	reife Neugeborene	rEpo erste Gabe (300 oder 500 U/kg) s.c., dann i.v. alle 2 Tage für 2 Wochen; Beginn < 48 h	verbessertes neurologisches Auskommen nach 18 Monaten bei Kindern mit moderater HIE, nicht bei Kindern mit schwerer HIE	Zhu <i>et al.</i> 2009
HIE	reife Neugeborene	rEpo s.c. (2.500 U/kg täglich für 5 d nach der Geburt)	besseres neurologisches Auskommen und bessere Entwicklung nach 6 Monaten, geringere Rehospitalisierungsrate in den ersten 6 Lebensmonaten	Elmahdy <i>et al.</i> 2010

Die beiden ersten klinischen Studien zur Neuroprotektion bei Frühgeborenen fokussierten auf die Sicherheit des Medikaments, über die neuroprotektive Wirkung ist noch keine Aussage gegeben (Juul 2008, Fauchère 2008). Juul *et al.* applizierten 30 Frühgeborenen im Abstand von jeweils 24 Stunden insgesamt 3 Gaben rEpo in einer Dosierung von 500, 1.000 oder 2.500 U/kg

(je n = 10). Dosierungen von 1.000 und 2.500 U/kg erzielten Epo-Plasma-Konzentrationen von über 6.000 mU/ml, die in Tiermodellen neuroprotektiv wirksam waren (Juul 2008, Statler 2007). Fauchère *et al.* verabreichten 3 x 3.000 U/kg rEpo innerhalb von 1 – 3, 12 – 18 und 36 – 42 Stunden nach der Geburt an 30 Frühgeborene mit einem Gestationsalter von 24+0 SSW bis 31+6 SSW (Fauchère 2008). In beiden Studien wird die hochdosierte Anwendung von rEpo zur Neuroprotektion bei Frühgeborenen als sicher angesehen.

1.5 Pharmakokinetik von rEpo

Die Informationen zur Pharmakokinetik von rEpo stammen überwiegend aus Studien an Erwachsenen. Rekombinantes Epo ist in verschiedenen Formen erhältlich: Epoetin- α , - β , - γ , - δ , - ϵ , - ζ , - θ , - χ und - ω . Vorrangige Verwendung, insbesondere in der Neonatologie, finden bislang Epoetin- α und - β . Rekombinantes Epo kann s.c., i.v. oder i.p. verabreicht werden.

Die i.p.-Applikation spielt beim Menschen nur in der Therapie von Patienten mit Peritonealdialyse eine Rolle, findet jedoch in Tierexperimenten eine breite Anwendung (Tab. 3). Aus Studien von Patienten mit Hämodialyse ist bekannt, dass die Bioverfügbarkeit von rEpo nach intravenöser Applikation annähernd 100 % beträgt und die maximale Epo-Konzentration im Plasma bereits nach etwa 5 Minuten erreicht wird (Markham 1995, Shimosaka 1994, Kampf 1989). Nach i.v.-Applikation von 100 U rEpo/kg liegt die maximale Plasmakonzentration beim Erwachsenen bei etwa 1.200 mU/ml (Kampf 1989) (Abb. 2). Bei subkutaner Applikation wird die höchste Plasmakonzentration nach ca. 12 Stunden erreicht und beträgt nur etwa ein Zehntel der Maximalkonzentration nach i.v.-Applikation (Abb. 2). Die Bioverfügbarkeit nach s.c.-Applikation beträgt etwa 22 – 32% der Bioverfügbarkeit nach i.v.-Gabe (Markham 1995, Shimosaka 1994, Kampf 1989). Das errechnete Verteilungsvolumen ist bei subkutaner Gabe ca. sechsfach kleiner als bei intravenöser Applikation (Markham 1995).

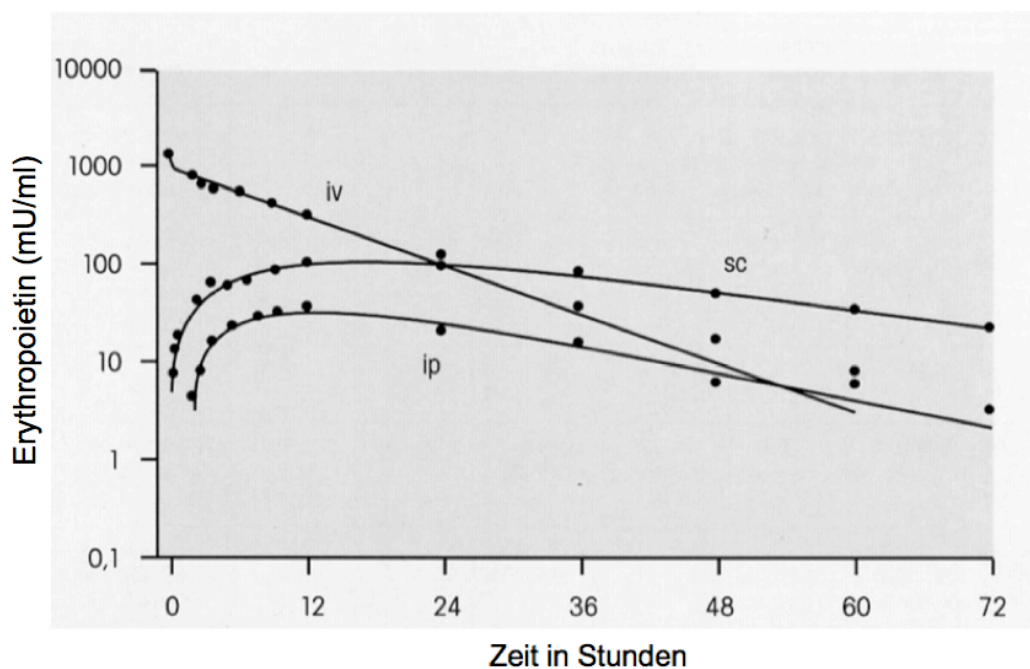


Abb. 2: Durchschnittliche Epo-Plasmakonzentration bei Erwachsenen nach intravenöser (iv), subkutaner (sc) und intraperitonealer (ip) Applikation von 100 U rEpo/kg (adaptiert nach Kampf 1989)

Während der Epo-Spiegel im Plasma nach i.v.-Applikation rasch abfällt (Halbwertszeit ca. 8 Stunden) und innerhalb von 60 Stunden auf ein Minimum (< 10 U/l) absinkt, bleibt die Epo-Konzentration im Plasma nach s.c.-Applikation (Halbwertszeit ca. 28 Stunden) über annähernd 24 Stunden konstant und sinkt auch anschließend nur langsam (Egrie 1986; Kampf 1989) (Abb.2). Der Verlauf der Epo-Konzentration im Plasma nach i.p.-Applikation von rEpo verhält sich ähnlich wie nach s.c.-Applikation (Kampf 1989, Juul 2004) (Abb. 2).

Die Plasma-Konzentration nach i.v.-Applikation von rEpo erreicht demnach schnell hohe Spitzenwerte, die jedoch rasch wieder absinken. Moderat erhöhte, aber über längere Zeit eher konstante rEpo-Konzentrationen im Plasma könnten bei einer Pharmakotherapie einen günstigeren Effekt der rEpo-Behandlung bedingen.

Bei Frühgeborenen wird die Pharmakokinetik des rEpo grundsätzlich als ähnlich der des Erwachsenen angesehen. Brown *et al.* verglichen die Pharmakokinetik von rEpo nach einmaliger s.c.- und i.v.-Applikation von 200 U/kg bei Frühgeborenen. Die maximale Plasmakonzentration wird nach i.v.-Gabe innerhalb von ca. 5 Minuten und bei s.c.-Gabe im Durchschnitt nach 6,4 Stunden erreicht. Dabei wird nach s.c.-Gabe ca. 1/5 (durchschnittlich 137 mU/ml) des Spitzenspiegels nach i.v.-Gabe (durchschnittlich 711 mU/ml) erreicht. Die Halbwertszeiten von rEpo nach i.v.- und s.c.-Applikation variieren allerdings kaum (8,1 Stunden und 7,1 Stunden) (Brown 1993). Auch Krishnan *et al.* beobachteten nach s.c.-Applikation von 300 U/kg eine

Halbwertszeit von im Median 7,9 Stunden (Krishnan 1996). Im Rahmen ihrer Studie zur Neuroprotektion bei Frühgeborenen verglichen Juul *et al.* die Epo-Konzentrationen im Plasma nach unterschiedlich hoher rEpo-Dosierung (500, 1.000 und 2.500 U/kg) (Abb. 3). Mit ansteigender Dosierung stieg die mittlere Verweildauer ($p < 0,02$), während die Clearance sank ($p < 0,05$). Ein Trend ließ sich bezüglich einer Zunahme der Halbwertszeit und einer Abnahme des Verteilungsvolumens unter höheren Dosierungen verzeichnen (Juul 2008). Reduzieren sich bei hohen Dosierungen das Verteilungsvolumen und die Clearance, so steigt die Wahrscheinlichkeit für eine Akkumulation des Medikaments.

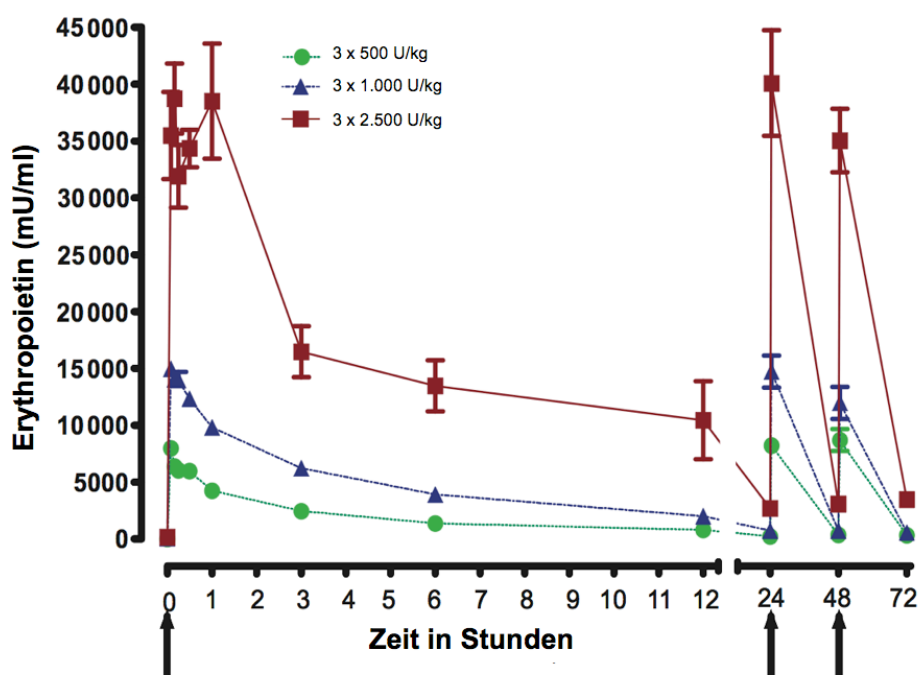


Abb. 3: Epo-Konzentrationen im Plasma nach i.v.-Applikation (Pfeile) von 500, 1.000 und 2.500 U rEpo/kg (adaptiert nach Juul 2008)

Aufgrund des hohen Molekulargewichts von rEpo (30,4 kDa) ist der Transport über die Blut-Hirn-Schranke eine zentrale Frage für die Dosis- und Therapiestrategie bei der Anwendung von rEpo zur Neuroprotektion. Bisher wurde diskutiert, ob, in welcher Menge und mit welchem Transportmechanismus rEpo die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann. Brines *et al.* konnten an adulten Mäusen biotinyliertes rEpo (5.000 U/kg) nach intraperitonealer Applikation in Hirnschnitten nachweisen. Das biotinylierte rEpo fand sich entlang der Kapillaren der Blut-Hirn-Schranke. Im Hirngewebe, das 17 Stunden nach Applikation des biotinylierten rEpo entnommen wurde, konnte das Biotin nicht mehr entlang der Kapillaren, sondern vereinzelt auf Neuronen nachgewiesen werden. Wurde den Versuchstieren gleichzeitig zu dem biotinylierten rEpo auch

nicht-markiertes rEpo in 100-facher Dosierung verabreicht, zeigte sich eine deutlich reduzierte bzw. keine Detektion des Biotins in den Gehirnschnitten der Mäuse. Dies spricht für einen sättigbaren Transportmechanismus, mit dem das biotinylierte rEpo über die intakte Bluthirnschranke transportiert wird. Da das biotinylierte rEpo nur entlang der Kapillaren und nicht entlang größerer Gefäße gefunden wurde, gehen Brines *et al.* von einem spezifischen, rezeptorgebundenen Transportmechanismus aus (Brines 2000).

Juul *et al.* injizierten fetalen Schafen intrauterin rEpo in einer Dosierung von 5.000 U/kg i.v. und analysierten innerhalb der nächsten 210 Minuten die Epo-Konzentration und den Albumin-Spiegel im Serum sowie im Liquor. Dabei fielen stets proportionale rEpo- und Albumin-Quotienten im Liquor/Serum auf. Schlussfolgernd gehen Juul *et al.* von einem passiven Transport des rEpo über die Blut-Hirn-Schranke aus (Juul 2004). Juul *et al.* zeigten weiterhin, dass die Blut-Hirn-Schranke für 0,3 bis 1,7 % der maximalen Epo-Konzentration im Serum durchlässig ist (Juul 2004). Vermutlich steigt mit dem Grad der Funktionsstörung der Blut-Hirn-Schranke (z.B. infolge von Hypoxie/Trauma) die Durchlässigkeit für rEpo (Marti 1997).

Neuroprotektive Effekte wurden *in vitro* bei Epo-Konzentrationen im Liquor von 5 – 5.000 mU/ml beobachtet (Juul 1998, Morishita 1997, Koshimura 1999). In Studien an neonatalen Ratten mit hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung und in einem weiteren Tiermodell mit cerebraler Entzündung und Ischämie waren hohe Dosierungen von rEpo (5.000 U/kg i.v.) nötig, um neuroprotektive Effekte zu erreichen (Brines 2000, Wang 2004). Andere Studien zeigten einen neuroprotektiven Effekt schon bei deutlich niedrigeren Dosierungen (Zhu 2009, Neubauer 2010). Bei reifgeborenen Kindern mit einer hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie beobachteten Zhu *et al.* nach 18 Monaten ein signifikant besseres neurologisches Auskommen in jener Gruppe, die mit einer hämatopoietisch wirksamen rEpo-Dosierung behandelt wurde, als in der Placebo-Gruppe. Die Kinder erhielten über die ersten 14 Lebenstage täglich 300 bzw. 500 U rEpo/kg. Die erste Dosis wurde i.v. verabreicht, alle weiteren erfolgten s.c. (Zhu 2009). Auch Neubauer *et al.* konnten mit kumulativen rEpo-Dosierungen von durchschnittlich etwa 8.500 U/kg über 68 Tage eine deutlich bessere Entwicklung und ein besseres neurologisches Auskommen nach 10 bis 13 Jahren bei ehemals rEpo-behandelten Frühgeborenen mit einer IVH erkennen als in der Kontrollgruppe. Bei Kindern ohne IVH ergaben sich keine Unterschiede (Neubauer 2010).

Eine aktuelle experimentelle Studie berichtet über die neuroprotektive Wirkung von intranasal appliziertem rEpo in Kombination mit dem Zytokin *Insulin-like Growth Factor-1* (IGF-1). IGF-1 hemmt ebenso wie rEpo die neuronale Apoptose. Zusammen appliziert werden stärkere

neuroprotektive Effekte verzeichnet als nach alleiniger Verabreichung eines der Medikamente (Digicaylioglu 2004, Fletcher 2009). 100 U mit radioaktivem Iod markiertes rEpo (I-rEpo) und 1.000 ng mit radioaktivem Iod markiertes IGF-1 (I-IGF-1) wurden adulten Mäusen nach Ligation der rechten A. cerebri media intranasal appliziert. Fletcher *et al.* konnten ein deutlich verringertes Infarktvolumen sowie signifikant bessere neurologische Fähigkeiten bei mit rEpo und IGF-1 behandelten im Vergleich zu unbehandelten Mäusen nachweisen. I-rEpo und I-IGF-1 akkumulierten innerhalb von 20 Minuten in den verletzten Arealen des Gehirns. An Kontrollmäusen konnten ca. 20 Minuten nach intranasaler Applikation maximal 20 U I-rEpo (gemessen in Lysaten des gesamten Gehirns und mit Hilfe des mittleren dpm (*desintegrations per minute*) berechnet) nachgewiesen werden. Bei Mäusen, deren Gehirne erst nach 120 Minuten oder später entnommen wurden, betrug die Epo-Konzentration im Lysat der Gehirne stets < 20 U. Nach Ligation und intranasaler I-rEpo-Applikation konnten maximal 33 U I-rEpo nach 120 Minuten in Lysaten der Gehirne gefunden werden (Fletcher 2009). Diese Ergebnisse sprechen für eine höhere Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke nach hypoxisch-ischämischer Schädigung als unter Kontrollbedingungen.

Aus einer Studie an Affen, Ratten und fetalen Schafen ist bezüglich der Pharmakokinetik bekannt, dass die Epo-Konzentrationen im Liquor innerhalb von 1 bis 2 Stunden nach i.v.-Applikation von hochdosiertem rEpo (5.000 U/kg) auf ca. 100 mU/ml ansteigen und Konzentrationen von bis zu 200 mU/ml nach 3 bis 4 Stunden erreicht werden (Juul 2004, Brines 2000). In den bisherigen klinischen Studien zur Neuroprotektion wurden überwiegend hohe Dosierungen verwendet. Ehrenreich *et al.* zeigten bei Erwachsenen, die aufgrund eines Schlaganfalls innerhalb von 180 Minuten mit hochdosiertem rEpo (33.000 U/d i.v. für 3 Tage, Tab. 4) behandelt wurden, dass die Epo-Konzentration im Liquor auf das 60- bis 100-fache anstieg (durchschnittlich 17,1 mU/ml) (Ehrenreich 2002). Auch Zhu *et al.* untersuchten die Epo-Konzentration im Liquor von reifen Neugeborenen mit einer hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie nach Applikation von 300 bzw. 500 U/kg und fanden, trotz geringer Dosierung, therapeutische Konzentrationen im Liquor wieder. So stieg die Epo-Konzentration im Liquor 3 Stunden nach s.c.-Applikation auf etwa das Doppelte an und erreichte einen Maximalwert von 23,7 mU/ml (Zhu 2009). Offensichtlich wird rEpo auch beim Menschen über die Blut-Hirn-Schranke transportiert und erreicht im Liquor eine Konzentration, die in experimentellen Versuchen neuroprotektiv ist (Brines 2000). Es könnte jedoch die Gefahr bestehen, dass zu hohe Dosierungen toxische Effekte haben. Weber *et al.* beobachteten, dass *in vitro* die Anzahl degenerierter neuronaler Zellen unter Hypoxie signifikant stieg, wenn sie zusätzlich mit rEpo (10 bzw. 40 U/ml) behandelt wurden (Weber 2005).

