

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie
Otto-Heubner-Centrum für Kinder- und Jugendmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

*Dynamische Anämiediagnostik
im Kindes- und Jugendalter*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von
Clara Petronia Blank
aus *Berlin*

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. G. Gaedicke
 2. Prof. Dr. med. H. Lode
 3. Priv.-Doz. Dr. med. H. Cario

Datum der Promotion: 03.06.2012

Zusammenfassung

Chronische Erkrankungen zählen nach Eisenmangel zu den häufigsten Ursachen einer Anämie im Kindes- und Jugendalter. Für eine Diagnostik und das Monitoring der Therapie zu Zeiten schnellen Wachstums liegen für diese Erkrankungen bisher keine oder nur wenige hämatologische Parameter sowie nur selten deren Referenzintervalle vor. Ziel dieser Arbeit war es, ein Referenzintervall für den löslichen Transferrinrezeptor (sTfR), den Ferritinindex (sTfR/log Ferritin), das Hämoglobinäquivalent der Retikulozyten (Ret-H_e) und das Nearly Δ Hämoglobin (ndHb) nach Alter und Geschlecht für gesunde Kinder und Jugendliche festzulegen und zu untersuchen, ob bei anämischen Patienten davon differierende Konzentrationen im Serum vorliegen. Ebenso sollte die klinische Effizienz dieser Parameter in der Diagnostik von Eisenmangelanämien sowie Anämien chronischer Erkrankungen und bei chronischer Nierenkrankheit bestimmt werden. Die Parameter wurden in Serumproben von 234 Kontrollpatienten sowie von 139 anämischen Patienten (80 chronisch entzündliche Erkrankungen, 22 chronische Nierenkrankheit, 37 Eisenmangel) mittels Fluoreszenzdurchflusszytometrie und Immunturbidimetrie bestimmt. Die Kontrollgruppe setzte sich aus hämatologisch gesunden Patienten aus der Rettungsstelle, der Adipositas- und Stoffwechselsprechstunde und Gesundheitskontrolluntersuchungen zusammen. Die Werte zeigten eine Normalverteilung, weshalb der Mittelwert mit Standardabweichung und Konfidenzintervall bestimmt wurde, sowie das Referenzintervall zwischen der 2,5. und 97,5. Perzentile als Vergleichswert mit der Studiengruppe herangezogen wurde.

Keiner der Parameter vermochte isoliert zwischen den Gruppen zu unterscheiden. Zur Diagnostik von Eisenmangelanämien zeigten der Ferritinindex und das Ret-H_e, die Parameter des Thomasplot, die höchste Trennschärfe. Für die Anämie chronischer Erkrankungen sowie bei Nierenkrankheit erwiesen sich das Ret-H_e und das neue ndHb, Parameter des Haemaplot, den anderen Parametern in der diagnostischen Trennschärfe überlegen. Die Bestimmung der Parameter des Thomasplot und Haemaplot kann als Marker bei der Erkennung von Anämien im Kindes- und Jugendalter dienen, wobei deren Bedeutung in der Verlaufskontrolle noch weiterer Untersuchungen bedarf.

Schlagwörter: Löslicher Transferrinrezeptor, Ferritinindex, Hämoglobinäquivalent der Retikulozyten, Nearly Δ Hämoglobin, Thomasplot, Haemaplot, Fluoreszenzdurchflusszytometrie, Immunturbidimetrie, Eisenmangel, Anämie chronischer Erkrankungen, Referenzintervall

Abstract

Chronic illness, after iron deficiency, is the second most common cause of anaemia in children and adolescents. Up to now, there have been very few and for some entities no haematological markers whatsoever and only a few of their reference intervals can be used in the diagnosis and monitoring of the treatment of anaemia. The aims of this research were to determine reference intervals for the soluble transferrin receptor (sTfR), the ferritin index (sTfR/log Ferritin), the haemoglobin equivalent of the reticulocytes (Ret-H_e) and the nearly Δ haemoglobin (ndHb) according to age and gender in children and adolescents, and to test whether serum levels are different in anaemic patients. A further aim was to evaluate the clinical efficiency of these parameters in the diagnosis of iron deficiency anaemia, anaemia of chronic disease and anaemia in kidney disease. The parameters were studied in the sera of 234 non-anaemic patients and 139 anaemic patients (n=80 with chronic inflammatory diseases, n=22 with chronic kidney disease, n=37 with iron deficiency) using fluorescence flow cytometry and immune turbidimetry. The control group was composed of haematologically healthy patients recruited at the paediatric emergency unit, the obesity and the endocrinological outpatient clinic. Samples were obtained as well from patients undergoing general check-ups. The parameters showed a normal distribution and, for this reason, a mean with standard deviation and confidence interval was chosen and for the reference interval between the 2.5th and 97.5th percentile in order to describe and compare the investigated cohorts.