Über die Metabolisierung von endogenem und rekombinantem Epo herrscht Unklarheit. Der Großteil des in der Blutbahn befindlichen Epo wird über die Bindung an den EpoR der erythrozytären Progenitorzellen und die anschließende Internalisierung des Epo-EpoR-Komplexes entfernt. Ein weiterer Teil wird in der Niere gebunden und dort metabolisiert. Auch in der Leber wird Epo gebunden (Jelkmann 2002). In einer Studie mit 6 neugeborenen Lämmern, denen mit radioaktivem Iod markiertes rEpo appliziert wurde, zeigte sich jedoch, dass die Leber keinen nennenswerten Anteil an der Metabolisierung und der Ausscheidung hat (Widness 1992). Dies zeigt sich auch daran, dass die Geschwindigkeit der Epo-Elimination bei Patienten mit Leberzirrhose nicht verändert ist (Jensen 1995). Die endogene Epo-Ausscheidung im Urin beim gesunden Erwachsenen beträgt etwa 9 bis 23 mU/ml (Souillard 1996). Eine Studie an gesunden Erwachsenen, denen rEpo s.c. appliziert wurde, zeigt, dass die renale Clearance von rEpo bei Erwachsenen mit einem Anteil von < 3 % sehr gering ist (Neumayer 1989). Eine besondere Situation könnte bei Frühgeborenen vorliegen, da ihre Niere noch nicht ausgereift ist. Bühner *et al.* untersuchten 2003 die renale Epo-Ausscheidung bei einem frühgeborenen Zwillingsspaar. Einer der Zwillinge erhielt rEpo i.v., dem anderen Zwilling wurde rEpo s.c. appliziert (250 U/kg). Die Urine der Kinder wurden alle 4 Stunden über 24 Stunden gesammelt. Nach i.v.-Gabe fand sich im Urin innerhalb von 24 Stunden insgesamt eine absolute Epo-Menge von 12.480 mU. Nach s.c.-Applikation wurden innerhalb von 24 Stunden eine Epo-Menge von < 300 mU beobachtet. Obwohl der prozentuale Verlust mit 4 % (absolute Epo-Menge im Urin von 12,48 U bezogen auf die Ausgangsdosis von 300 U rEpo) gering war, konnte eine um ein Vielfaches höhere Epo-Ausscheidung nach i.v.-Applikation (maximal 4.800 mU/ml nach 4 Stunden) als nach s.c.-Applikation (immer < 10 mU/ml) festgestellt werden (Bühner 2003). Warwood *et al.* analysierten die renale Epo-Ausscheidung bei Frühgeborenen nach i.v.- und s.c.-Gabe von Darbepoietin- α . Nach Applikation von 4 μ g/kg Darbepoietin- α (entspricht etwa 1.600 U/kg rEpo) wurden mittels ELISA nur minimale Epo-Konzentrationen bzw. kein Epo im Urin detektiert. Dabei fand sich kein Unterschied nach i.v.- oder s.c.-Applikation (Warwood 2006).

Die Frage nach der renalen Epo-Ausscheidung bei Frühgeborenen in Abhängigkeit von der Nierenreife ist bis heute weitestgehend ungeklärt. Es kann nicht zwangsläufig von einer ähnlichen renalen rEpo-Clearance wie bei Erwachsenen ausgegangen werden. Für die Anpassung der Dosis auf das Frühgeborene und für die Wahl der Applikationsart (i.v. vs s.c.) bedarf es der genaueren Klärung der renalen Epo-Ausscheidung, mit dem Ziel, eine möglichst effektive Therapie der Frühgeborenenanämie oder einen neuroprotektiven Effekt mittels rEpo zu erreichen. Zu der renalen Ausscheidung nach Therapie mit hochdosiertem rEpo zur

Neuroprotektion gibt es bisher keine Informationen. Besonders aufgrund der möglichen Nebenwirkungen von rEpo hinsichtlich einer ROP bei Frühgeborenen und im Hinblick auf die Gefahr einer Toxizität von sehr hohen rEpo-Konzentrationen sollten Fragen, wie die nach der renalen rEpo-Ausscheidung und ihre Relevanz für eine effiziente, aber risikoarme rEpo-Therapie bei der Frühgeborenenanämie oder zur Neuroprotektion geklärt werden.

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, im Rahmen der klinischen Anwendung von rEpo bei Frühgeborenen das Ausmaß der Epo-Ausscheidung über die Niere zu beschreiben. Hierbei sollten die Epo-Konzentrationen im Urin der Kinder zu definierten Zeitpunkten nach rEpo-Gabe bestimmt werden.

Es sollte insbesondere ermittelt werden, ob die renale Epo-Ausscheidung von der Art der rEpo-Applikation (i.v. vs s.c.) abhängt. Unter standardisierter rEpo-Behandlung im Rahmen zweier unabhängiger Anwendungen wurden unterschiedlich hohe rEpo-Mengen verabreicht. In dem ersten Teilprojekt wurde rEpo (250 U/kg) zur Prävention und Behandlung der Frühgeborenenanämie nach einem Standardprotokoll eingesetzt. In dem zweiten Projekt wurde im Rahmen einer klinischen Studie hochdosiertes rEpo (3.000 U/kg) mit dem Ziel der Neuroprotektion bei Frühgeborenen appliziert. In beiden Anwendungen wurde rEpo unterschiedlich häufig und in unterschiedlich hoher Dosierung appliziert, sodass sich Aussagen zur Kinetik, zum Einfluss der Applikationsform sowie zur Relevanz der entwicklungsbiologischen Reife der Nieren ergeben sollten.

Die Fragestellung war, ob sich die Unreife der Niere des Frühgeborenen auf das Ausmaß der Epo-Ausscheidung im Urin auswirkt. Abschließend sollte abgeschätzt werden, ob das Ausmaß der renalen Epo-Verluste für eine effiziente Therapie mit rEpo relevant erscheint.

2 Methoden und Patienten

2.1 Untersuchung der Epo-Konzentration im Urin

Zu Beginn sollte eine geeignete Methode zur Sammlung des Urins bei Frühgeborenen gefunden werden, wobei mit Hinsicht auf die longitudinalen Untersuchungen der Epo-Konzentrationen eine Schonung der unreifen Haut der Frühgeborenen besondere Berücksichtigung fand.

2.1.1 Detektion von rEpo nach Asservierung mit watte- und zellstoffbasiertem Trägermaterial vs Plastikbeutel

Als Alternative zu den in der Routine zur Asservierung des Urins von Früh- und Neugeborenen verwendeten Klebebeuteln aus Polyethylen (PFM, Köln) (Abb. 4) sollten Materialien in Windeln platziert werden, um dort den Urin aufzunehmen und ihn durch Zentrifugation anschließend in einem Auffangbehälter (Salivette[®]; Sarstedt AG, Nümbrecht) zu sammeln. Vorab musste geklärt werden, ob Materialien, wie Watte oder Slipeinlagen, rEpo absorbieren und die Messwerte verfälschen könnten.



Abb. 4: Klebebeutel zum Auffangen von Urin bei Neugeborenen und Säuglingen (PFM, Köln)

2.1.1.1 Salivette®

Eine Salivette® besteht aus 2 ineinander gesteckten Plastikröhrchen und einer Watterolle aus Baumwollkämmlingen und Zellstoff (Abb. 5). Das innere Röhrchen, in dem die Watte steckt, hat an seinem Boden ein kleines Loch, durch welches abzentrifugierte Flüssigkeit in das äußere Röhrchen abfließen kann und dort aufgefangen wird. Das System kann mit einem Deckel verschlossen werden. Die Flüssigkeit kann nach der Zentrifugation aus dem äußeren Röhrchen pipettiert werden.



Abb. 5: Aufbau einer Salivette®

Es wurden 2 verschiedene Auffang-Materialien hinsichtlich ihrer Eigenschaft getestet, eine Trägerflüssigkeit mit rEpo aufzunehmen und die Substanz nach Zentrifugation wieder abzugeben.

Auffang-Materialien in der Salivette®: Watterolle (Sarstedt, Nümbrecht)

Slipeinlage (Ria®, Hartmann, Heidenheim).

Um herauszufinden, ob die Auffang-Materialien für die Fragestellung geeignet sind, wurde eine Testlösung mit rEpo hergestellt. Diese wurde auf die verschiedenen Materialien pipettiert und anschließend in der Salivette® zentrifugiert.

Rekombinantes Epo (Epoetin-alfa; NeoRecormon®, Roche, Grenzach-Wyhlen) mit einer Ausgangskonzentration von 500 U/ml wurde in PBS (*Phosphate Buffered Saline*) auf eine Konzentration von 200 mU/ml verdünnt. Darauf basierend wurden Verdünnungsreihen mit unterschiedlichen Volumina angefertigt (Tab. 6). Es wurden verschiedene Volumina gewählt, um zu prüfen, ob die nach Zentrifugation detektierten rEpo-Konzentrationen vom

Füllungszustand der Salivette[®] abhängen. Daraufhin wurden die Epo-Konzentrationen nach Zentrifugation gemessen und mit denen der Testlösung verglichen.

Tab. 6: Verdünnungsreihe zur Untersuchung der Epo-Konzentration vor und nach Zentrifugation bei Verwendung von Watterollen in der Salivette[®]

Volumen der rEpo-Lösung	rEpo-Konzentration in der Testlösung vor Zentrifugation
300 µl	66,7 mU/ml
600 µl	33,3 mU/ml
800 µl	25,0 mU/ml
1.000 µl	20,0 mU/ml
1.400 µl	14,3 mU/ml
1.800 µl	11,1 mU/ml

2.1.1.2 Absorption von rEpo durch Watterollen

Die verschiedenen Volumina mit den unterschiedlichen rEpo-Konzentrationen (Tab. 6) wurden auf die Watterollen gegeben. Die Salivette[®] wurde verschlossen und bei 1.000 G für zwei Minuten zentrifugiert. Aus dem äußeren Röhrchen wurden jeweils 2 x 100 µl der Lösung zur Doppelbestimmung der rEpo-Konzentration mittels ELISA entnommen.

2.1.1.3 Absorption von rEpo durch Slipeinlagen

Um eine Vorstellung über die zu erwartende Epo-Konzentration im Urin zu bekommen, wurden Urinproben von Kindern verwendet, die im Rahmen der Frühgeborenenanämie mit rEpo behandelt wurden. Es wurde die Epo-Konzentration direkt im Urin und jeweils nach Gabe auf eine Slipeinlage und anschließender Zentrifugation bestimmt.

Die Urine von zwei Kindern (Kind 1 und 2) wurden nach der Behandlung mit 250 U rEpo/kg mittels Klebebeutel gewonnen. 2 x 100 µl des Urins wurden direkt zur Doppelbestimmung der rEpo-Konzentration mittels ELISA genutzt. Ein weiteres Aliquot des Urins wurde auf die Slipeinlagen gegeben. Diese wurden in der Salivette[®] zentrifugiert. Jeweils 2 x 100 µl der abzentrifugierten Flüssigkeit wurden für die Doppelbestimmung der rEpo-Konzentration mittels ELISA verwendet. Der dritte Urin wurde von einem Kind (Kind 3) gewonnen, das nicht mit

rEpo behandelt wurde. Hier wurde die Probe mit rEpo aufgesättigt, sodass der Urin nun 5 mU rEpo/100 µl enthielt. In einem Aliquot der jeweiligen Probe wurde die rEpo-Konzentration direkt gemessen. Der andere Teil wurde über die Sliepeinlage gegeben und zentrifugiert. Anschließend wurde die rEpo-Konzentration mittels ELISA bestimmt.

2.1.2 ELISA

Die Epo-Konzentrationen im Urin wurden mittels ELISA-Technik unter Verwendung des Quantikine® IVD® ELISA (R&D Systems, Minneapolis/MN, USA) bestimmt. Der Quantikine® IVD® Epo ELISA basiert auf der Doppel-Antikörper-Sandwich-Methode (Abb. 6).

Auf einer Mikrotiterplatte befinden sich spezifische monoklonale Antikörper (Maus), die gegen humanes Erythropoietin gerichtet sind. Zu den Antikörpern wurden 100 µl Epo Assay-Verdünnungspuffer und 100 µl Probenmaterial bzw. Standard gegeben und für 2 Stunden inkubiert. Nach Bindung des Epo an den Antikörper wurde das überschüssige Probenmaterial entfernt. Anschließend wurde ein Epo-spezifischer polyklonaler Antikörper (Kaninchen), an den Meerrettichperoxidase gebunden war, hinzugegeben und für weitere 2 Stunden inkubiert.

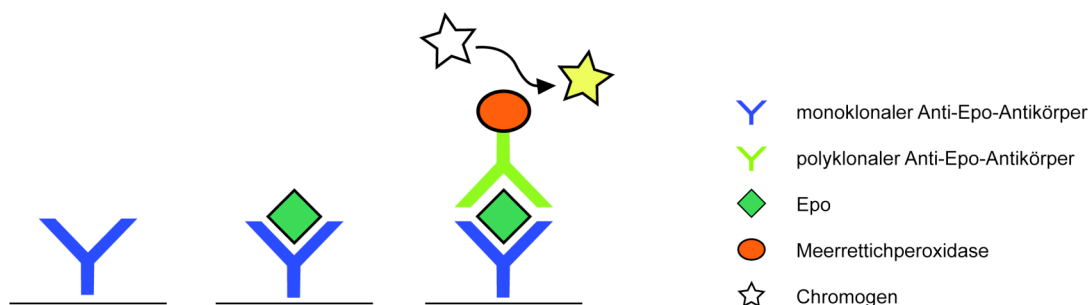


Abb. 6: Schematische Darstellung der Sandwich-ELISA-Methode zur Bestimmung der Epo-Konzentration in den Untersuchungsproben

Überschüssiges Konjugat wurde durch viermaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Danach wurde eine Substratlösung hinzugegeben. Diese enthielt ein Chromogen, welches durch die Meerrettichperoxidase unter Bildung eines blauen Farbkomplexes oxidiert wurde. Nach 25-minütiger Inkubation wurde die Reaktion durch Hinzugabe von Schwefelsäure (2N; 1 mol/l), unter einem Farbumschlag, gestoppt. Innerhalb von max. 30 Minuten nach Zugabe der

Stopplösung wurde die optische Dichte aller Vertiefungen mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Readers (Bio-Rad, Microplate Reader, Modell 550, Kalifornien, USA) bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Korrekturwellenlänge von 570 nm gemessen. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Das Detektionsminimum des ELISA lag bei einer Epo-Konzentration von 2,5 mU/ml. Maximal konnten 200 mU/ml detektiert werden. Bei höheren Werten wurde mit PBS eine 1:10 bis 1:400 Verdünnung hergestellt. Die Interassay-Varianz lag zwischen 6,5 und 11,6 %.

2.1.3 Statistische Datenauswertung

Die statistische Datenauswertung wurde mit der Software SPSS 14.0 ausgeführt. Für statistische Analysen wurde zum Vergleich zweier unabhängiger Gruppen der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Bei Vergleich von mehr als 2 unabhängigen Gruppen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Um den linearen Zusammenhang zwischen zwei Verhältnis-skalierten Merkmalen zu untersuchen, wurde der Pearsons-Korrelationskoeffizient berechnet. Ein *p*-Wert < 0,05 galt als statistisch signifikant.

2.2 Klinische Studie zur Epo-Konzentration im Urin nach i.v.- vs s.c.-Applikation von Epoetin-β zur Behandlung bzw. Prävention der Frühgeborenenanämie

In diesem Teil der Arbeit sollte die Epo-Konzentration im Urin von Frühgeborenen nach i.v.- vs s.c.-Therapie mit Epoetin-β zur Behandlung bzw. Prävention der Frühgeborenenanämie unter Berücksichtigung des Gestationsalters bestimmt werden.

2.2.1 Studienprotokoll

Die Untersuchung der Epo-Konzentration im Urin wurde nach Beratung durch Prof. Dr. P. Martus (Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin) als Pilotstudie angelegt und von der Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin genehmigt (EA-2/06306). Die Studie wurde auf den Stationen der Klinik für Neonatologie am Campus Virchow-Klinikum durchgeführt. Die Einverständniserklärung für die Urinsammlungen wurde nach Aufklärung der Eltern über die rEpo-Behandlung eingeholt. 20 VLBW Frühgeborene (11 weiblich, 9 männlich) mit einem Gestationsalter < 31 SSW wurden in

die Studie eingeschlossen, bevor die rEpo-Therapie begonnen wurde (Tab. 7). Die Epo-Therapie wurde beendet, wenn die Kinder 1.) ein Gestationsalter $> 36+6$ SSW erreichten, 2.) eine Transferrinsättigung $< 30\%$ aufwiesen bzw. die orale Eisensubstitution über einen längeren Zeitraum nicht möglich war, 3.) ein Hämangiom entwickelten oder 4.) das Krankenhaus verließen.

Tab. 7: Demographische Daten der mit rEpo zur Therapie bzw. Prävention der Frühgeborenenanämie behandelten Patienten

	Median	Range
Gestationsalter	26+0 SSW	24+1 bis 30+4 SSW
Geburtsgewicht	833 g	608 bis 1.330 g
Gestationsalter bei Studieneintritt	27+6 SSW	25+4 bis 31+6 SSW
Lebenstag bei Studieneintritt	11	5 bis 32
Gewicht bei Studieneintritt	918 g	658 bis 1.370 g

Die Frühgeborenen erhielten im Rahmen der Routine-Behandlung 250 U Epoetin- β /kg 3-mal wöchentlich (Montag, Mittwoch und Freitag jeweils um 24 Uhr). Solange ein i.v.-Zugang, z.B. für die Gabe von Antibiotika bzw. die Flüssigkeits- oder Nährstoffzufuhr vorhanden war, wurde rEpo i.v. verabreicht. Die Darreichung erfolgte als Bolus über ca. 15 Sekunden. Wenn kein i.v.-Zugang vorhanden war, wurde auf eine s.c.-Applikation (am Oberschenkel) umgestellt. Alle Patienten erhielten ab Beginn der rEpo-Therapie enterales Eisen (3 mg/kg/d). Dieses wurde abhängig von der Transferrinsättigung, welche alle 14 Tage bestimmt wurde, gesteuert und betrug max. 9 mg/kg/d (Tab. 8). War eine enterale Eisensubstitution über längere Zeit nicht möglich (z.B. aufgrund einer nekrotisierenden Enterokolitis) oder sank die Transferrinsättigung unter 30 %, so wurde die rEpo-Behandlung unterbrochen.

Tab. 8: Enterale Eisensubstitution während der rEpo-Behandlung bei Frühgeborenen (nach Obladen 2006)

	1 – 2 Lebenswochen	3 – 4 Lebenswochen	> 4 Lebenswochen
Transferrinsättigung	Dosierung Eisen mg/kg/Tag		
< 30%	3	6	9
30 – 80%	3	6	6
> 80%	3	0	0

Alle 14 Tage wurde mittels eines Klebebeutels Urin vor der rEpo-Gabe (Stunde 0) und jeweils 4 und 8 Stunden nach der rEpo-Gabe gesammelt (Abb. 7), in Eppendorfgefäße abgefüllt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

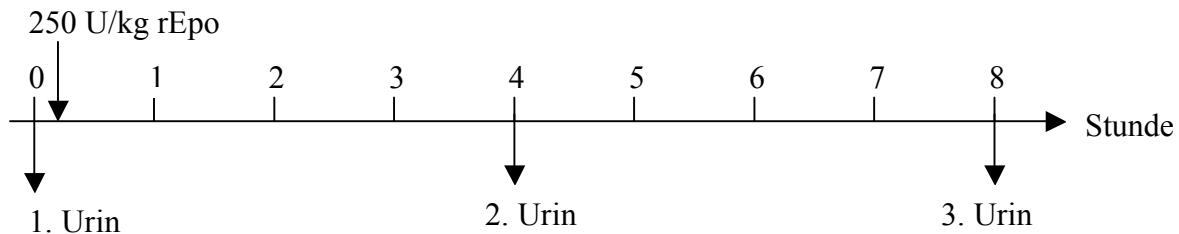


Abb. 7: Zeitpunkte der Probensammlung nach Applikation von 250 U rEpo/kg

Die Kinder wurden entsprechend ihres Gestationsalters zum jeweiligen Zeitpunkt der Urinsammlung drei Untersuchungsgruppen zugeordnet:

Gruppe 1: 25+1 bis 27+6 SSW

Gruppe 2: 28+0 bis 30+6 SSW

Gruppe 3: 31+0 bis 36+6 SSW.

2.3 Studie zur renalen Epo-Ausscheidung unter rEpo-Therapie zur Neuroprotektion bei sehr unreifen Frühgeborenen

In diesem Teil der Arbeit wurde die renale Epo-Ausscheidung bei sehr unreifen Frühgeborenen untersucht, die in der Schweiz in eine randomisierte, doppelblinde, Plazebo-kontrollierte Phase-II Multicenter-Studie zur neuroprotektiven Wirkung von hochdosiertem rEpo bei Frühgeborenen aufgenommen wurden (NCT00413946). Die Studie wurde von der Ethikkommission der Kinderklinik des Universitätsspitals Zürich sowie von der Ethikkommission des Kantons Zürich (KEK), der SwissMedics Bern und den lokalen Ethikkommissionen der teilnehmenden Kliniken genehmigt.

2.3.1 Studienprotokoll

Die Frühgeborenen (Gestationsalter 25+6 bis 31+6 SSW) erhielten 3 x 3.000 U rEpo/kg innerhalb der ersten 42 Stunden nach der Geburt. Die erste Dosis wurde 3 – 6 Stunden nach der Geburt appliziert. Die beiden weiteren Applikationen folgten 12 – 18 Stunden und 36 – 42 Stunden nach der Geburt (Abb. 8). Die Entwicklung der Kinder und eventuelle Komplikationen

wurden nach 7 – 10 Tagen, mit einem Alter von 36 SSW sowie bei Entlassung evaluiert. Im Alter von 40 SSW wurde ein Cranio-MRT durchgeführt. Sekundärer Zielparameter der Studie war die neurologische Entwicklung der Kinder nach 24 Monaten in der rEpo- vs der Plazebo-Gruppe. Diese Aspekte sind jedoch nicht Bestandteil dieser Arbeit. Neben den Untersuchungen zur Neuroprotektion wurde die Epo-Ausscheidung im Urin nach der jeweiligen Applikation von 3.000 U rEpo/kg untersucht. Hierzu wurden jeweils 2 Urine nach erster, zweiter und dritter rEpo-Applikation gesammelt (Abb. 8). Bei dem in der Neuroprotektionsstudie verwendeten rEpo handelte es sich um Epoetin- β (Recormon[®], Roche, Basel, Schweiz). NaCl 0,9 % oder rEpo wurden über den Nabelvenenkatheter oder über einen peripheren venösen Zugang als Kurzinfusion über 10 Minuten appliziert.

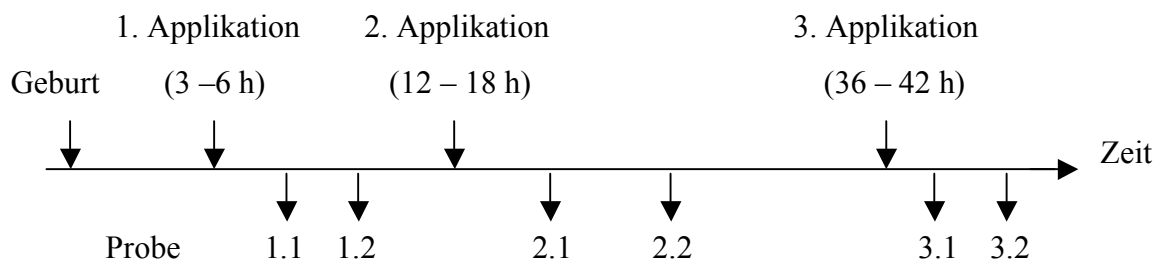


Abb. 8: Zeitpunkte der Urinasservierung nach Applikation von 3 x 3.000 U rEpo/kg

Es wurden alle Urinproben in die Untersuchung einbezogen, die bis Ende November 2009 im Rahmen der Studie gesammelt wurden. Es konnten 75 Frühgeborene (42 rEpo, 33 Plazebo) in die Untersuchung eingeschlossen werden (Tab. 9). Insgesamt wurden 269 Urinproben gesammelt (154 rEpo, 115 Plazebo) (Tab. 10). Nachdem die Epo-Konzentration im Urin gemessen wurde, erfolgte die Zuteilung der Proben zu der rEpo- bzw. der Plazebogruppe durch den Studien-Pharmazeuten, sodass die an den Langzeituntersuchungen beteiligten Untersucher weiterhin geblendet sind.

Die Patienten wurden entsprechend ihres Gestationsalters zwei Gruppen zugeordnet:

Gruppe 1: 26+0 bis 28+6 SSW;

Gruppe 2: 29+0 bis 31+6 SSW.

Von den 75 Frühgeborenen kamen 69 Kinder per Sectio zur Welt. 24 Kinder waren zum Zeitpunkt der Urinsammlung beatmet, bei 23 Frühgeborenen lag eine Chorioamnionitis und in 12 Fällen eine intrauterine Wachstumsretardierung (< 10. Perzentile) vor. Bei 12 Müttern war ein Gestationsdiabetes bekannt.

Tab. 9: Klinische Daten der Untersuchungspopulation in der Neuroprotektionsstudie (Plazebo- und rEpo-Gruppe)

	Median	Range	Quartilen
Gestationsalter	29+3 SSW	25+6 bis 31+6 SSW	25: 27+7 SSW 75: 30+5 SSW
Geburtsgewicht	1220 g	570 bis 2020 g	25: 940 g 75: 1505 g
Nabel-Arterien-pH	7,33	7,0 bis 7,5	25: 7,29 75: 7,37
Base Excess (Nabelschnurarterie)	-2,9	-16,9 bis 0,1	25: -4,5 75: -1,5
Apgar (5 min)	8	1 bis 10	25: 6 75: 9

Tab. 10: Gestationsalter der Patienten und Anzahl der Proben, die im Rahmen der Studie zur Neuroprotektion analysiert wurden

Gestationsalter	rEpo-Gruppe		Plazebogruppe	
	n Patienten	n Proben	n Patienten	n Proben
25+6 bis 28+6	21	74	14	49
29+0 bis 31+6	21	80	19	66

2.3.2 Urinsammlung

Im Rahmen der Neuroprotektionsstudie wurde, bedingt durch die kurzen Abstände zwischen den Zeitpunkten der Urinasservierung und wegen der vulnerablen Haut von Frühgeborenen, der Urin mittels vorgelegter steriler Röhrchen (Vacutainer Nativröhrchen; BD, Flanklin Lakes, NJ USA) bei den Jungen und mittels latexfreier steriler Einmalhandschuhe (Dispos-A-Glove; Ansell, Tamworth, UK) bei den Mädchen gesammelt. Die Einmalhandschuhe wurden längs an der Handgelenksseite etwas aufgeschnitten und den Mädchen so vorgelegt, dass der Urin in das geschlossene, für die Finger vorgesehene Ende der Handschuhe fließen konnte.

3 Ergebnisse

3.1 Prüfung der Auffang-Materialien für die Analyse der rEpo-Konzentrationen im Urin

Zunächst sollte eine Methode gefunden werden, die es erlaubt, Urin von Frühgeborenen ohne den Einsatz von selbstklebenden Urinbeuteln aufzufangen, beispielsweise durch Verwendung der Salivette[®]. Vor Gebrauch sollte geklärt werden, ob rEpo nach Aufnahme durch die Auffangmaterialien wieder vollständig abgegeben wird.

3.1.1 Watterollen

Nachdem verschiedene Volumina der Trägerflüssigkeit (PBS) mit unterschiedlichen rEpo-Konzentrationen auf die Watterolle der Salivette[®] pipettiert und anschließend zentrifugiert wurden, war in der abzentrifugierten Flüssigkeit mittels ELISA kein Epo detektierbar.

3.1.2 Slipeinlagen

Bei Verwendung synthetischer Slipeinlagen als Auffangmaterial war die Absorption von rEpo zwar geringer als bei Verwendung von Watterollen, mit durchschnittlich mehr als 50 % jedoch weiterhin hoch (Tab. 11).

Tab. 11: Epo-Konzentration im Urin Frühgeborener vor und nach Aufnahme über eine Slipeinlage

	Epo im Urin (nativ)	Epo im Urin nach Aufnahme über eine Slipeinlage	Epo-Verlust in %
Kind 1	198,3 mU/ml	74,7 mU/ml	63,0
Kind 2	309,0 mU/ml	122,0 mU/ml	60,5
Kind 3	76,8 mU/ml	50,6 mU/ml	34,1
			Ø 52,5 ± 16,01

Sowohl bei dem Versuch mit der Watterolle in der Salivette[®] als auch bei dem Versuch mit der Slipeinlage in der Salivette[®] waren erhebliche Mengen des aufpipettierten rEpo nicht mehr

detektierbar. Beide Methoden wurden deshalb als ungeeignet für die Urinsammlung zur Bestimmung der Epo-Konzentration im Urin bei Frühgeborenen befunden. Aufgrund dessen musste auf die in der Routine verwendeten Klebebeutel zurückgegriffen werden.

3.2 Untersuchung der Epo-Konzentration im Urin nach i.v.- vs s.c.-Applikation von Epoetin- β zur Behandlung bzw. Prävention der Frühgeborenenanämie

In der in 2.2 beschriebenen Studie wurden 159 Urinproben von 20 Kindern jeweils vor sowie 4 und 8 Stunden nach Applikation von 250 U rEpo/kg gesammelt. Dabei handelte es sich um 53 Proben vor rEpo-Gabe (Stunde 0), insgesamt 46 Proben nach i.v.-Applikation (davon 23 Proben, die nach 4 Stunden aufgefangen wurden sowie 23 Proben, die nach 8 Stunden asserviert wurden). 60 Proben wurden nach s.c.-Gabe gesammelt (davon 31 Proben nach 4 Stunden und 29 Proben nach 8 Stunden). Es gelang nicht bei jedem Kind, Urin zu allen 3 angestrebten Untersuchungszeitpunkten (vor sowie 4 und 8 Stunden nach rEpo-Applikation) aufzufangen, u.a. weil der Urinbeutel verrutschte oder Urin mit Stuhl verunreinigt wurde.

Die Epo-Konzentration im Urin nach 4 Stunden war im Median nach i.v.-Applikation signifikant höher als nach s.c.-Applikation. Auch nach 8 Stunden war die Epo-Konzentration im Urin nach i.v.-Applikation signifikant höher als nach s.c.-Applikation (Abb. 9; Tab. 12). Betrachtet man die Epo-Ausscheidung im Urin longitudinal, so ergeben sich sowohl nach i.v.- als auch nach s.c.-Applikation keine signifikanten Unterschiede in der Epo-Konzentration im Urin nach 4 und 8 Stunden nach Epo-Applikation (jeweils $p > 0,05$).

Tab. 12: Epo-Konzentration vor sowie 4 und 8 Stunden nach Applikation von 250 U rEpo/kg

Zeitpunkt	Epo im Urin Median (Range); Anzahl Epo-positiver Proben	Epo im Urin nach s.c.-Applikation Median (Range); Anzahl Epo-positiver Proben	Epo im Urin nach i.v.-Applikation Median (Range); Anzahl Epo-positiver Proben
0	< 2,5 (< 2,5 – 59 mU/ml); 11/53 Proben (21%)		
4 Stunden	12 (< 2,5 – 377 mU/ml); 32/54 Proben (60 %)	6 (< 2,5 – 200 mU/ml); 17/31 Proben (55%)	39 (< 2,5 – 377 mU/ml); 15/23 Proben (65%)
8 Stunden	21 (< 2,5 – 305 mU/ml); 31/52 Proben (60%)	< 2,5 (< 2,5 – 81 mU/ml); 14/29 Proben (48%)	57 (< 2,5 – 305 mU/ml); 17/23 Proben (74%)

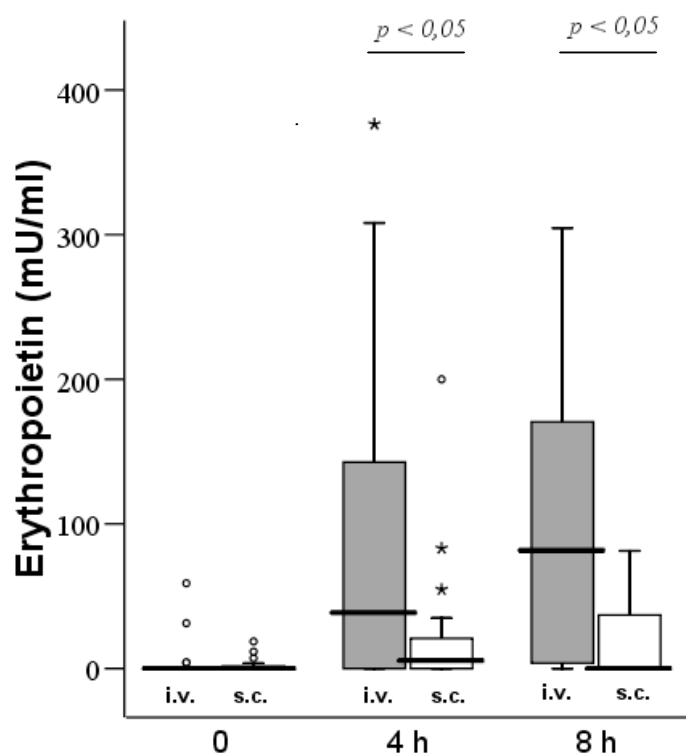


Abb. 9: Epo-Konzentration im Urin Frühgeborener vor sowie 4 und 8 Stunden nach i.v.- bzw. s.c.-Applikation von 250 U Epoetin- β /kg Körpergewicht; innerhalb der Box (Interquartilenabstand) liegen die mittleren 50 % der Werte; langer waagerechter Balken = Median; kurzer unterer Balken = „*lower fence*“ (-1,5-facher Interquartilenabstand); oberer waagerechter Balken = „*upper fence*“ (1,5-facher Interquartilenabstand); * = Ausreißer (1,5- bis 3-facher Interquartilen-Range), o = Extremwerte (> 3-facher Interquartilen-Range)

Betrachtet man nur die Proben, in denen Epo detektiert wurde (Epo-Konzentration > 2,5 mU/ml), so waren die Epo-Konzentrationen im Urin 4 Stunden und 8 Stunden nach i.v.-Applikation im Durchschnitt 3-fach höher als nach s.c.-Applikation (nach 4 Stunden i.v.: 139 ± 105 mU/ml, s.c.: 47 ± 47 mU/ml; nach 8 Stunden i.v.: 122 ± 84 mU/ml, s.c.: 40 ± 22 mU/ml).

3.2.1 Untersuchung der Epo-Konzentration im Urin unter Berücksichtigung des Gestationsalters

Es wurde geprüft, ob die Epo-Ausscheidung im Urin vom Gestationsalter abhängt. Hierbei zeigt sich eine mit dem Gestationsalter abnehmende Epo-Konzentration im Urin (Abb. 10).

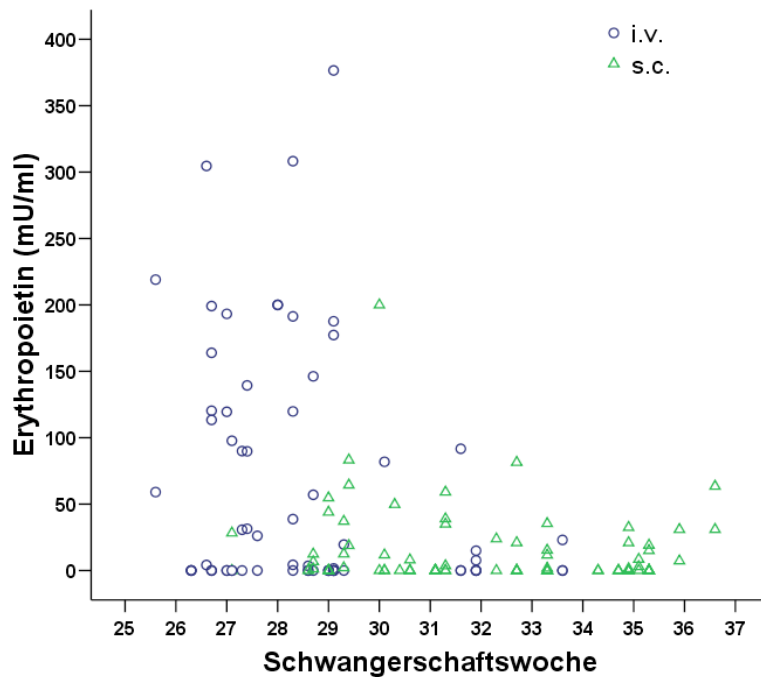


Abb. 10: Epo-Konzentration im Urin Frühgeborener nach i.v.- (Kreise) bzw. s.c.- (Dreiecke) Applikation von 250 U Epoetin- β /kg unter Berücksichtigung des Gestationsalters

Es wurde die Abhängigkeit der Epo-Konzentration im Urin vom postnatalen Lebenstag untersucht. Dabei wiesen Kinder mit einem Gestationsalter von 31+0 bis 36+6 SSW unabhängig vom postnatalen Alter eine geringe Epo-Konzentration im Urin auf ($p = 0,11$; Abb. 11).

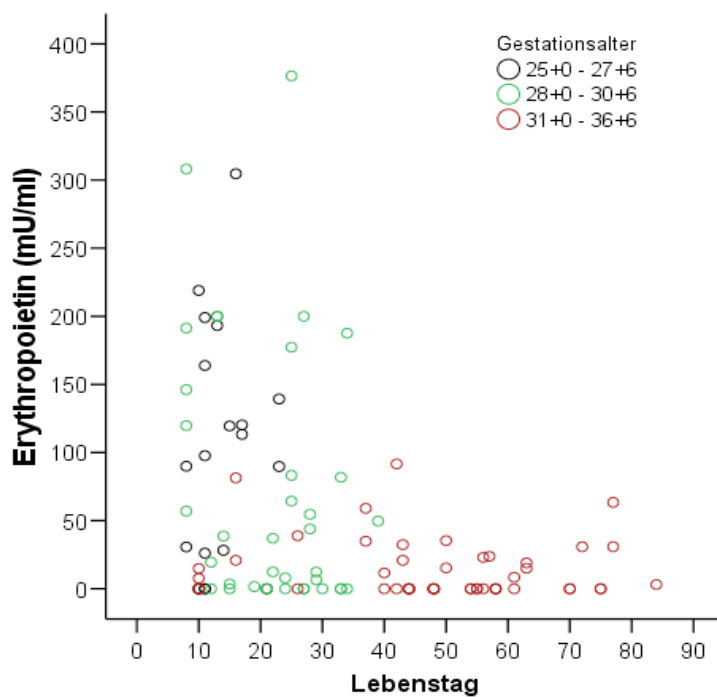


Abb. 11: Epo-Konzentration im Urin nach Applikation von 250 U rEpo/kg (i.v. und s.c.) von Kindern mit unterschiedlichem Gestationsalter (25+0 bis 27+6 SSW, 28+0 bis 30+6 SSW und 31+0 bis 36+6 SSW) in Relation zum Lebenstag nach Geburt

Die Epo-Konzentrationen im Urin Frühgeborener mit einem Gestationsalter < 31 SSW waren nach i.v.-Applikation von rEpo signifikant höher als im Urin Frühgeborener mit einem Gestationsalter > 31 SSW ($p < 0,05$) (Abb. 12).

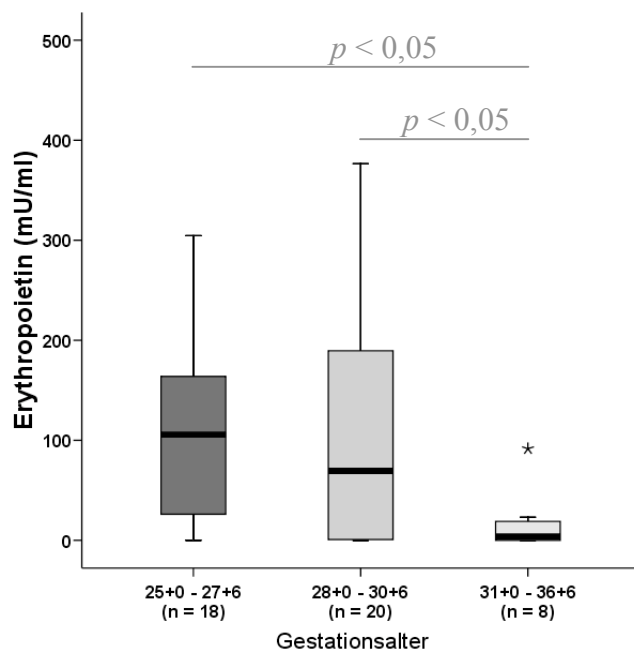


Abb. 12: Epo-Konzentration im Urin von Frühgeborenen zum Zeitpunkt von 4 und 8 Stunden nach i.v.-Applikation von 250 U Epoetin- β /kg, * = Extremwert

Nach s.c.-Applikation waren in den verschiedenen Entwicklungsstadien keine signifikanten Unterschiede zwischen den Epo-Konzentrationen im Urin zu verzeichnen. Im Trend war die Epo-Konzentration im Urin bei unreiferen Kindern etwas höher (Abb. 13).