Not one of these parameters was, alone, able to differentiate between the groups. The ferritin index and the Ret-H_e, the parameters of thomasplot, showed the sharpest diagnostic differentiation for the diagnosis of iron deficiency anaemia. The Ret-H_e in combination with the novel ndHb, parameters of haemaplot, proved to more efficiently differentiate the diagnoses of interest, as compared to other parameters. The new parameters in thomasplot and haemaplot can serve as a marker for the detection of anaemia in children and adolescents. However, their clinical relevance for the evaluation of response to therapy needs further study.

keywords: soluble transferrin receptor, ferritin index, haemoglobin equivalent of the reticulocytes, nearly Δ haemoglobin, thomasplot, haemaplot, iron deficiency, anaemia of chronic disease, immune turbidimetry, fluorescence flow cytometry, reference interval

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Verbreitete Anämien im Kindes- und Jugendalter	2
1.1.1	Eisenmangel und Eisenmangelanämie	2
1.1.2	Anämie chronischer Erkrankungen	4
1.1.3	Anämie bei chronischer Nierenkrankheit	6
1.2	Untersuchte Parameter	7
1.3	Fragestellung und Zielsetzung.....	9
2.	MATERIAL UND METHODIK	11
2.1	Probanden	11
2.1.1	Patientenkohorte der gesunden Testpersonen	11
2.1.2	Studiengruppen.....	11
2.1.2.1	Eisenmangelanämie (IDA).....	11
2.1.2.2	Anämie chronischer Erkrankungen (ACD)	11
2.1.2.3	Anämie bei chronischer Nierenkrankheit (NI)	12
2.2	Ablauf der Studie.....	12
2.3	Material	15
2.3.1	Geräte und Reagenzien.....	15
2.3.1.1	Sysmex XE-2100® und XE-5000 Case Manager®.....	15
2.3.1.2	Roche cobas R 6000 analyzer, modular®.....	17
2.3.2	Hard- und Software	18
2.3.2.1	EXPERTviewer®.....	18
2.3.2.2	SAP ECC®	20
2.4	Methodik.....	21
2.4.1	Fluoreszenzdurchflusszytometrie	21
2.4.1.1	Hämoglobinäquivalent der Retikulozyten (Ret-H _e).....	21
2.4.1.2	Nearly Δ Hämoglobin (ndHb).....	22
2.4.2	Immunturbidimetrie	22
2.4.2.1	Löslicher Transferrinrezeptor (sTfR).....	22
2.4.2.2	Ferritin.....	22
2.4.2.3	Ferritinindex (sTfR/log Ferritin).....	23
2.4.2.4	C-reaktives Protein (CRP)	23
2.5	Statistik.....	23
3.	ERGEBNISSE	25
3.1	Normalverteilung der Parameter im Probandenkollektiv.....	25
3.2	Einflussfaktoren auf die Parameter	25

3.3	Altersverteilung in den Probandengruppen.....	27
3.4	Referenzwerte für die Parameter.....	27
3.5	Vergleich der Studiengruppen gegenüber der Kontrollgruppe	32
3.5.1	Diagnostische Trennschärfe der Parameter.....	35
3.5.2	Kontroll- und Studiengruppe in den diagnostischen Plots.....	40
4.	DISKUSSION	42
4.1	Referenzwerte in der Kontrollgruppe	42
4.1.1	Löslicher Transferrinrezeptor.....	43
4.1.2	Ferritin und Ferritinindex	46
4.1.3	Hämoglobinäquivalent der Retikulozyten.....	47
4.1.4	Nearly Δ Hämoglobin	48
4.2	Verhalten der Parameter in der Studiengruppe.....	48
4.2.1	Erhöhte sTfR- und Ferritinindex-Werte in der Studiengruppe	48
4.2.2	Verminderte Ret-H _e -Werte in der Studiengruppe	49
4.2.3	Verminderte ndHb-Werte in der Studiengruppe	50
4.3	Diagnostische Applikation der Parameter	50
4.3.1	Diagnostik von Eisenmangelanämien	50
4.3.2	Diagnostik der Anämie chronischer Erkrankungen, Anämie bei chronischer Nierenkrankheit.....	51
4.4	Fazit und Ausblick.....	52
5.	LITERATURVERZEICHNIS	54
6.	ANHANG	60
6.1	Danksagung.....	60
6.2	Lebenslauf	61
6.3	Publikationen	62
6.4	Erklärung an Eides Statt	63