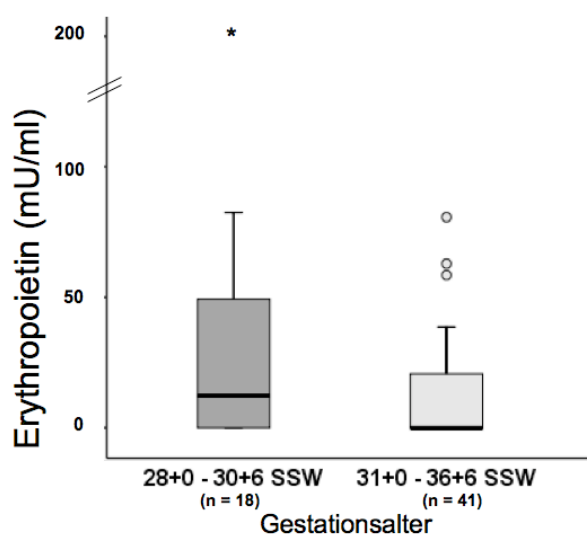


Abb. 13: Epo-Konzentration im Urin von Frühgeborenen 4 und 8 Stunden nach s.c.-Applikation von 250 U Epoetin- β /kg (im Alter von 25+0 bis 27+6 SSW war nur eine Probe nach s.c.-Gabe vorhanden (28,2 mU/ml)), o = Ausreißer, * = Extremwert

Bei 11 Kindern (6 mit einem Gestationsalter von 25+0 bis 27+6 SSW und 5 mit einem Gestationsalter von 28+0 bis 30+6 SSW) gelang es, 3 Proben (vor rEpo-Gabe sowie 4 und 8 Stunden nach i.v.-Applikation) im longitudinalen Verlauf zu sammeln. Sowohl in der Gruppe von Kindern mit einem Gestationsalter von 25+0 bis 27+6 SSW (1 von 6 Kindern), als auch in der Gruppe von Kindern mit einem Gestationsalter von 28+0 bis 30+6 SSW (2 von 6 Kindern) finden sich Patienten, bei denen ein Anstieg der Epo-Konzentration im Urin nahezu ausbleibt (Abb. 14).

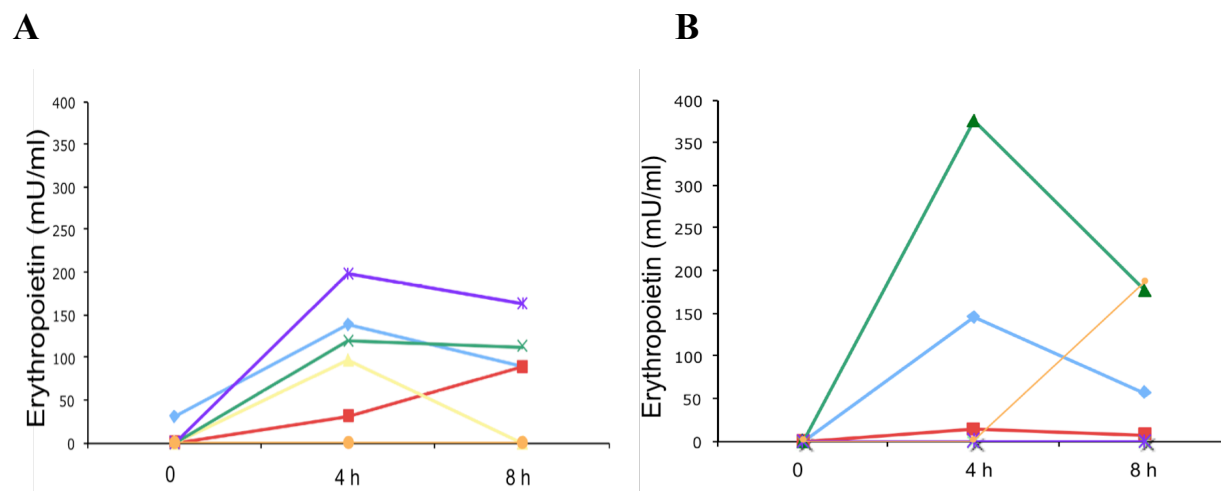


Abb. 14: Longitudinaler Verlauf der Epo-Konzentration im Urin nach i.v.-Applikation von 250 U rEpo/kg bei Frühgeborenen (A) mit einem Gestationsalter von 25+0 bis 27+6 SSW (n = 6) und (B) mit einem Gestationsalter von 28+0 bis 30+6 SSW (n = 5)

3.2.2 Berechnung des Verhältnisses von Epo im Urin zur applizierten rEpo-Menge

Bei den Frühgeborenen, von denen sowohl 4 als auch 8 Stunden nach rEpo-Applikation Urin asserviert wurde, konnte die Menge des renal ausgeschiedenen Epo zur Menge des applizierten rEpo in Relation gesetzt werden. Hierzu wurde zunächst die absolute rEpo-Menge nach den ersten 4 Stunden (rEpo-Konzentration in mU/ml x Urinmenge in ml) berechnet und anschließend mit der absoluten Menge im Urin in den nachfolgenden 4 Stunden addiert. Anhand des Gewichtes wurde berechnet, welche absolute Menge rEpo das jeweilige Kind genau bekommen hat (250 U/kg). Darauf basierend konnte die Menge des in den ersten 8 Stunden im Urin ausgeschiedenen rEpo in Relation zur Menge des applizierten rEpo berechnet werden. Diese Relation betrug innerhalb der ersten 8 Stunden nach i.v. rEpo-Applikation 0,59 % (Median; Range 0 – 4,46 %) der verabreichten rEpo-Menge:

25+0 – 27+6 SSW: Median 0,84 %, Range 0 – 2,4 %;

28+0 – 30+6 SSW: Median 0,77 %, Range 0 – 4,46 %;

31+0 – 36+6 SSW: Median 0,18 %, Range 0 – 0,48 %.

Nach s.c.-Applikation betrug sie 0,36 % (Median; Range 0 – 0,74 %):

< 31 SSW: Median 0,36 %, Range 0 – 0,74 %; \geq 31 SSW: Median 0,49 %, Range 0,32 – 0,62 %.

Betrachtet man nur die Epo-Menge im Urin nach der jeweils ersten i.v.-Applikation, so ergibt sich ein prozentualer Verlust von 0,4 % der applizierten rEpo-Dosis (Median; Range 0 – 2,8 %).

3.3 Untersuchung der Epo-Konzentration im Urin nach hochdosierter rEpo-Therapie zur Neuroprotektion bei Frühgeborenen

3.3.1 Epo-Konzentration im Urin nach hochdosierter i.v.-Applikation von rEpo

In der Studie zur Neuroprotektion durch rEpo erhielten die Frühgeborenen innerhalb von 42 Stunden 3 x 3.000 U rEpo/kg oder als Plazebo ein äquivalentes Volumen NaCl 0,9 %. Es wurden 269 Urinproben von 75 Kindern asserviert. Von den 75 Frühgeborenen erhielten 42 Kinder rEpo und 33 Kinder das Plazebo. 154 Proben gehörten zur rEpo- und 115 Proben zur Plazebo-Gruppe. Während Epo im Urin der Kontrollgruppe in 82,6 % der Proben nicht detektierbar oder sehr niedrig (20/115 Proben; max. 18,1 mU/ml) war, konnte Epo in 98,7 % der Proben der rEpo-Gruppe detektiert werden. Bei den 42 Frühgeborenen der rEpo-Gruppe betrug die Epo-Konzentration im Urin im Median 4.069 mU/ml (Range 269 – 26.820 mU/ml). Die mediane Epo-Konzentration im Urin der Kontrollgruppe war < 2,5 mU/ml (Range < 2,5 – 18,1 mU/ml). Da nicht von jedem Kind 6 Urinproben gewonnen werden konnten und somit Kinder mit 6 Urinproben stärker in die Berechnungen eingehen würden als Kinder mit weniger Urinproben, ging bei dieser Analyse für jedes Kind ein Mittelwert aus den vorhandenen Epo-Konzentrationen im Urin in die Berechnung ein. Der Median der ungemittelten Epo-Konzentrationen im Urin der rEpo-Gruppe ist in Tabelle 13 für den jeweiligen Untersuchungszeitpunkt nach rEpo-Applikation unter Berücksichtigung des Gestationsalters zusammengestellt.

Tab. 13: Epo-Konzentrationen im Urin nach der 1., 2. und 3. Gabe von 3.000 U rEpo/kg unter Berücksichtigung des Entwicklungsstadiums; Werte nicht gemittelt; Median (Range), n = Anzahl der Urinproben

	1. Urin nach 1. Epo-Gabe	2. Urin nach 1. Epo-Gabe	1. Urin nach 2. Epo-Gabe	2. Urin nach 2. Epo-Gabe	1. Urin nach 3. Epo-Gabe	2. Urin nach 3. Epo-Gabe
25+6 bis 28+6 SSW	6.251 mU/ml (1.201 – 45.440) n = 14	5.560 mU/ml (1.034 – 24.400) n = 11	7.960 mU/ml (2.460 – 48.940) n = 11	5.280 mU/ml (1.065 – 45.960) n = 15	4.796 mU/ml (1.345 – 18.680) n = 14	8.830 mU/ml (220 – 23.360) n = 9
29+0 bis 31+6 SSW	1.786 mU/ml (< 2,5 – 25.596) n = 16	4.150 mU/ml (255 – 40.720) n = 12	2.448 mU/ml (96 – 26.600) n = 16	1.636 mU/ml (225 – 28.800) n = 11	3.193 mU/ml (291 – 23.234) n = 16	1.580 mU/ml (< 2,5 – 6.864) n = 9

Die Epo-Konzentration im Urin der Kinder aus der rEpo-Gruppe war signifikant höher als die im Urin der Plazebo-Gruppe (Abb. 15). Berücksichtigt man die verschiedenen Entwicklungsstadien, so fanden sich signifikant höhere Epo-Konzentrationen im Urin von Kindern mit einem Gestationsalter von $< 29+0$ SSW als bei reiferen Frühgeborenen mit einem Gestationsalter $\geq 29+0$ SSW (25+6 bis 28+6 SSW: Median 7.000 mU/ml, Range 1.497 – 26.820 mU/ml; 29+0 bis 31+6 SSW Median 2.633 mU/ml, Range 269 – 17.319 m/ml) ($p < 0,05$). Auch bei dieser Analyse ging für jedes Kind ein Mittelwert aus den vorhandenen Epo-Konzentrationen im Urin in die Berechnung ein.

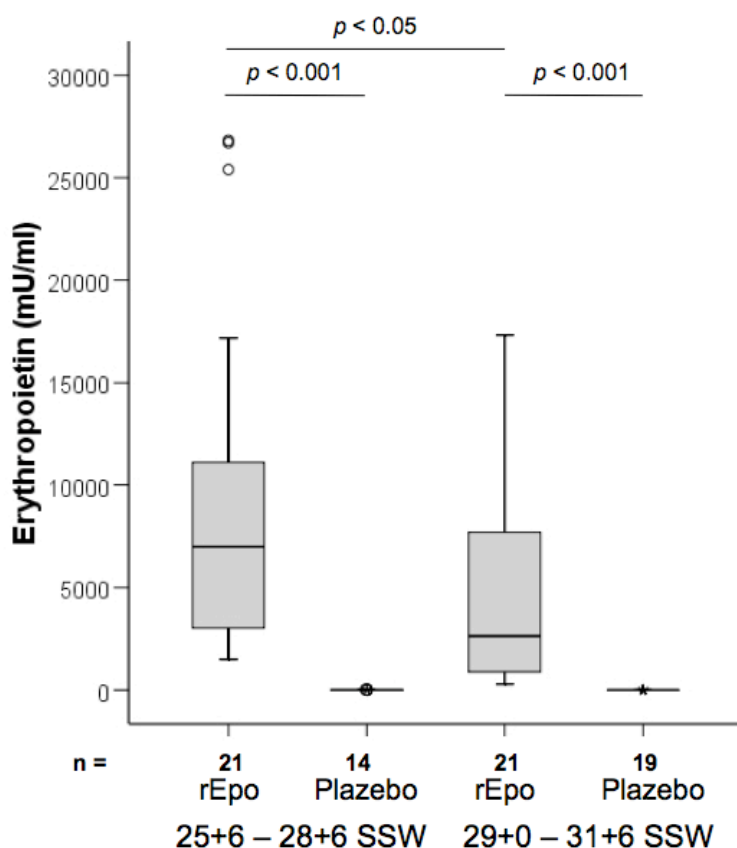


Abb. 15: Epo-Konzentration im Urin nach Applikation von 3.000 U rEpo/kg bzw. NaCl 0,9 % (Plazebo) in den ersten drei Tagen nach der Geburt (Messwerte nach erster, zweiter und dritter rEpo Gabe wurden zusammengefasst; Werte eines Kindes jeweils gemittelt; n = Anzahl der Proben); o = Ausreißer

Analysiert man die rEpo-Konzentration im Urin nach der jeweiligen Applikation von 3.000 U rEpo/kg bei Kindern mit einem Gestationalalter von < 29 SSW *vs* ≥ 29 SSW, so findet sich nur nach der 2. rEpo-Applikation eine signifikant höhere Epo-Konzentration im Urin unreiferer Kinder, ein Trend ist jedoch auch nach der ersten und dritten Applikation erkennbar (Abb. 16). Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Epo-Verlusten nach erster, zweiter oder dritter Gabe. Weiterhin fanden sich in den entsprechenden Altersgruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Epo-Konzentrationen im ersten und zweiten Urin nach jeweiliger Gabe.

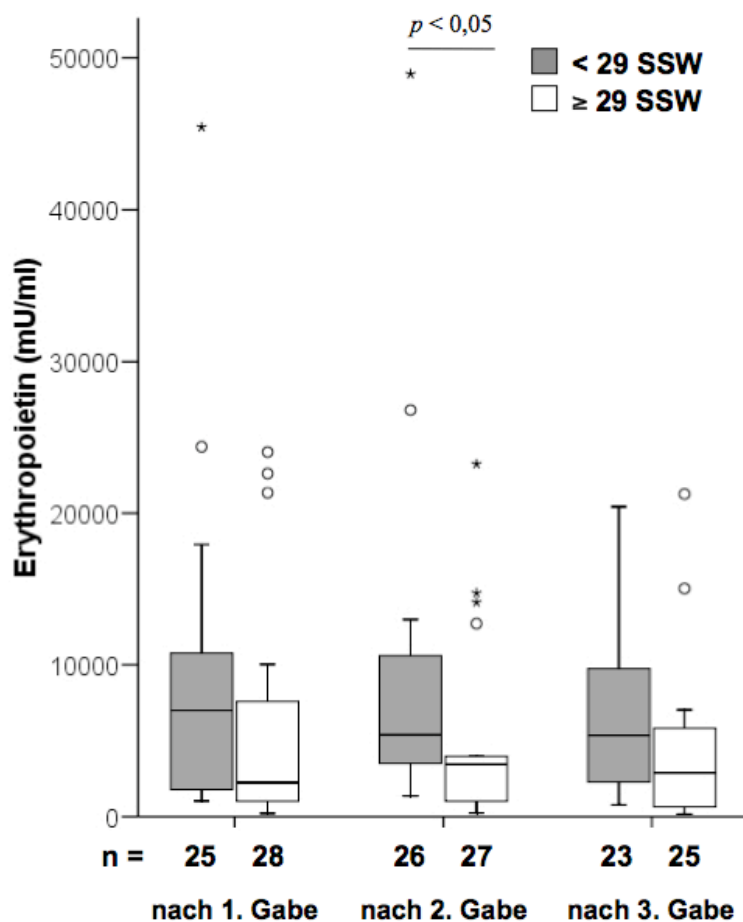


Abb. 16: Epo-Konzentration im Urin nach dreimaliger Applikation von 3.000 U rEpo/kg bei Frühgeborenen mit einem Gestationalalter < 29 SSW *vs* ≥ 29 SSW. Werte nicht gemittelt; n = Anzahl der Proben; o = Ausreißer, * = Extremwerte

Bei 11 Kindern (n = 6 < 29 SSW, n = 5 ≥ 29 SSW) gelang es, zu den angestrebten Zeitpunkten alle 6 Urinproben zu sammeln (Abb. 17).

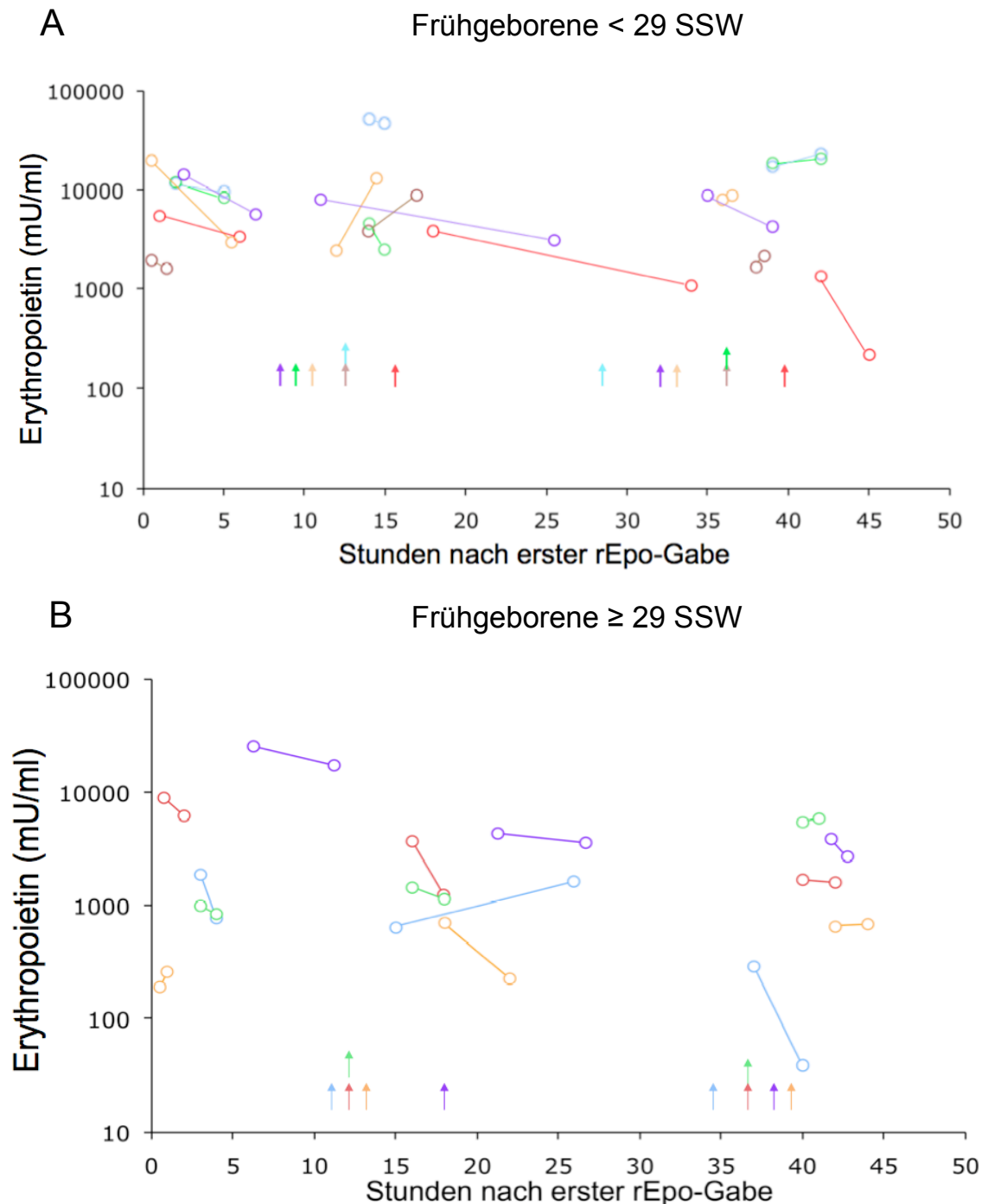


Abb. 17: Longitudinaler Verlauf der Epo-Konzentration im Urin von 11 Frühgeborenen mit einem Gestationsalter < 29 SSW (A) und ≥ 29 SSW (B) nach dreimaliger Applikation von 3.000 U rEpo/kg (Pfeile stellen zweite und dritte rEpo-Applikation dar. Kreise stellen die Epo-Konzentrationen in zwei jeweils aufeinanderfolgenden Urinproben dar.)

3.3.2 Epo-Konzentration im Urin in Relation zur Menge des applizierten rEpo

Für die Berechnung der prozentualen Epo-Ausscheidung im Urin wurde der Mittelwert aus der Menge des renal ausgeschiedenen Epo im ersten und zweiten Urin nach erster Epo-Applikation berechnet. Dieser wurde in Relation zu der auf das Gewicht bezogenen, tatsächlich applizierten

rEpo-Menge gesetzt. Die prozentuale Epo-Ausscheidung im Urin betrug bei Frühgeborenen mit einem Gestationsalter < 29 SSW nach erster Applikation im Median 2,8 % (Range 0,1 – 23 %) und im Median 1,24 % (Range 0,3 – 9,4 %) bei Kindern mit einem Gestationsalter \geq 29 SSW.

3.3.3 Vergleich der Epo-Konzentrationen im Urin nach hoch- bzw. niedrigdosiertem rEpo

Zum Vergleich der Epo-Ausscheidung im Urin nach hoch (3.000 U/kg) vs niedrig dosierter (250 U/kg) rEpo-Applikation wurden jeweils nur die Epo-Konzentrationen im Urin nach der ersten rEpo-Applikation (i.v.) herangezogen. Hierbei zeigten sich sowohl bei Kindern mit einem Gestationsalter < 29 SSW als auch bei den Frühgeborenen mit einem Gestationsalter \geq 29 SSW signifikant höhere Verluste nach Applikation von 3.000 U/kg als bei der Applikation von 250 U/kg (Abb. 19).

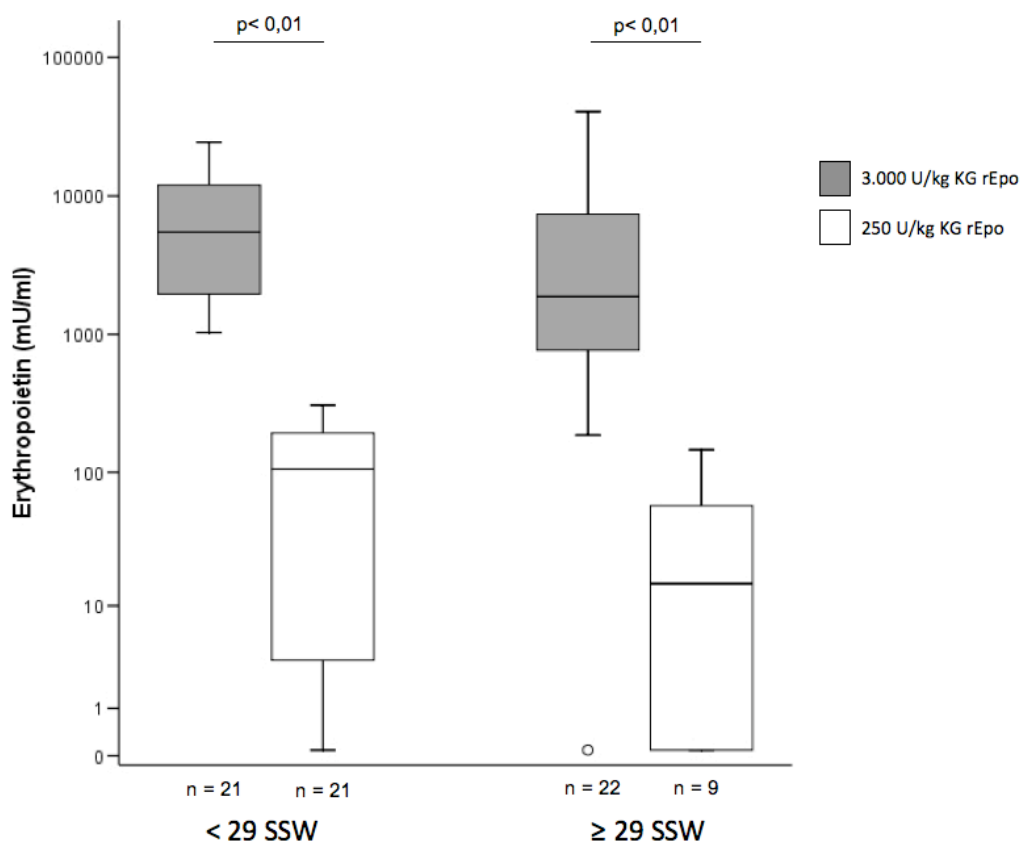


Abb. 18: Epo-Konzentration im Urin von Frühgeborenen mit einem Gestationsalter < 29 SSW und \geq 29 SSW nach erster i.v.-Applikation von 3.000 U rEpo/kg vs 250 U rEpo/kg; n = Anzahl; o = Extremwert

4 Diskussion

In dieser Arbeit sollte die Epo-Ausscheidung im Urin von Frühgeborenen unterschiedlicher Reife analysiert werden. Hierbei sollte die Applikationsart (i.v. vs s.c.) sowie die Dosierung von rEpo (250 U/kg vs 3.000 U/kg) besondere Berücksichtigung finden.

4.1 Methode der Urinsammlung

In der Klinik für Neonatologie der Charité wird der Urin von Früh- und Neugeborenen mittels selbstklebender Urinbeutel (Abb. 4) aus Polyethylen aufgefangen. Zunächst sollte eine Methode zur Asservierung des Urins bei Frühgeborenen gefunden werden, die sowohl schonend für die noch unreife Haut der Kinder ist als auch die Quantifizierung der Epo-Konzentration im Urin ermöglicht. Der Urin der Frühgeborenen sollte mittels verschiedener in der Windel vorgelegter Materialien aufgefangen und anschließend zentrifugiert werden, um die rEpo-Konzentration im Urin mittels ELISA zu bestimmen. Unsere methodischen Voruntersuchungen zeigten allerdings, dass das hochgradig glykosylierte Epo von Watte und zellstoffhaltigen Materialien zu mehr als 50 % der Ausgangsdosierung absorbiert wird. Aufgrund dessen führten wir die Urinsammlung bei den Frühgeborenen weiter mit Klebebeuteln durch. Problematisch war, und dies begründet das Fehlen einiger longitudinal zu untersuchenden Urinproben, dass der gewonnene Urin häufig mit Stuhl verunreinigt war oder aufgrund eines verrutschten Urinbeutels verloren ging.

4.2 Epo im Urin nach Applikation von 250 U rEpo/kg zur Behandlung der Frühgeborenenanämie

Die Effizienz und der Nutzen einer Behandlung mit rEpo zur Prävention oder Therapie der Frühgeborenenanämie sind umstritten. Sie wurde in den jüngsten Cochrane-Metaanalysen hinsichtlich der Reduktion des totalen Transfusionsvolumens, der Reduktion der Anzahl an Transfusionen und der Reduktion der Anzahl an Spenderexpositionen sowie der Sicherheit des Medikamentes als unzureichend befunden (Aher 2006, Ohlsson 2006). Da die Niere der Frühgeborenen noch nicht vollständig ausgereift ist, bestand die Hypothese, dass die Funktion der Niere unvollständig ist und so eventuell größere Mengen des Medikaments über die Niere ausgeschieden werden als bei älteren Neugeborenen oder Erwachsenen. Im Rahmen der routinemäßigen rEpo-Behandlung wurde die Epo-Konzentration im Urin von VLBW

Frühgeborenen untersucht, um zu überprüfen, ob die Applikationsform (i.v. vs s.c.) bzw. die Nierenreife einen Einfluss auf die Ausscheidung des Medikaments im Urin haben.

In diesem Teilprojekt wurde die Epo-Konzentration im Urin von 20 VLBW Frühgeborenen innerhalb von 8 Stunden nach i.v.- bzw. s.c.-Applikation von 250 U Epoetin- β /kg zu unterschiedlichen Zeitpunkten quantifiziert. Im Gegensatz zu Warwood *et al.*, die weder nach i.v.- noch nach s.c.-Applikation eines Epo-Präparats Epo im Urin detektierten, konnten wir sowohl nach i.v- als auch nach s.c.-Applikation rEpo im Urin der Frühgeborenen nachweisen. Warwood *et al.* verwendeten allerdings Darbepoetin, ein hochgradiger glykosiliertes Epo-Derivat (37,1 kDa) und sammelten den Urin mittels Watterollen. Da Darbepoetin ein stärker glykosiliertes Molekül als Epoetin- β ist, ist zu erwarten, dass es stärker an baumwollhaltiges Material bindet als Epoetin- β . Somit ist kritisch zu hinterfragen, ob nach Applikation von Darbepoetin tatsächlich kein Epo ausgeschieden wird.

In unserer Studie fanden sich vor rEpo-Applikation $< 2,5$ mU/ml ($< 2,5 - 59$ mU/ml) im Urin der Frühgeborenen. Diese Werte stimmen in etwa mit der endogenen Epo-Ausscheidung, die beim gesunden Erwachsenen (9 – 23 mU/ml) beobachtet wurde, überein (Souillard 1996).

Nach s.c.-Applikation wurde im Urin der Frühgeborenen im Mittel eine Konzentration von $46,6 \pm 47$ mU/ml nach 4 Stunden bzw. $40,46 \pm 21,5$ mU/ml nach 8 Stunden gemessen. Nach i.v.-Applikation ergab sich im Mittel eine Konzentration von $138,6 \pm 105$ mU/ml nach 4 Stunden und von $121,9 \pm 84,2$ mU/ml nach 8 Stunden. Um die Werte in Relation setzen und bewerten zu können, ist es hilfreich, die endogenen Epo-Konzentrationen im Serum von Frühgeborenen zu betrachten. Bierer *et al.* beschrieben die endogenen Epo-Konzentrationen im Serum von Frühgeborenen < 32 SSW mit einem Geburtsgewicht < 1.000 g. Hierbei ergaben sich im Mittel eine Epo-Konzentration von 26 ± 11 mU/ml (Bierer 2006).

In unserer Studie betrug die Epo-Konzentration im Urin innerhalb der ersten 8 Stunden nach i.v.-Gabe 0,59 % (Median; Range: 0 – 4,5 %) und nach s.c.-Gabe 0,36 % (Median; Range: 0 – 0,74 %) der applizierten Epo-Dosis. Ein prozentualer Verlust innerhalb der ersten 8 Stunden von bis zu 4,5 % nach i.v.- und von max. 0,75 % nach s.c.-Applikation von 250 U/kg ist insgesamt als gering einzuschätzen. Die Epo-Konzentration im Urin nach i.v.-Applikation war im Median nach 8 Stunden höher als nach 4 Stunden (Abb. 9). Da rEpo nach i.v.-Applikation innerhalb weniger Minuten seine Maximalkonzentration im Plasma erreicht (Abb. 2), wurde ein Maximum der Epo-Ausscheidung im Urin nur wenige Stunden nach Applikation des Medikaments erwartet und entsprechend der Beobachtungszeitraum von 8 Stunden gewählt. Zukünftig wäre eine Beobachtung des weiteren Verlaufs der rEpo-Konzentration im Urin nach mehr als 8 Stunden zu erwägen. Die Epo-Konzentrationen im Urin sind nach i.v.-Applikation sowohl nach 4 Stunden

als auch nach 8 Stunden signifikant höher als nach s.c.-Applikation (Abb. 9). Hierbei muss jedoch bedacht werden, dass bei höherem Gestationsalter die s.c.-Applikation aufgrund eines fehlenden i.v.-Zugangs häufiger Verwendung findet als bei unreiferen Kindern (Abb. 10). Diese Tatsache schränkt die Aussagekraft der Daten ein, zumal es auch postnatal zu einer Reifung der Niere kommt (Guignard 1986). Bei unseren Daten ließ sich jedoch kein Zusammenhang zwischen dem postnatalen Lebenstag und der Epo-Konzentration im Urin erkennen (Bsp.: Korrelation zwischen rEpo im Urin nach s.c.-Applikation in der Gruppe 31+0 – 36+6 SSW und dem Lebenstag: Pearson-Korrelationskoeffizient $-0,26$, $p = 0,11$). Ein anderer Studienaufbau ist jedoch nicht vertretbar, da sonst unnötige bzw. vermeidbare i.v.-Zugänge notwendig wären.

Weiterhin wurde die Epo-Konzentration im Urin unter Berücksichtigung verschiedener Entwicklungsstadien analysiert. Hierbei fand sich bei Kindern mit einem Gestationsalter unter 31 SSW nach i.v.-Applikation eine deutlich höhere Epo-Konzentration im Urin als bei Kindern mit einem Gestationsalter über 31 SSW (Abb. 12). Sowohl die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) der Nieren als auch der renale Blutfluss und die Fähigkeit, den Urin zu konzentrieren, sind bei Frühgeborenen noch eingeschränkt. Mit zunehmender Reife nimmt die GFR der Nieren zu (Miall 1999, Fanaroff 2002, Vieux 2010). Der genaue Exkretionsmechanismus von rEpo über die Niere ist bisher nicht geklärt. Möglicherweise lassen sich die höheren Epo-Konzentrationen im Urin von Kindern mit einem Gestationsalter < 31 SSW auf eine erhöhte Durchlässigkeit des Filtrationsapparates oder eine verminderte Rückresorption durch das noch unvollständig ausgereifte Tubulussystem der unreifen Nieren zurückführen.

In den drei Cochrane-Metaanalysen zur frühen vs späten rEpo-Behandlung von Frühgeborenen (Aher 2006, Ohlsson 2006), in denen die Reduktion des totalen Transfusionsvolumens sowie der Anzahl an Transfusionen durch früh („early“, Beginn < 7 Tage nach der Geburt) bzw. spät („late“) appliziertes rEpo bei Frühgeborenen verglichen wurden, bleibt die Frage nach dem effektivsten Applikationsweg offen. Dies mag unter anderem daran liegen, dass in den berücksichtigten Studien rEpo auf unterschiedliche Art und Weise appliziert wurde. In einigen Studien wurde rEpo zunächst i.v. und erst im Alter von einigen Tagen oder wenigen Wochen s.c. appliziert. Andere wählten nur die i.v.- bzw. nur die s.c.-Applikation. Da es nur eine Studie gibt, in der rEpo ausschließlich i.v. appliziert wurde, ist es nicht möglich, anhand einer Metaanalyse die effektivere Applikationsart zu ermitteln. In dieser Studie, in der rEpo ab dem ersten Lebenstag i.v. (200 U/kg/d) an VLBW Frühgeborene verabreicht wurde, ergab sich eine signifikante Reduktion des Transfusionsvolumens durch die rEpo-Behandlung (Ohls 1995).

Neben der Effektivität wird in der Cochrane-Analyse auch die Sicherheit der rEpo-Behandlung

diskutiert. Die Autoren weisen darauf hin, dass Kinder, die innerhalb der ersten 7 Lebenstage mit rEpo behandelt wurden, signifikant häufiger an einer ROP Stadium ≥ 3 erkrankten als Patienten der Kontrollgruppen (Ohlsson 2006). Der *EpoR* ist auch auf den Endothelzellen der Retina exprimiert und dort für die Angiogenese bedeutsam (Manzoni 2005). Hinsichtlich des Pathomechanismus zur Entstehung der ROP geht man derzeit von einer Entwicklung der ROP in zwei Phasen aus. In der ersten Phase, direkt nach der Geburt, ist die noch unreife Retina der Frühgeborenen einer sauerstoffreicheren Umgebung ausgesetzt. Die frühzeitige Exposition gegenüber Sauerstoff führt zu einer Reduktion von Wachstumsfaktoren, wie z.B. *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), IGF-1 und Epo, was zu einer Inhibition der Gefäßknospung der Retina führt. Entwickelt sich nun die Retina weiter, kommt es bei einem gestörten Blutfluss und einer mangelnden Sauerstoffversorgung zur relativen Hypoxie. Nun werden die Wachstumsfaktoren heraufreguliert, sodass die Gefäße der Retina abnormal proliferieren (Phase 2 der ROP) (Slusarski 2009).

In einer retrospektiven Analyse zeigten Brown *et al.*, dass das relative Risiko für die Entwicklung einer ROP bei Frühgeborenen mit einem Gestationsalter < 30 SSW und einem Geburtsgewicht < 1.500 g durch eine hohe kumulative Menge von rEpo (500 – 550 U/kg/Woche in den ersten 6 Lebenswochen) signifikant steigt. Die Art der Applikation (s.c. oder i.v.) des rEpo wurde in der Studie allerdings nicht im Detail berücksichtigt. Zusätzlich wurde ein erhöhtes Risiko für die Progression einer ROP durch Transfusionen beobachtet. Eventuell kommt es durch die Transfusion von adultem Hämoglobin, das eine geringere Affinität zu Sauerstoff besitzt als das fetale Hämoglobin, zu einem höheren Sauerstoffangebot in der Retina (Brown 2006). Es existiert jedoch in dieser retrospektiven Studie, die Patienten lediglich aus einem Zentrum einschloss, keine Kontrollgruppe ohne rEpo-Applikation, sodass die Daten nur eingeschränkt aussagekräftig sind. Im Gegensatz hierzu fanden Schneider *et al.* in einer Fall-Kontroll-Studie keinen Unterschied in der Entwicklung einer ROP bei Frühgeborenen mit vs ohne rEpo-Behandlung. Frühgeborene der rEpo-Gruppe (400 U/kg s.c. 3 x/Woche bis zu einem Gewicht von 1.500 g) erhielten während der ersten 14 Lebenstage signifikant weniger Transfusionen als Kinder der Kontrollgruppe (Schneider 2008).

Slusarski *et al.* wiesen in einem ROP-Modell an neugeborenen Ratten nach, dass rEpo die Blut-Augen-Schranke überwindet. Bei sehr hohen Dosierungen (30.000 U/kg i.p.) akkumuliert rEpo im Auge der Tiere, bei geringeren Dosierungen (5.000 U/kg i.p.), die beispielsweise in tierexperimentellen Studien zur Neuroprotektion angewandt wurden, jedoch nicht. Es kommt demnach trotz des bei i.p.-Applikation moderaten Anstiegs von rEpo im Plasma und der niedrigeren Spitzenspiegel als bei i.v.-Applikation (Abb. 2) zu einer Akkumulation des rEpo im

Gewebe bei hohen Dosierungen. Eine Gruppe der Ratten wurde 14 Tage in Raumluft gehalten, die andere Gruppe wurde in einer Kammer mit zyklischer Änderung der Sauerstoffversorgung gehalten. Dort waren die Tiere abwechselnd für jeweils 24 Stunden Hyperoxie (50 % O₂) und Hypoxie (10 % O₂) ausgesetzt, um eine ROP zu induzieren. Hierbei ergab sich, dass die tägliche Applikation von 5.000 U rEpo/kg i.p. in den ersten 3 Lebenstagen weder akut noch im Verlauf die Neovaskularisation der Retina verändert. Wurden 3 x 30.000 U/kg i.p. verabreicht, so war bei den Ratten, die wechselnd einer Hyperoxie oder Hypoxie exponiert waren, eine pathologische Entwicklung der Retinagefäße erkennbar. Dies war jedoch bei den in Raumluft gehaltenen Ratten nicht der Fall, was vermuten lässt, dass rEpo allein nicht für die Entstehung der ROP verantwortlich ist (Slusarski 2009). Die für eine Neuroprotektion tierexperimentell effiziente Dosierung (5.000 U/kg) in den ersten Lebenstagen ist demnach im Rattenmodell nicht mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung einer ROP assoziiert. Keine dieser experimentellen Studien verglich unterschiedliche Applikationsarten des rEpo.