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Reagenzien für XE-2100 und XE-5000	17
Tab. 2: Reagenzien zur Bestimmung des sTfR, des Ferritins und des CRP	17
Tab. 3: p-Werte der LR sowie des GM für den sTfR ($*p < 0,01$).....	26
Tab. 4: p-Werte der LR sowie des GM für den Ferritinindex ($*p < 0,01$).....	26
Tab. 5: p-Werte der LR sowie des GM für das Ret-H _e ($*p < 0,01$).....	26
Tab. 6: p-Werte der LR sowie des GM für das ndHb ($*p < 0,01$)	27
Tab. 7: MW mit SD sowie 95% KI des MW des Alters der Probanden nach Probandengruppe	27
Tab. 8: MW mit SD sowie 95% KI des MW des Alters der Probanden nach Altersgruppe ...	28
Tab. 9: MW mit SD sowie 95% KI des MW der sTfR-Werte nach Geschlecht und Altersgruppe	28
Tab. 10: MW mit SD sowie 95% KI des MW der Ferritinindex-Werte nach Geschlecht und Altersgruppe	28
Tab. 11: MW mit SD sowie 95% KI des MW der Ret-H _e -Werte nach Geschlecht und Altersgruppe	28
Tab. 12: MW mit SD sowie 95% KI des MW der ndHb-Werte nach Geschlecht und Altersgruppe	29
Tab. 13: MW und zentraler Referenzintervall des sTfR in den Altersgruppen	30
Tab. 14: MW und zentraler Referenzintervall des Ferritinindex in den Altersgruppen	30
Tab. 15: MW und zentraler Referenzintervall des Ret-H _e in den Altersgruppen	31
Tab. 16: MW und zentraler Referenzintervall des ndHb in den Altersgruppen	32
Tab. 17: p-Werte im Vergleich der Probandengruppen	32
Tab. 18: MW des sTfR in den Probandengruppen.....	33
Tab. 19: MW des Ferritinindex in den Probandengruppen.....	34
Tab. 20: MW des Ret-H _e in den Probandengruppen.....	34
Tab. 21: MW des ndHb in den Probandengruppen.....	34
Tab. 22: MW der sTfR-Werte nach Geschlecht und Probandengruppe	34
Tab. 23: MW der Ferritinindex-Werte nach Geschlecht und Probandengruppe.....	34
Tab. 24: MW der Ret-H _e -Werte nach Geschlecht und Probandengruppe.....	35
Tab. 25: MW der ndHb-Werte nach Geschlecht und Probandengruppe.....	35
Tab. 26: AUC für die Parameter des Profil F zur Differenzierung von IDA.....	35
Tab. 27: Diagnostische Sensitivität und Spezifität für die Parameter bei IDA-Patienten beim Cut-Off-Wert.....	36
Tab. 28: AUC für die Parameter des Profil F zur Differenzierung von ACD.....	37
Tab. 29: Diagnostische Sensitivität und Spezifität für die Parameter bei ACD-Patienten beim Cut-Off-Wert.....	37
Tab. 30: AUC für die Parameter des Profil F zur Differenzierung von NI.....	38
Tab. 31: Diagnostische Sensitivität und Spezifität für die Parameter bei NI-Patienten beim Cut-Off-Wert.....	38