Tierexperimentelle und klinische Studien weisen auf einen rapiden Anstieg der Epo-Konzentration im Serum nach i.v.-, jedoch nicht nach s.c.-Gabe hin (Juul 2004, Xenocostas 2005). Bisher wurde noch nicht gezielt untersucht, ob die Inzidenz der ROP bei i.v. appliziertem rEpo höher ist als bei s.c.-Applikation. Der rapide Anstieg der Epo-Konzentration im Urin nach i.v.-Applikation könnte rasch ansteigende Epo-Konzentrationen im Plasma unserer Patienten widerspiegeln (Abb. 9). Es werden tierexperimentelle Studien notwendig sein, um Zusammenhänge zwischen der Applikationsart und der ROP nachzuweisen oder auszuschließen. Dabei sollte auch untersucht werden, ob die *EpoR*-Expression in der Retina unter Hypoxie hochreguliert wird, wie es bereits vom ZNS und der Niere bekannt ist (Fandrey 2004, Spandou 2004). Erste Hinweise dazu gibt die Studie von Kase *et al.*, in der die Expression des EpoR-Protein in epiretinalen Membranen von Patienten mit und ohne diabetische Retinopathie anhand immunhistochemischer Methoden (Anti-Epo- und Anti-EpoR-Antikörper) untersucht wurde. Die Expression des EpoR-Protein in Membranen von Patienten mit diabetischer Retinopathie war deutlich stärker als bei der Vergleichsgruppe (Kase 2007). Auch Scheerer *et al.* konnten in einem Zellkulturmodell einen deutlichen Anstieg der *EpomRNA*-Expression während der frühen retinalen Entwicklung unter Anämie zeigen (Scheerer 2010).

Interessant ist die Frage nach Optionen für eine Optimierung der rEpo-Therapie bei Frühgeborenen. Aufgrund der Fallzahl und der praktizierten variablen Zeitpunkte einer Umstellung von der i.v.- auf eine s.c.-Applikation von rEpo in unserer Studie ist eine Analyse der Effektivität einer Applikationsform jedoch nicht möglich. Unter dem Gesichtspunkt der renalen Epo-Ausscheidung wäre die s.c.- der i.v.-Therapie aufgrund der geringeren Epo-

Ausscheidung im Urin vorzuziehen. Inwiefern sich jedoch die prozentuale renale Epo-Ausscheidung, die auch nach i.v.-Applikation weniger als 5 % betrug, auf den Erfolg der rEpo-Behandlung auswirkt, bleibt fraglich. Da nach s.c.-Applikation konstantere Epo-Konzentrationen im Plasma ohne häufige bzw. wiederholte Spitzenspiegel erreicht werden, ist anzunehmen, dass es sich im Kontext der Prävention der Frühgeborenenanämie um die pharmakologisch effektivere Applikationsart handelt.

4.3 Epo im Urin nach Applikation von 3 x 3.000 U rEpo/kg zur Neuroprotektion bei sehr unreifen Frühgeborenen

Bei steigender Dosis zeigt sich beim Erwachsenen und auch beim Frühgeborenen nach rEpo-Applikation eine verminderte Clearance und eine verlängerte Halbwertszeit (Juul 2008, Flaharty 1990). Die erhöhte Inzidenz einer ROP bereits bei niedrigen rEpo-Dosierungen zur Prävention und Therapie der Frühgeborenenanämie lässt hohe Dosierungen, wie sie im Rahmen der Neuroprotektion bei Frühgeborenen üblich sind, vor diesem Hintergrund zunächst bedenklich erscheinen. Bei der Anwendung von rEpo zur Neuroprotektion bei Erwachsenen zeigten sich in den letzten Jahren bisher unbekannte Nebenwirkungen. In einer Studie von Ehrenreich *et al.* erhielt nach ischämischem Insult ein Teil der Patienten zusätzlich zu rEpo (2 x 40.000 U innerhalb von 48 Stunden) bzw. zum Placebo eine Thrombolyse mittels rt-PA (*Recombinant Tissue Plasminogen Activator*). Es fand sich eine erhöhte Mortalität in der mit rEpo behandelten Gruppe (rt-PA und non-rt-PA zusammen) (10,8 vs 7,2 %). Insbesondere Patienten, die mit rEpo und rt-PA behandelt wurden, hatten im Gegensatz zu Patienten, welche ein Placebo und rt-PA erhielten, eine signifikant erhöhte Mortalität (12,2 % vs 5,4 %). In der Gesamtpopulation (rt-PA- und non-rt-PA-Gruppe) fand sich in der rEpo-Gruppe außerdem keine Verbesserung des neurologischen Auskommens oder der Infarkt-Größe nach 90 Tagen (Ehrenreich 2009). 2006 wurde eine randomisierte, kontrollierte Studie mit mehr als 1.400 rEpo-behandelten Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz gestoppt. Die eine Gruppe der Patienten wurde mit Epoetin- α (s.c.) auf einen Hb von 13,5 g/dl, die andere auf einen Hb von 11,3 g/dl eingestellt. Die Studie musste abgebrochen werden, da in der Gruppe mit dem höheren Ziel-Hb eine höhere Inzidenz von Myokardinfarkten, Schlaganfällen und Todesfällen ohne Zuwachs der Lebensqualität erkennbar war (Singh 2006). Weber *et al.* zeigen, dass die Kombination aus Hypoxie und hochdosierter rEpo-Gabe gefährlich sein könnte (Weber 2005). Eine geringfügige Hypoxie kann durch eine Präkonditionierung die Apoptoserate nach einer schweren Hypoxie verringern. Dieses Phänomen wird als ischämische Präkonditionierung bezeichnet (Ran 2005). Embryonale

kortikale Neurone von Ratten, die bei 21 % O₂ in Kultur gebracht wurden, wiesen eine vermehrte Überlebensfähigkeit nach Zugabe von rEpo (40 U/ml) auf. Bei Neuronen, die bei 2 % O₂ in Kultur gebracht wurden, nahm die Überlebensfähigkeit nach Zugabe von rEpo jedoch Dosis-abhängig ab (Weber 2005). Zusätzlich untersuchten Weber *et al.* den Effekt von ischämischer Präkonditionierung und rEpo an neonatalen Ratten. Tiere, die mit rEpo behandelt wurden und einer Hypoxie ausgesetzt waren, hatten eine deutlich erhöhte Anzahl degenerativer cerebraler Neurone als Kontrolltiere oder Tiere, die entweder Hypoxie oder rEpo exponiert waren (Weber 2005). Diese Studienergebnisse geben Anlass, die Sicherheit der hochdosierten rEpo-Therapie bei Frühgeborenen zu hinterfragen. Um ein mögliches Risiko der hochdosierten rEpo-Therapie bei Frühgeborenen abschätzen zu können, ist es nötig, spezielle pharmakokinetische Besonderheiten zu verstehen. Somit stellt sich die Frage nach einer Akkumulation von rEpo im Körper der Frühgeborenen bei höheren rEpo-Dosierungen. Einen ersten Hinweis für eine Akkumulation könnten die rEpo-Konzentrationen im Urin von Frühgeborenen nach der hochdosierten rEpo-Applikation liefern.

Im Rahmen einer doppelblinden, kontrollierten Studie zur Neuroprotektion durch rEpo bei Frühgeborenen sammelten wir deshalb Urinproben von 42 Kindern nach Applikation von hochdosiertem rEpo (3 x 3.000 U rEpo/kg i.v.) und von 33 Kindern nach Applikation von NaCl 0,9 %. Die Epo-Konzentrationen im Urin der Kontrollgruppe war im Median unter der Nachweisgrenze des ELISA (< 2,5 mU/ml; Range < 2,5 – 18,1 mU/ml) und nur in 17,4 % der Proben messbar. Dabei fanden sich signifikant höhere rEpo-Konzentrationen im Urin bei unreiferen Frühgeborenen (< 29+0 SSW; Median 7.000 mU/ml, Range 1.497 – 26.820 mU/ml) als bei reiferen Frühgeborenen (≥ 29+0 SSW; Median 2.633 mU/ml, Range 269 – 17.319 mU/ml). Erschwert durch die Sammelmethode mittels sterilen Röhrchen und Einmalhandschuhen konnten nur in 11 Fällen alle 6 angestrebten Urinproben im longitudinalen Verlauf asserviert werden. Es zeigten sich insgesamt keine Unterschiede in der Epo-Konzentration im Urin nach erster, zweiter und dritter rEpo-Gabe. Bei den 11 Kindern, bei denen die longitudinalen Einzelverläufe der Epo-Konzentrationen im Urin dokumentiert werden konnten, fand sich kein Hinweis für eine Akkumulation im Sinne von ansteigenden und anschließend stagnierenden rEpo-Konzentrationen im Urin nach mehrfacher hochdosierter rEpo-Applikation (Abb. 17). Dies ist bei einem Medikament, was vermutlich einer nicht-linearen Pharmakokinetik folgt, ein wichtiger Punkt. Für eine Evaluation der Akkumulation eines Medikaments wäre jedoch eine korrespondierende Serum-/Plasmaprobe zu analysieren.

Nach i.v.-Applikation von 3.000 U/kg rEpo im Rahmen der Neuroprotektion fanden sich in den ersten 8 Stunden Epo-Verluste von bis zu 23 % (Median 2,8 %) bei Frühgeborenen < 29 SSW und bis zu 9,4 % (Median 1,2 %) bei Frühgeborenen \geq 29 SSW. Dahingegen fanden sich bei Patienten, die mit 250 U rEpo/kg im Rahmen der Prävention und Therapie der Frühgeborenenanämie behandelt wurden maximale rEpo-Verluste von 4,5 % (Median 0,6 %) innerhalb der ersten 8 Stunden nach i.v.-Applikation. Hierbei muss jedoch auf die eingeschränkte Vergleichbarkeit der Daten der beiden Teilprojekte hingewiesen werden. Die Studienteilnehmer in der Neuroprotektionsstudie erhielten rEpo bereits in den ersten Stunden nach der Geburt, während die Frühgeborenen, die 250 U rEpo/kg zur Prävention und Behandlung der Frühgeborenenanämie erhielten bei Studieneintritt im Median bereits 11 (5 – 32) Tage alt waren. Vermutlich sind Verluste von im Median 2,8 % bzw. 1,2 % auch hier als gering einzuschätzen. Auch wenn die absolute Epo-Konzentration im Urin niedrig erscheint, sollte geklärt werden, ob eine eventuell geringere Bioverfügbarkeit die Effektivität des Medikaments in der Neuroprotektion bei unreiferen Frühgeborenen beeinflussen könnte.

Wie auch schon nach Applikation von 250 U/kg zeigen sich auch nach hochdosierter rEpo-Applikation höhere Epo-Konzentrationen im Urin bei unreiferen Frühgeborenen. Dies ist vermutlich auf eine entwicklungsabhängige Reifung des Filtrationsapparates zurückzuführen (Rudd 1983, Miall 1999). Demnach könnte die renale Epo-Exkretion bei reifen Neugeborenen deutlich geringer sein als bei unreiferen Kindern, sodass ein höherer Anteil des applizierten rEpo im Organismus gebunden werden bzw. wirken kann. Daten zur Entwicklung der Nierenfunktion beim Frühgeborenen sind limitiert. Rudd *et al.* und Miall *et al.* zeigten, dass die Kreatinin-Konzentration im Plasma mit steigendem Gestationsalter sinkt. Frühgeborene haben deutlich höhere Kreatinin-Spitzenpiegel im Plasma, die später abfallen als reifere Neugeborene (Rudd 1983, Miall 1999). Rudd *et al.* teilten die Frühgeborenen entsprechend der Kreatinin-Konzentration im Plasma in Gruppen von 25 bis 28 SSW und von 29 bis 32 SSW ein (Rudd 1983). Wilkins *et al.* zeigen einen Anstieg der GFR um die 30. SSW (Wilkins 1992). Aufgrund dessen konzipierten wir für die Auswertung der Epo-Konzentration im Urin nach Applikation von 250 U rEpo/kg im Rahmen der Behandlung bzw. Prävention der Frühgeborenenanämie nach Schwangerschaftsalter 3 Gruppen von 25+0 – 27+6 SSW, 28+0 – 30+6 SSW und 31+0 – 36+6 SSW. In der Neuroprotektionsstudie wurden nur Frühgeborene mit einem Gestationsalter von 25+6 – 31+6 SSW rekrutiert (Fauchère 2008). Um zwei etwa gleich große Gruppen zu erhalten, wurde eine Gruppe von 25+6 – 28+6 und die andere Gruppe von 29+0 – 31+6 SSW gewählt.

Bisher gibt es nur zwei klinische Studien, die die Sicherheit von hochdosiertem rEpo bei Frühgeborenen untersuchten. Juul *et al.* berichten über keine schwerwiegenden Zwischenfälle oder Nebenwirkungen nach Applikation von rEpo (3 x 500, 1.000 oder 2.500 U/kg innerhalb der ersten 48 Stunden nach der Geburt). Es gab im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Unterschiede im Blutdruck. Frühgeborene aus der Kontrollgruppe brauchten im Durchschnitt sogar mehr Unterstützung (Volumen, Katecholamine), um normotensiv zu bleiben, als Frühgeborene, die rEpo erhielten. PVL und IVH traten in der rEpo-Gruppe tendenziell seltener auf ($p = 0,06$). NEC und ROP traten in beiden Gruppen ähnlich häufig auf. Es gab jedoch signifikant weniger Kinder mit NEC in der rEpo-Gruppe, die operiert werden mussten ($p < 0,05$). Unter der rEpo-Therapie gab es keine Veränderungen in der Anzahl der Thrombozyten oder der Neutrophilen, auch die Leber- und Nierenfunktion waren nicht beeinträchtigt. Insgesamt starben in der Kontrollgruppe ($n = 30$) 5 Kinder (Gründe: 3 x IVH Grad 4, je einmal intestinale Perforation oder Lungenblutung) und in der rEpo-Gruppe ($n = 30$) 3 Kinder (Gründe: Sepsis, respiratorische Insuffizienz, intestinale Perforation zusammen mit einer IVH Grad 4). In den beiden Gruppen gab es keine Unterschiede im freien Eisen oder an Indikatoren für oxidativen Stress (totale antioxidative Kapazität im Plasma; Isoprostan im Urin) (Juul 2008). Fauchère *et al.* untersuchten bei Frühgeborenen ähnliche Parameter (NEC, ROP, IVH) nach der Applikation von 3 x 3.000 U rEpo/kg innerhalb der ersten 42 Stunden nach der Geburt. Auch hier gab es keinen Unterschied zwischen der Kontroll-Gruppe ($n = 15$) und der rEpo-Gruppe ($n = 30$) in Bezug auf die Inzidenz der ROP und der NEC. Auch die Thrombozyten, Leukozyten und der Hb waren in beiden Gruppen ähnlich. Auffällig ist in dieser Studie, dass in der rEpo-Gruppe 5 Frühgeborene starben (Gründe: 3 x IVH, 2 x Lungenemphysem), während in der Placebo-Gruppe kein Kind starb. Das Auftreten von IVH war in beiden Gruppen gleich verteilt. Schwere IVH (Grad 3 und 4) traten jedoch in der rEpo-Gruppe bei 4/30 Kindern auf, während in der Placebo-Gruppe keine schweren IVH auftraten (Fauchère 2008). Die 5 gestorbenen Kinder der rEpo-Gruppe, hatten ein Gestationsalter von < 26 SSW, bei einem der Kinder mit IVH war diese auch schon vor der ersten rEpo-Applikation vorhanden. Nach Einschätzung von Autoren und Safety Board ist ein Zusammenhang zwischen der rEpo-Therapie und dem Auftreten der Todesfälle unwahrscheinlich. Desweiteren wurde die rEpo-Gruppe mit historischen Kontroll-Gruppen verglichen, wobei kein Unterschied in der Mortalitätsrate feststellbar war. Sowohl die Inzidenz von IVH (Grad 3 und 4; 13 %) als auch die Inzidenz von Todesfällen aufgrund pulmonaler Insuffizienz (9 %) bei rEpo-behandelten Kindern mit sehr geringem Gestationsalter waren in dem Bereich, der auch in anderen internationalen Studien berichtet wird (11 – 25 % für schwere IVH und 34 % für Todesfälle aufgrund von pulmonaler Insuffizienz). Aus diesem Grund wurde

auch in dieser Studie die hochdosierte Therapie mit rEpo zur Neuroprotektion bei Frühgeborenen für sicher befunden. Eine weitere Studie untersuchte die Sicherheit und Auswirkung von hochdosiertem rEpo bei reifen Neugeborenen mit hypoxisch-ischämischer Enzephalopathie (2.500 U/kg s.c. an 5 aufeinander folgenden Tagen direkt nach der Geburt). In dieser Studie wurden keine Nebenwirkungen der hochdosierten rEpo-Therapie beobachtet. Im Gegenteil, neben dem besseren neurologischen Auskommen wurde ein Trend zu weniger Bluttransfusionen, seltener auftretender NEC sowie seltenerem Multiorganversagen beobachtet. Die Rate der Rehospitalisierungen in den ersten 6 Lebensmonaten war bei mit rEpo behandelten Kindern signifikant vermindert (Elmahdy 2010). Bisher gibt es nur eine Studie, die die Langzeitwirkung von rEpo bei Frühgeborenen über mehrere Jahre evaluiert hat. Neubauer *et al.* untersuchten in regelmäßigen Abständen 148 ehemalige Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht < 1.000 g bis zu einem Alter von 10 bis 13 Jahren. Hierbei wurde ein besonderes Augenmerk auf die allgemeine Entwicklung und das neurologische Auskommen gelegt. In der Neonatalperiode mit rEpo (kumulative rEpo-Dosierungen von durchschnittlich nur 8.574 U/kg über 68 Tage zur Therapie bzw. Prävention der Frühgeborenenanämie) behandelte Kinder wurden mit Kindern ohne rEpo-Therapie verglichen. Hierbei wurden keine Effekte in Bezug auf Größe oder Gewicht gefunden. Kinder der rEpo-Gruppe erreichten jedoch signifikant bessere IQ-Werte und waren deutlich besser entwickelt (normale Entwicklung in der rEpo-Gruppe 55 % vs 39 % in der Kontrollgruppe). Starke Behinderungen waren in der rEpo-Gruppe deutlich weniger häufig erkennbar (9 %) als in der Kontrollgruppe (23 %). Die Unterschiede wurden besonders offensichtlich, wenn die Kinder mit IVH isoliert betrachtet wurden. Diese profitierten am meisten von der rEpo-Therapie und erreichten ähnlich hohe IQ-Werte wie Kinder ohne IVH. Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen „early“- und „late“-rEpo sowie bei unterschiedlich hohen kumulativen Dosierungen.