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Anforderung des Profil F.....	14
Abb. 2: Der Thomasplot im EXPERTviewer.....	18
Abb. 3: Thomasplot-diagnostisches Diagramm zur Klassifizierung des Eisenmangels	19
Abb. 4: Haemaplot-diagnostisches Diagramm zur Klassifizierung von Anämien	20
Abb. 5: Referenzwerte des sTfR entsprechend der Altersgruppe	29
Abb. 6: Referenzwerte des Ferritinindex entsprechend der Altersgruppe	30
Abb. 7: Referenzwerte des Ret-H _e entsprechend der Altersgruppe	31
Abb. 8: Referenzwerte des ndHb entsprechend der Altersgruppe	32
Abb. 9: ROC-Kurve für die Parameter Ferritinindex und sTfR zur Diagnostik von IDA.....	36
Abb. 10: ROC-Kurve für die Parameter Ret-H _e und ndHb zur Diagnostik von IDA	36
Abb. 11: ROC-Kurve für die Parameter Ferritinindex und sTfR zur Diagnostik von ACD....	37
Abb. 12: ROC-Kurve für die Parameter Ret-H _e und ndHb zur Diagnostik von ACD.....	38
Abb. 13: ROC-Kurve für die Parameter Ferritinindex und sTfR zur Diagnostik von NI.....	39
Abb. 14: ROC-Kurve für die Parameter Ret-H _e und ndHb zur Diagnostik von NI.....	39
Abb. 15: Thomasplot mit Messungen aller Probanden	40
Abb. 16: Haemaplot mit Messungen aller Probanden.....	40

Abkürzungsverzeichnis

ACD	„Anaemia of Chronic Disease“, Anämie chronischer Erkrankungen
ADR	„Accord européen relatif au transport international des marchandises dangereuses par route“, europäisches Übereinkommen über die internationale Beförderung gefährlicher Güter auf der Straße
AUC	„Area Under the Curve“
BASO	Basophile Granulozyten
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankung
CEDIA	Cloned Enzyme Donor Immunoassay
CFU-E	„Colony-forming Unit Erythroid“, erythroide koloniebildende Einheit
CHr	„Reticulocyte Haemoglobin Content“, Hämoglobingehalt der Retikulozyten
CKD	„Chronic Kidney Disease“, chronische Nierenkrankheit
CRP	C-reaktives Protein
DIFF	Differential-
EDTA	„Ethylenediaminetetraacetic Acid“, Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESA	„Erythropoiesis-stimulating Agents“, Erythropoese-stimulierende Substanzen
Fe ³⁺	Dreiwertiges Eisen, Eisen(III)
FIA	Fluoreszenzimmunoassay
FID	„Functional Iron Deficiency“, funktioneller Eisenmangel
FPIA	Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay
GM	Gemischtes Modell
Hb	Hämoglobin
HFR	„High Fluorescence Reticulocyte“
ID	„Iron Deficiency“, Eisenmangel
IDA	„Iron Deficiency Anaemia“, Eisenmangelanämie
IDE	„Iron Deficiency Erythropoiesis“, Eisen-defiziente Erythropoese
IDs	„Iron Store Depletion“, Depletion des Speichereisens
IFN- γ	Interferon- γ
IMI	Immature Myeloid Information
IRE	„Iron Response Element“, auf Eisen reagierendes Element
IRPs	„Iron Regulatory Proteins“, Eisen-regulierende Proteine
JIA	Juvenile idiopathische Arthritis
KI	Konfidenzintervall
KIS	Krankenhausinformationssystem
LFR	„Low Fluorescence Reticulocyte“
LIA	Lumineszenzimmunoassay
log	Logarithmus
LR	Lineare Regression
MCV	„Mean Corpuscular Volume“, mittleres korpuskuläres Volumen
MCH	„Mean Corpuscular Haemoglobin“, mittleres korpuskuläres Hämoglobin