4.4 Ausblick

Speziell in der Neonatologie hat die Therapie mit rEpo in den letzten Jahren vermehrt Kritik erfahren. Momentan wird rEpo zur Therapie der Frühgeborenenanämie nur noch in einem Viertel der deutschen Level-1-Perinatalzentren angewendet. In unserer Klinik wird rEpo, nach eingehender Aufklärung der Eltern bei ausgewählten Patienten und recht uneinheitlich verabreicht. Es wurde hierbei auf die ausschließliche s.c.-Applikation umgestellt. Des Weiteren wird auf eine strenge Indikationsstellung für diagnostische Blutentnahmen geachtet, da darin

einer der wichtigsten Faktoren für die Entstehung der Frühgeborenenanämie liegt (Obladen 1995). Zusätzlich werden bei Bluttransfusionen sogenannte „Satellitenbeutel“ verwendet. Hierbei handelt es sich um Blut eines Spenders, das auf vier kleine Beutel aufgeteilt wird und portionsweise über einen Zeitraum von mehreren Tagen bzw. Wochen transfundiert werden kann. So kann die Spender-Exposition und damit das Risiko für Infektionen und Unverträglichkeiten vermindert werden. Während die rEpo-Therapie zur Behandlung und Prävention der Frühgeborenenanämie zunehmend aus den Augen verloren wird, so ist die Frage nach einer Therapie mit hochdosiertem rEpo zur Neuroprotektion bei Frühgeborenen aktueller denn je. Ob sie jedoch über die Anwendung in klinischen Studien hinausgehen wird, ist bisher unklar. Es bleibt zunächst abzuwarten, welche Ergebnisse die Langzeitauswertungen der beiden klinischen Studien zur hochdosierten Anwendung von rEpo bei Frühgeborenen im Rahmen der Neuroprotektion ergeben werden (Juul 2008, Fauchère 2008). Derzeit geplante und auch bereits begonnene Studien zur Neuroprotektion durch rEpo folgen sehr unterschiedlichen Konzepten bezüglich der Dosierung, des Zeitpunkts und der Dauer der rEpo-Therapie bei früh- und auch reifgeborenen Kindern. Eine dieser Studien ist an der China Medical University geplant und soll den neuroprotektiven Effekt und die Sicherheit von hoch dosiertem (3.000 U/kg i.v.) vs niedrig dosiertem (100 U/kg i.v.) rEpo bei Frühgeborenen < 32 SSW vergleichen (NCT00910234). Die neurologische Entwicklung soll hierbei im Alter von 24 Monaten und 5 Jahren untersucht werden. Eine weitere Studie aus New Mexico beschäftigt sich mit den neuroprotektiven Eigenschaften von rEpo im Vergleich zu Darbepoetin (NCT00334737). Es soll die neurologische Entwicklung 18 bis 22 Monate nach Applikation von 10 µg Darbepoetin/kg/Woche (s.c.) mit der Applikation von 400 U rEpo/kg 3-mal wöchentlich (s.c.) und Applikation eines Placebos für 10 Wochen bzw. bis korrigiert 35+0 SSW verglichen werden. In Californien werden bereits Neugeborene in eine Studie mit hochdosiertem rEpo nach Asphyxie aufgenommen (NCT00719407). Hier wird das rEpo an Lebenstag 1 – 11 mit 250/500/1.000 U/kg i.v. appliziert. Eine weitere Studie untersucht das neurologische Auskommen von Neugeborenen, die vor bzw. während einer Herz-Operation 500 U/kg rEpo bzw. NaCl 0,9 % zur Neuroprotektion erhalten (NCT00513240).

Um mehr Sicherheit im Umgang mit hochdosiertem rEpo bei Frühgeborenen und mehr Verständnis über die Pharmakokinetik von rEpo bei dieser sehr vulnerablen Patientengruppe zu erlangen, bietet es sich an, auch in zukünftigen klinischen Studien die Epo-Konzentrationen im Urin und, wenn möglich, auch im Plasma zu bestimmen.

Die aktuellen Daten aus der Neonatologie und aus den anderen Fachgebieten weisen darauf hin, dass viele bisher noch unverstandene Wirkmechanismen von rEpo, besonders in

Wechselwirkung mit anderen Medikamenten, im menschlichen Körper existieren. Um diese zu identifizieren, bedarf es weiterer Tierversuche und klinischer Studien. Es scheint voreilig, rEpo aufgrund einiger Rückschläge gänzlich aus der Therapie Frühgeborener, aber auch Erwachsener zu verbannen. Vielmehr sollte es das Ziel sein, anhand geeigneter klinischer Studien Patientengruppen, die von rEpo profitieren können, genauer zu definieren, um unerwünschte Nebenwirkungen zu minimieren und eine maximale Wirkung zu erzielen.

5 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Regelkreis der Erythropoiese.....	6
Abb. 2: Durchschnittliche Epo-Plasmakonzentration bei Erwachsenen nach intravenöser und subkutaner Applikation von 100 U rEpo/kg.....	20
Abb. 3: Epo-Konzentrationen im Plasma nach i.v.-Applikation von 500, 1.000 und 2.500 U rEpo/kg	21
Abb. 4: Klebebeutel zum Auffangen von Urin bei Neugeborenen und Säuglingen	26
Abb. 5: Aufbau einer Salivette®	27
Abb. 6: Schematische Darstellung der Sandwich-ELISA-Methode zur Bestimmung der Epo-Konzentration in den Untersuchungsproben.....	29
Abb. 7: Zeitpunkte der Probensammlung nach Applikation von 250 U rEpo/kg	32
Abb. 8: Zeitpunkte der Urinasservierung nach Applikation von 3 x 3.000 U rEpo/kg	33
Abb. 9: Epo-Konzentration im Urin Frühgeborener vor sowie 4 und 8 Stunden nach i.v.- bzw. s.c.- Applikation von 250 U Epoetin-β/kg Körpergewicht.....	37
Abb. 10: Epo-Konzentration im Urin Frühgeborener nach i.v.- bzw. s.c.-Applikation von 250 U Epoetin-β/kg unter Berücksichtigung des Gestationsalters	38
Abb. 11: Epo-Konzentration im Urin nach Applikation von 250 U rEpo/kg (i.v. und s.c.) von Kindern mit unterschiedlichem Gestationsalter (25+0 bis 27+6 SSW, 28+0 bis 30+6 SSW und 31+0 bis 36+6 SSW) in Relation zum Lebensstag nach Geburt.....	38
Abb. 12: Epo-Konzentration im Urin von Frühgeborenen zum Zeitpunkt von 4 und 8 Stunden nach i.v.-Applikation von 250 U Epoetin-β/kg.....	39
Abb. 13: Epo-Konzentration im Urin von Frühgeborenen 4 und 8 Stunden nach s.c.- Applikation von 250 U Epoetin-β/kg.....	39
Abb. 14: Longitudinaler Verlauf der Epo-Konzentration im Urin nach i.v.-Applikation von 250 U rEpo/kg bei Frühgeborenen A mit einem Gestationsalter von 25+0 bis 27+6 SSW und B mit einem Gestationsalter von 28+0 bis 30+6 SSW	40
Abb. 15: Epo-Konzentration im Urin nach Applikation von 3.000 U rEpo/kg bzw. NaCl 0,9 % in den ersten drei Tagen nach der Geburt	42
Abb. 16: Epo-Konzentration im Urin nach dreimaliger Applikation von 3.000 U rEpo/kg bei Frühgeborenen mit einem Gestationsalter < 29 SSW vs ≥ 29 SSW	43
Abb. 17: Longitudinaler Verlauf der Epo-Konzentration im Urin von 11 Frühgeborenen mit einem Gestationsalter < 29 SSW (A) und ≥ 29 SSW (B) nach dreimaliger Applikation von 3.000 U rEpo/kg.....	44
Abb. 18: Epo-Konzentration im Urin von Frühgeborenen mit einem Gestationsalter < 29 SSW und ≥ 29 SSW nach erster i.v.-Applikation von 3.000 U rEpo/kg vs 250 U rEpo/kg	45

6 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Gewebe, in dem der EpoR nachgewiesen wurde, unter Angabe der jeweiligen Nachweismethode	7
Tab. 2: Zusammenstellung wesentlicher Ergebnisse der 3 Cochrane Analysen bezüglich Sicherheit und Effektivität von rEpo	11
Tab. 3: Tierversimentelle Studien zur Neuroprotektion durch rEpo im sich entwickelnden Gehirn nach Hypoxie/Ischämie.....	16
Tab. 4: Klinische Studien zur neuroprotektiven Wirkung von rEpo bei neurologischen Erkrankungen des Erwachsenen.....	17
Tab. 5: Klinische Untersuchungen zur Wirkung von rEpo auf das sich entwickelnde Gehirn des Früh- oder Neugeborenen.....	18
Tab. 6: Verdünnungsreihe zur Untersuchung der Epo-Konzentration vor und nach Zentrifugation bei Verwendung von Watterollen in der Salivette®	28
Tab. 7: Demographische Daten der mit rEpo zur Therapie bzw. Prävention der Frühgeborenenanämie behandelten Patienten	31
Tab. 8: Enterale Eisensubstitution während der rEpo-Behandlung bei Frühgeborenen.....	31
Tab. 9: Klinische Daten der Untersuchungspopulation in der Neuroprotektionsstudie (Plazebo- und rEpo-Gruppe)	34
Tab. 10: Gestationsalter der Patienten und Anzahl der Proben, die im Rahmen der Studie zur Neuroprotektion analysiert wurden.....	34
Tab. 11: Epo-Konzentration im Urin Frühgeborener vor und nach Aufnahme über eine Slipeinlage	35
Tab. 12: Epo-Konzentration vor sowie 4 und 8 Stunden nach Applikation von 250 U rEpo/kg.....	36
Tab. 13: Epo-Konzentrationen im Urin nach der 1., 2. und 3. Gabe von 3.000 U rEpo/kg unter Berücksichtigung des Entwicklungsstadiums.....	41

7 Abkürzungsverzeichnis

BFU-E	<i>Erythroid Burst Forming Unit</i>
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
CERA	<i>Continous Erythropoietin Receptor Activator</i>
CFU-E	<i>Erythroid Colony Forming Unit</i>
dpm	<i>desintegrations per minute</i>
ELBW	<i>Extremely Low Birth Weight</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EPO	Erythropoietin
EpoR	Erythropoietin-Rezeptor
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
Hb	Hämoglobin
HCV	Hepatitis-C-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
IGF	<i>Insuline-like Growth Factor</i>
IHC	Immunhistochemie
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IVH	intraventrikuläre Hämorrhagie
JAK-2	Janus-Kinase 2
KI	Konfidenzintervall
LT	Lebenstag
mRNA	<i>messenger-Ribonukleinsäure</i>
MS	Multiple Sklerose
NEC	Nekrotisierende Enterokolitis
p	Postnataltag
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
p.c.	<i>post conceptionem</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PVL	periventrikuläre Leukomalazie

rEpo	rekombinantes Erythropoietin
ROP	<i>Retinopathy of Prematurity</i>
RR	relatives Risiko
rt-PA	<i>Recombinant Tissue Plasminogen Activator</i>
s.c.	subkutan
SEP	<i>Synthetic Erythropoiesis Protein</i>
SSW	Schwangerschaftswoche
STAT-5	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5</i>
U	<i>Unit</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VLBW	<i>Very Low Birth Weight</i>
WB	<i>Western Blot</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

8 Referenzen

- Aher S, Ohlsson A. Late erythropoietin for preventing red blood cell transfusion in preterm and/or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;3:CD004868.
- Aher SM, Ohlsson A. Early versus late erythropoietin for preventing red blood cell transfusion in preterm and/or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;3:CD004865.
- Anagnostou A, Liu Z, Steiner M et al. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:3974-8.
- Aydin A, Genç K, Akhisaroglu M, Yorukoglu K, Gokmen N, Gonullu E. Erythropoietin exerts neuroprotective effect in neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Dev* 2003;25:494-8.
- Bierer R, Peceny MC, Hartenberger CH, Ohls RK. Erythropoietin concentrations and neurodevelopmental outcome in preterm infants. *Pediatrics* 2006;118:e635-40.
- Bishara N, Ohls RK. Current controversies in the management of the anemia of prematurity. *Semin Perinatol* 2009;33:29-34.
- Brines M, Cerami A. Discovering erythropoietin's extra-hematopoietic functions: biology and clinical promise. *Kidney Int* 2006;70:246-50.
- Brines ML, Ghezzi P, Keenan S et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:10526-31.
- Brown MS, Barón AE, France EK, Hamman RF. Association between higher cumulative doses of recombinant erythropoietin and risk for retinopathy of prematurity. *J AAPOS* 2006;10:143-9.
- Brown MS, Eichorst D, Lala-Black B, Gonzalez R. Higher cumulative doses of erythropoietin and developmental outcomes in preterm infants. *Pediatrics* 2009;124:e681-7.
- Brown MS, Jones MA, Ohls RK, Christensen RD. Single-dose pharmacokinetics of recombinant human erythropoietin in preterm infants after intravenous and subcutaneous administration. *J Pediatr* 1993;122:655-7.
- Brown MS, Phibbs RH, Garcia JF, Dallman PR. Postnatal changes in erythropoietin levels in untransfused premature infants. *J Pediatr* 1983;103:612-7.
- Bucher HU, Killer C, Ochsner Y, Vaihinger S, Fauchère JC. Growth, developmental milestones and health problems in the first 2 years in very preterm infants compared with term infants: a population based study. *Eur J Pediatr* 2002;161:151-6.
- Bunn HF. New agents that stimulate erythropoiesis. *Blood* 2007;109:868-73.
- Bührer C, Obladen M, Maier R, Müller C. Urinary losses of recombinant erythropoietin in preterm infants. *J Pediatr* 2003;142:452-3.
- Chang YS, Mu D, Wendland M et al. Erythropoietin improves functional and histological outcome in neonatal stroke. *Pediatr Res* 2005;58:106-11.
- Chikuma M, Masuda S, Kobayashi T, Nagao M, Sasaki R. Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney, brain, and uterus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;279:E1242-8.

- Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Angiogenesis and plasticity: role of erythropoietin in vascular systems. *J Hematother Stem Cell Res* 2002;11:863-71.
- Dallman PR. Anemia of prematurity. *Annu Rev Med* 1981;32:143-60.
- Dame C, Bartmann P, Wolber E, Fahnenstich H, Hofmann D, Fandrey J. Erythropoietin gene expression in different areas of the developing human central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 2000;125:69-74.
- Dame C, Fahnenstich H. Don't give up on erythropoietin as a neuroprotective agent. *Pediatrics* 2005;116:521-2.
- Dame C, Fahnenstich H, Freitag P et al. Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue. *Blood* 1998;92:3218-25.
- Dame C, Juul SE, Christensen RD. The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential. *Biol Neonate* 2001;79:228-35.
- Demers EJ, McPherson RJ, Juul SE. Erythropoietin protects dopaminergic neurons and improves neurobehavioral outcomes in juvenile rats after neonatal hypoxia-ischemia. *Pediatr Res* 2005;58:297-301.
- Digicaylioglu M, Bichet S, Marti HH et al. Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:3717-20.
- Digicaylioglu M, Garden G, Timberlake S, Fletcher L, Lipton SA. Acute neuroprotective synergy of erythropoietin and insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:9855-60.
- Ebert BL, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene. *Blood* 1999;94:1864-77.
- Eckardt KU, Ratcliffe PJ, Tan CC, Bauer C, Kurtz A. Age-dependent expression of the erythropoietin gene in rat liver and kidneys. *J Clin Invest* 1992;89:753-60.
- Egrie JC, Strickland TW, Lane J et al. Characterization and biological effects of recombinant human erythropoietin. *Immunobiology* 1986;172:213-24.
- Ehrenreich H, Bartels C, Sargin D, Stawicki S, Krampe H. Recombinant human erythropoietin in the treatment of human brain disease: focus on cognition. *J Ren Nutr* 2008;18:146-53.
- Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 2002;8:495-505.
- Ehrenreich H, Hinze-Selch D, Stawicki S et al. Improvement of cognitive functions in chronic schizophrenic patients by recombinant human erythropoietin. *Mol Psychiatry* 2007;12:206-20.
- Ehrenreich H, Weissenborn K, Prange H et al. Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. *Stroke* 2009;40:e647-56.
- Elliott S, Busse L, Bass MB et al. Anti-Epo receptor antibodies do not predict Epo receptor expression. *Blood* 2006;107:1892-5.
- Elmahdy H, El-Mashad AR, El-Bahrawy H et al. Human recombinant erythropoietin in asphyxia neonatorum: pilot trial. *Pediatrics* 2010;125:e1135-42.
- Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR, Browne JK, Adamson JW. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial. *N Engl J Med* 1987;316:73-8.

- Fairchild Benyo D, Conrad KP Expression of the erythropoietin receptor by trophoblast cells in the human placenta. *Biol Reprod* 1999;60:861-70.
- Fanaroff A, Martin R. Neonatal-Perinatal Medicine: Diseases of the Fetus and Infant in Mosby Verlag 2001, p. 1519.
- Fandrey J .Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;286:R977-88.
- Fauchère JC, Dame C, Vonthein R et al. An approach to using recombinant erythropoietin for neuroprotection in very preterm infants. *Pediatrics* 2008;122:375-82.
- Fenjves ES, Ochoa MS, Cabrera O et al. Human, nonhuman primate, and rat pancreatic islets express erythropoietin receptors. *Transplantation* 2003;75:1356-60.
- Finch CA. Erythropoiesis, erythropoietin, and iron. *Blood* 1982;60:1241-6.
- Fletcher L, Kohli S, Sprague SM et al. Intranasal delivery of erythropoietin plus insulin-like growth factor-I for acute neuroprotection in stroke. Laboratory investigation. *J Neurosurg* 2009;111:164-70.
- Fraser JK, Lin FK, Berridge MV. Expression of high affinity receptors for erythropoietin on human bone marrow cells and on the human erythroleukemic cell line, HEL. *Exp Hematol* 1988;16:836-42.
- Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet* 2005;365:663-70.
- Guignard JP, John EG. Renal function in the tiny, premature infant. *Clin Perinatol* 1986;13:377-401.
- Haiden N, Cardona F, Schwindt J et al. Changes in thrombopoiesis and platelet reactivity in extremely low birth weight infants undergoing erythropoietin therapy for treatment of anaemia of prematurity. *Thromb Haemost* 2005;93:118-23.
- Halvorsen S, Finne PH. Erythropoietin production in the human fetus and newborn. *Ann N Y Acad Sci* 1968;149:576-7.
- Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 1985;313:806-10.
- Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev* 1992;72:449-89.
- Jelkmann W. The enigma of the metabolic fate of circulating erythropoietin (Epo) in view of the pharmacokinetics of the recombinant drugs rhEpo and NESP. *Eur J Haematol* 2002;69:265-74.
- Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med* 2004;43:649-59.
- Jelkmann W. Erythropoiesis stimulating agents and techniques: a challenge for doping analysts. *Curr Med Chem* 2009;16:1236-47.
- Jensen JD, Jensen LW, Madsen JK, Poulsen L. The metabolism of erythropoietin in liver cirrhosis patients compared with healthy volunteers. *Eur J Haematol* 1995;54:111-6.
- Juul SE, Anderson DK, Li Y, Christensen RD. Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr Res* 1998;43:40-9.

- Juul SE, Felderhoff-Mueser U. Epo and other hematopoietic factors. *Semin Fetal Neonatal Med* 2007;12:250-8.
- Juul SE, McPherson RJ, Bauer LA, Ledbetter KJ, Gleason CA, Mayock DE. A phase I/II trial of high-dose erythropoietin in extremely low birth weight infants: pharmacokinetics and safety. *Pediatrics* 2008;122:383-91.
- Juul SE, McPherson RJ, Farrell FX, Jolliffe L, Ness DJ, Gleason CA. Erythropoietin concentrations in cerebrospinal fluid of nonhuman primates and fetal sheep following high-dose recombinant erythropoietin. *Biol Neonate* 2004;85:138-44.
- Juul SE, Stallings SA, Christensen RD. Erythropoietin in the cerebrospinal fluid of neonates who sustained CNS injury. *Pediatr Res* 1999;46:543-7.
- Juul SE, Yachnis AT, Rojiani AM, Christensen RD. Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain. *Pediatr Dev Pathol* 1999;2:148-58.
- Kampf D, Kahl A, Passlick J et al. Single-dose kinetics of recombinant human erythropoietin after intravenous, subcutaneous and intraperitoneal administration. Preliminary results. *Contrib Nephrol* 1989;76:106-10.
- Kellert BA, McPherson RJ, Juul SE. A comparison of high-dose recombinant erythropoietin treatment regimens in brain-injured neonatal rats. *Pediatr Res* 2007;61:451-5.
- Knabe W, Knerlich F, Washausen S et al. Expression patterns of erythropoietin and its receptor in the developing midbrain. *Anat Embryol (Berl)* 2004;207:503-12.
- Koshimura K, Murakami Y, Sohmiya M, Tanaka J, Kato Y. Effects of erythropoietin on neuronal activity. *J Neurochem* 1999;72:2565-72.
- Koury MJ, Bondurant MC. The molecular mechanism of erythropoietin action. *Eur J Biochem* 1992;210:649-63.
- Krishnan R, Shankaran S, Krishnan M, Kauffman RE, Kumar P, Lucena J. Pharmacokinetics of erythropoietin following single-dose subcutaneous administration in preterm infants. *Biol Neonate* 1996;70:135-40.
- Kumral A, Baskin H, Gokmen N et al. Selective inhibition of nitric oxide in hypoxic-ischemic brain model in newborn rats: is it an explanation for the protective role of erythropoietin? *Biol Neonate* 2004;85:51-4.
- Kumral A, Ozer E, Yilmaz O et al. **Neuroprotective effect of erythropoietin on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats.** *Biol Neonate* 2003;83:224-8.
- Kumral A, Uysal N, Tugyan K et al. Erythropoietin improves long-term spatial memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Behav Brain Res* 2004;153:77-86.
- Lacombe C, Mayeux P. Biology of erythropoietin. *Haematologica* 1998;83:724-32.
- Landschulz KT, Noyes AN, Rogers O, Boyer SH. Erythropoietin receptors on murine erythroid colony-forming units: natural history. *Blood* 1989;73:1476-86.
- Li Y, Juul SE, Morris-Wiman JA, Calhoun DA, Christensen RD. Erythropoietin receptors are expressed in the central nervous system of mid-trimester human fetuses. *Pediatr Res* 1996;40:376-80.
- Lin JC, Strauss RG, Kulhavy Jc et al. Phlebotomy overdraw in the neonatal intensive care nursery. *Pediatrics* 2000;106:E19.

- Lin FK, Suggs S, Lin CH et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:7580-4.
- Liu ZY, Chin K, Noguchi CT. Tissue specific expression of human erythropoietin receptor in transgenic mice. *Dev Biol* 1994;166:159-69.
- Liu C, Shen K, Liu Z, Noguchi CT. Regulated human erythropoietin receptor expression in mouse brain. *J Biol Chem* 1997;272:32395-400.
- Macdougall IC, Gray SJ, Elston O et al. Pharmacokinetics of novel erythropoiesis stimulating protein compared with epoetin alfa in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:2392-5.
- 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;136:220-4.
- Marti HH, Gassmann M, Wenger RH et al. Detection of erythropoietin in human liquor: intrinsic erythropoietin production in the brain. *Kidney Int* 1997;51:416-8.
- Marti HH, Wenger RH, Rivas LA et al. Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci* 1996;8:666-76.
- Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R. A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem* 1994;269:19488-93.
- Miall LS, Henderson MJ, Turner AJ et al. Plasma creatinine rises dramatically in the first 48 hours of life in preterm infants. *Pediatrics* 1999 Dec;104:e76.
- Maxwell PH, Ferguson DJ, Nicholls LG et al. Sites of erythropoietin production. *Kidney Int.* 1997;51:393-401.
- McPherson RJ, Demers EJ, Juul SE. Safety of high-dose recombinant erythropoietin in a neonatal rat model. *Neonatology* 2007;91:36-43.
- Meadow W, Lee G, Lin K, Lantos J. Changes in mortality for extremely low birth weight infants in the 1990s: implications for treatment decisions and resource use. *Pediatrics* 2004;113:1223-9.
- Meyer MP, Sharma E, Carsons M. Recombinant erythropoietin and blood transfusion in selected preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88:F41-5.
- Mioni R, Gottardello F, Bordon P, Montini G, Foresta C. Evidence for specific binding and stimulatory effects of recombinant human erythropoietin on isolated adult rat Leydig cells. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1992;127:459-65.
- Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* 1997;76:105-16.
- Muntau A: Hämatologie, in Urban und Fischer 2007, Intensivkurs Pädiatrie, München, p. 219.
- Neubauer AP, Voss W, Wachtendorf M, Jungmann T. Erythropoietin improves neurodevelopmental outcome of extremely preterm infants. *Ann Neurol* 2010;67:657-66.
- Neumayer HH, Brockmöller J, Fritschka E, Roots I, Scigalla P, Wattenberg M. Pharmacokinetics of recombinant human erythropoietin after SC administration and in long-term IV treatment in patients on maintenance hemodialysis. *Contrib Nephrol*

- 1989;76:131-41.
- Nexø E, Christensen NC, Olesen H. Volume of blood removed for analytical purposes during hospitalization of low-birthweight infants. *Clin Chem* 1981;27:759-61.
- Obara N, Suzuki N, Kim K, Nagasawa T, Imagawa S, Yamamoto M. Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood* 2008;111:5223-32.
- Obladen M, Sachsenweger M, Stahnke M. Blood sampling in very low birth weight infants receiving different levels of intensive care. *Eur J Pediatr* 1988;147:399-404.
- Obladen M, Maier R, Segerer H et al. Efficacy and safety of recombinant human erythropoietin to prevent the anaemias of prematurity. European Randomized Multicenter Trial. *Contrib Nephrol* 1991;88:314-26.
- Obladen M, Maier RF. Recombinant erythropoietin for prevention of anemia in preterm infants. *J Perinat Med* 1995;23:119-26.
- Obladen M, Maier RF. Hämatologische Probleme, in Springer 2006, Neugeborenenintensivmedizin, Heidelberg, p. 459.
- Ohls RK. The use of erythropoietin in neonates. *Clin Perinatol* 2000;27:681-96.
- Ohls RK, Ehrenkranz RA, Wright LL et al. Effects of early erythropoietin therapy on the transfusion requirements of preterm infants below 1250 grams birth weight: a multicenter, randomized, controlled trial. *Pediatrics* 2001;108:934-42.
- Ohls RK, Ehrenkranz RA, Das A et al. Neurodevelopmental outcome and growth at 18 to 22 months' corrected age in extremely low birth weight infants treated with early erythropoietin and iron. *Pediatrics* 2004;114:1287-91.
- 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.
- Pfeffer MA, Burdmann EA, Chen CY et al. A trial of darbepoetin alfa in type 2 diabetes and chronic kidney disease. *N Engl J Med* 2009;361:2019-32.
- Poli G, Parola M. Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Radic Biol Med* 1997;22:287-305.
- Ran R, Xu H, Lu A, Bernaudin M, Sharp FR. Hypoxia preconditioning in the brain. *Dev Neurosci* 2005;27:87-92.
- Reddy MK, Vasir JK, Hegde GV, Joshi SS, Labhasetwar V. Erythropoietin induces excessive neointima formation: a study in a rat carotid artery model of vascular injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2007;12:237-47.
- Robles R, Palomino N, Robles A. Oxidative stress in the neonate. *Early Hum Dev* 2001;65 Suppl:S75-81.
- Romagnoli C, Zecca E, Gallini F, Girlando P, Zuppa AA. Do recombinant human erythropoietin and iron supplementation increase the risk of retinopathy of prematurity? *Eur J Pediatr* 2000;159:627-8.
- Rossert J, Casadevall N, Eckardt KU. Anti-erythropoietin antibodies and pure red cell aplasia. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:398-406.
- Rudd PT, Hughes EA, Placzek MM, Hodes DT. Reference ranges for plasma creatinine during the first month of life. *Arch Dis Child* 1983;58:212-5.
- Sawyer ST, Krantz SB, Sawada K. Receptors for erythropoietin in mouse and human erythroid

- cells and placenta. *Blood* 1989;74:103-9.
- Scheerer N, Dünker N, Imagawa S, Yamamoto M, Suzuki N, Fandrey J. The anemia of the newborn induces erythropoietin expression in the developing mouse retina. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010;299:R111-8.
- Schmeding M, Neumann UP, Boas-Knoop S, Spinelli A, Neuhaus P. Erythropoietin reduces ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Eur Surg Res* 2007;39:189-97.
- Schneider JK, Gardner DK, Cordero L. Use of recombinant human erythropoietin and risk of severe retinopathy in extremely low-birth-weight infants. *Pharmacotherapy* 2008;28:1335-40.
- Schwartzberg S, Ben-Shoshan J, Keren G, George J. The role of erythropoietin in myocardial protection: potential mechanisms and applications. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2006;4:41-50.
- Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz R et al. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *N Engl J Med* 2005;353:1574-84.
- Shannon KM, Keith JF 3rd, Mentzer WC et al. Recombinant human erythropoietin stimulates erythropoiesis and reduces erythrocyte transfusions in very low birth weight preterm infants. *Pediatrics* 1995;95:1-8.
- Shimosaka A. Pharmacokinetics and application of erythropoietin therapy: overview of epoetin alfa studies in Japan. *Ann N Y Acad Sci* 1994;718:111-22.
- Singh AK, Szczech L, Tang KL et al. Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease. *N Engl J Med* 2006;355:2085-98.
- Slusarski JD, McPherson RJ, Wallace GN, Juul SE. High-Dose Erythropoietin Does Not Exacerbate Retinopathy of Prematurity in Rats. *Pediatr Res* 2009;66:625-30.
- Smith WB, Dowell JA, Pratt RD. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of epoetin delta in two studies in healthy volunteers and two studies in patients with chronic kidney disease. *Clin Ther* 2007;29:1368-80.
- Soubasi V, Kremenopoulos G, Diamanti E, Tsantali C, Sarafidis K, Tsakiris D. Follow-up of very low birth weight infants after erythropoietin treatment to prevent anemia of prematurity. *J Pediatr* 1995;127:291-7.
- Soubasi V, Kremenopoulos G, Tsantali C, Savopoulou P, Mussafiris C, Dimitriou M. Use of erythropoietin and its effects on blood lactate and 2, 3-diphosphoglycerate in premature neonates. *Biol Neonate* 2000;78:281-7.
- Souillard A, Audran M, Bressolle F, Gareau R, Duvallet A, Chanal JL. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin in athletes. Blood sampling and doping control. *Br J Clin Pharmacol* 1996 Sep;42:355-64.
- Spandou E, Papoutsopoulou S, Soubasi V, Karkavelas G, Simeonidou C, Kremenopoulos G, Guiba-Tziampiri O. Hypoxia-ischemia affects erythropoietin and erythropoietin receptor expression pattern in the neonatal rat brain. *Brain Res* 2004;1021:167-72.
- Spandou E, Papadopoulou Z, Soubasi V et al. Erythropoietin prevents long-term sensorimotor deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Brain Res* 2005;1045:22-30.

- Statler PA, McPherson RJ, Bauer LA, Kellert BA, Juul SE. Pharmacokinetics of high-dose recombinant erythropoietin in plasma and brain of neonatal rats. *Pediatr Res* 2007;61:671-5.
- Stockman JA 3rd, Oski FA. Physiological anaemia of infancy and the anaemia of prematurity. *Clin Haematol* 1978;7:3-18.
- Stockman JA 3rd. Anemia of prematurity. Current concepts in the issue of when to transfuse. *Pediatr Clin North Am* 1986;33:111-28.
- Strauss RG. Current issues in neonatal transfusions. *Vox Sang* 1986;51:1-9.
- Strauss RG, Sacher RA, Blazina JF et al. Commentary on small-volume red cell transfusions for neonatal patients. *Transfusion* 1990;30:565-70.
- Sun Y, Calvert JW, Zhang JH. Neonatal hypoxia/ischemia is associated with decreased inflammatory mediators after erythropoietin administration. *Stroke* 2005;36:1672-8.
- Suzuki N, Ohneda O, Takahashi S et al. Erythroid-specific expression of the erythropoietin receptor rescued its null mutant mice from lethality. *Blood* 2002;100:2279-88.
- Tan CC, Eckardt KU, Ratcliffe PJ. Organ distribution of erythropoietin messenger RNA in normal and uremic rats. *Kidney Int* 1991;40:69-76.
- Tsai PT, Ohab JJ, Kertesz N et al. A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. *J Neurosci* 2006;26:1269-74.
- Tseng MY, Hutchinson PJ, Richards HK et al. Acute systemic erythropoietin therapy to reduce delayed ischemic deficits following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a Phase II randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Clinical article. *J Neurosurg* 2009;111:171-80.
- Vannucci RC, Perlman JM. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 1997;100:1004-14.
- Vieux R, Hascoet JM, Merdarius D, Fresson J, Guillemin F. Glomerular filtration rate reference values in very preterm infants. *Pediatrics* 2010 May;125:e1186-92.
- Vohr B, Ment LR. Intraventricular hemorrhage in the preterm infant. *Early Hum Dev* 1996;44:1-16.
- Vohr BR, Wright LL, Dusick AM et al. Center differences and outcomes of extremely low birth weight infants. *Pediatrics* 2004;113:781-9.
- Volpe JJ. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *Lancet Neurol* 2009;8:110-24.
- Wallach I, Zhang J, Hartmann A et al. Erythropoietin-receptor gene regulation in neuronal cells. *Pediatr Res* 2009;65:619-24.
- Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:4304-8.
- Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke* 2004;35:1732-7.
- Warwood TL, Ohls RK, Lambert DK, Leve EA, Veng-Pedersen P, Christensen RD. Urinary excretion of darbepoetin after intravenous vs subcutaneous administration to preterm neonates. *J Perinatol* 2006;26:636-9.

- Weber A, Dzierko M, Berns M et al. Neuronal damage after moderate hypoxia and erythropoietin. *Neurobiol Dis* 2005;20:594-600.
- Wei L, Han BH, Li Y, Keogh CL, Holtzman DM, Yu SP. Cell death mechanism and protective effect of erythropoietin after focal ischemia in the whisker-barrel cortex of neonatal rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;317:109-16.
- Westenfelder C, Biddle DL, Baranowski RL. Human, rat, and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors. *Kidney Int* 1999;55:808-20.
- Widness JA, Schmidt RL, Veng-Pedersen P, Modi NB, Sawyer ST. A sensitive and specific erythropoietin immunoprecipitation assay: application to pharmacokinetic studies. *J Lab Clin Med* 1992;119:285-94.
- Wilkins BH. Renal function in sick very low birthweight infants: 1. Glomerular filtration rate. *Arch Dis Child* 1992;67:1140-5.
- Winearls CG, Oliver DO, Pippard MJ, Reid C, Downing MR, Cotes PM. Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anaemia of patients maintained by chronic haemodialysis. *Lancet* 1986;2:1175-8.
- Winter S, Autry A, Boyle C, Yeargin-Allsopp M. Trends in the prevalence of cerebral palsy in a population-based study. *Pediatrics* 2002;110:1220-5.
- Wright GL, Hanlon P, Amin K, Steenbergen C, Murphy E, Arcasoy MO. Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 2004;18:1031-3.
- Wu H, Lee SH, Gao J, Liu X, Iruela-Arispe ML. Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development* 1999;126:3597-605.
- Xenocostas A, Cheung WK, Farrell F et al. The pharmacokinetics of erythropoietin in the cerebrospinal fluid after intravenous administration of recombinant human erythropoietin. *Eur J Clin Pharmacol* 2005;61:189-95.
- Yu X, Lin CS, Costantini F, Noguchi CT. The human erythropoietin receptor gene rescues erythropoiesis and developmental defects in the erythropoietin receptor null mouse. *Blood* 2001;98:475-7.
- Zanjani ED. Liver to kidney switch of erythropoietin formation. *Exp Hematol* 1980;8 Suppl 8:29-40.
- Zanjani ED, Ascensao JL, McGlave PB, Banisadre M, Ash RC. Studies on the liver to kidney switch of erythropoietin production. *J Clin Invest* 1981;67:1183-8.
- Zhu C, Kang W, Xu F et al. Erythropoietin improved neurologic outcomes in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 2009;124:e218-26.

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden in folgendem Originalartikel veröffentlicht:

Langer J., Obladen M., Dame C. Urinary loss of Erythropoietin after intravenous versus subcutaneous Epoetin-beta in preterm infants. J Pediatr 2008 May;152:728-30

Dame C.*, **Langer J.***, Koller B., Fauchère JC, Bucher HU. Urinary Erythropoietin Concentrations after Early Short-Term Infusion of High-Dose Recombinant Epo for Neuroprotection in Preterm Neonates. Neonatology 2012;102:172-177. Epub July 2012 (DOI: 10.1159/000339283) *authors contributed equally to the manuscript

Kongressbeiträge:

Langer, J., Obladen, M., Dame, C. Urinary loss of erythropoietin after intravenous versus subcutaneous application of Epoetin-beta in preterm infants. 18. European Students Conference, Berlin 2007.

Langer, J., Obladen, M., Dame, C. Renaler Verlust von Erythropoietin nach intravenöser vs. subcutaner Epoetin-beta Applikation bei Frühgeborenen. 23. Deutscher Kongress für Pränatalmedizin, Berlin 2007. Z Geburtsh Neonatol 2007; 211, PO 04.06.

Dame, C., **Langer, J.**, Fauchère, J., Koller, B., Bucher, H. Renale Erythropoietin-Ausscheidung nach hochdosierter Gabe von Epoetin-beta in einer Anwendungsstudie zur Neuroprotektion bei Frühgeborenen. 104. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin, München 2008. Monatsschr Kinderheilkd Vol. 156, Suppl. 1; P-10-33-76.

Langer, J., Schmidt AG., Bommer C., Proquitté H., Garten L., Bühler C. Seltene Ursache einer schweren Schluckstörung: Das Cri-du-Chat-Syndrom. 37. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin; Pfl.PO-5.

Danksagung

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Christof Dame, dem Betreuer dieser Arbeit, für die spannende Zeit bei der Entwicklung des Themas, der Planung sowie der Durchführung dieser Arbeit, sowie für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe für molekulare Neonatologie an der Charité - Universitätsmedizin Berlin. Insbesondere möchte ich mich für die enge Zusammenarbeit, die ausführliche Durchsicht und Diskussion dieser Arbeit und die Unterstützung meiner Person nicht nur im Labor, sondern auch im Arbeitsleben in der Klinik herzlichst bedanken.

Bei der gesamten Schwesternschaft der Stationen 62, 40i und 32i der Neonatologie der Charité am Campus Virchow-Klinikum möchte ich mich für die engagierte Unterstützung beim Sammeln der Berliner Urinproben bedanken. Auch bei den Schwestern der Klinik für Neonatologie des Züricher Universitätsspitals möchte ich mich für das Sammeln der vielen Urinproben bedanken. Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Brigitte Koller, die den Transport der Urinproben nach Berlin organisierte und zusätzlich als stete Ansprechpartnerin bei der Planung, Durchführung und bei allen anstehenden Fragen zur Verfügung stand. Bei Herrn Prof. Dr. Hans Bucher bedanke ich mich für die Möglichkeit der Sammlung der Urinproben im Rahmen der Neuroprotektionsstudie sowie für die konstruktive Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich der Arbeitsgruppe für molekulare Neonatologie für die herzliche Aufnahme, Einarbeitung und freundschaftliche Begleitung durch die Jahre bedanken.

Insbesondere Dr. Victoria Hoene und Hannes Sallmon, die die Arbeit Korrektur lasen, mit kritischen Anregungen bereicherten und im Labor zuverlässige Zuhörer und Ansprechpartner bei methodischen, inhaltlichen, aber auch allgemeinen Fragen und Problemen waren, möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Peter Martus aus dem Institut für Biometrie und medizinische Epidemiologie der Charité danke ich für die anfängliche statistische Beratung bei der Erarbeitung des Studiendesigns.

Ich danke Boris Metze aus der Klinik für Neonatologie der Charité, der mir bei Fragen zur statistischen Datenauswertung sowie bei Softwareproblemen mit Rat und Tat zur Seite stand.

Maren Lohse, Simon Wächter und Phillip Bleienheuft danke ich für das Korrekturlesen, die kritischen Anmerkungen und die lange Freundschaft. Jesko Hilbrecht danke ich dafür, dass er es

gewagt hat, sich als Fach-Externer mit dieser Arbeit auseinanderzusetzen sowie für die zahlreichen schönen Stunden gemeinsam. Lena Ellermann danke ich für ihre gestalterischen Tipps und die außerordentlich schönen gemeinsamen Treffen.

Mein größter Dank geht an meine Familie. Insbesondere Katrin Langer, Thomas Langer und Detlef Gross danke ich für die Unterstützung und den Halt, den sie mir geben sowie für das Vertrauen, das sie mir entgegenbringen. David Kilanowski danke ich für die geduldige und verständnisvolle Begleitung, für die steten aufmunternden Worte in schwierigen Situationen sowie für die wundervolle gemeinsame Zeit. Ihnen widme ich diese Arbeit.

Lebenslauf

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

Erklärung

„Ich, Juliane Langer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zur Erythropoietin-Konzentration im Urin Frühgeborener nach Applikation von rekombinantem Erythropoietin“ 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.“

Juli 2012

Unterschrift