MCHC	„Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration“, mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MFR	„Medium Fluorescence Reticulocyte“
MPV	„Mean Platelet Volume“, Mittleres Thrombozytenvolumen
mRNA	„Messenger RNA“, Boten-RNA
MW	Mittelwert
ndHb	Nearly Δ Hämoglobin
NI	Niereninsuffizienz
NRBC	„Nucleated Red Blood Cells“, kernhaltige Erythrozytenvorstufen
OHC	Otto-Heubner-Centrum für Kinder und Jugendmedizin, Charité-Universitätsmedizin Berlin
PLT	„Platelets“, Thrombozyten
RBC	„Red Blood Cells“, Erythrozyten
RDW	„Red Cell Distribution Width“, Erythrozytenverteilungsbreite
RET	Retikulozyten
Ret-Hb	Retikulozytenhämoglobin
Ret-H _e	Hämoglobinäquivalent der Retikulozyten
RET-Y	Signalintensität des Vorwärtsstreulichts der Retikulozyten
RI	Referenzintervall
RIA	Radioimmunoassay
RNA	„Ribonucleic Acid“, Ribonukleinsäure (RNS)
ROC	„Receiver Operating Characteristic“
SD	„Standard Deviation“, Standardabweichung
SLS	Sulfolyser
sTfR	„Soluble Transferrin Receptor“, löslicher Transferrinrezeptor
TfR	Transferrinrezeptor
TGF- β	„Transforming Growth Factor- β “, Wachstumsfaktor- β
TIBC	„Total Iron-binding Capacity“, totale Eisenbindungskapazität
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TNI	Terminale Niereninsuffizienz
UV	Ultraviolett
WBC	„White Blood Cells“, Leukozyten
WHO	„World Health Organisation“; Weltgesundheitsorganisation

1. EINLEITUNG

Das neugriechische Wort αίμα (haima) leitet sich, laut linguistischer Forschungsergebnisse, vom altgriechischen Verb αίθω (aitho) ab, das „rotglühend machen“, „brennen“, „wärmen“, „erhitzen“ bedeutet. Es stammt am wahrscheinlichsten vom Perfekt passiv des Verbs αίθω, ήσμαι (hesmai). Daraus ergibt sich αίσμα (haisma) oder αίμα. Dies heißt wörtlich „heiß“ oder „glühend“.¹

Der Begriff Anämie leitet sich her aus dem Altgriechischen άναίμος (anaimos) „blutlos“ und setzt sich zusammen aus dem privativen Präfix αν- (an) „un-, ohne, nicht“ und dem Wort αίμα (haima) „Blut“.

Bei Homer werden die griechischen Götter und auch die Dämonen als blutlos (ανάιμωνες, anaimones) bezeichnet. Dies weist nicht etwa auf deren Tod sondern im Gegenteil auf deren Unsterblichkeit hin, da kein Blut in ihnen fließt. Dies widerspricht der Auffassung einiger antiker griechischer Gelehrter, die das Blut, die Psyche (ψυχή) und den Geist (πνεύμα) als eine Einheit betrachten.¹

Anämien wurden erst in der Mitte des 19. Jahrhunderts quantitativ definiert. Zuvor lassen sich allein indirekte Hinweise wie Beschreibungen von Blässe oder von Krankheiten die, wie wir heute wissen, in Zusammenhang mit einer Anämie auftreten, finden. Beispielsweise scheinen Bleiintoxikationen, die zu einer Störung der Blutbildung führen können, in Rom äußerst verbreitet gewesen zu sein. Auch intestinale Parasiten, die eine Eisenmangelanämie hervorrufen können, waren seit Urzeiten bereits bekannt. In paläopathologischen Präparaten konnten Parasiten wie der Spulwurm (*Ascaris lumbricoides*), der Peitschenwurm (*Trichuris trichiura*) sowie verschiedene echte Bandwürmer (*Taenia*), die zu gastrointestinalen Blutungen und so zu Anämien führen, nachgewiesen werden. Der Fischbandwurm (*Diphyllobothrium latum*), der zu einer Vitamin B₁₂ Malabsorption und somit zu einer megaloblastären Anämie führt, wurde in Mumien in Preußen und Peru gefunden.²

In „Über die Krankheiten“ des Corpus Hippocraticum wird erstmalig in der Antike von Blutkrankheiten berichtet. In der lateinischen Übersetzung in dem Werk „Hippocratis et aliorum veterum reliquiae“ von Franz Zacharias Ermerins heißt es: „noch eine Krankheit der Milz, sie beginnt in der Frühlingszeit jedoch kommt genauer vom Blut. Wenn die Milz mit Blut gefüllt ist, birst sie in das Abdomen und ein Stechen befällt die Milz, die Brust, die Schulter und die Region unter dem Schulterblatt. Der gesamte Körper erhält eine bleierne

Farbe und über den Schienbeinen treten kleinste Wunden auf, aus denen sich große Ulzerationen bilden.“³

Besonders verbreitet zeigt sich in der überlieferten Geschichte die iatrogene Anämie, da Aderlass vom antiken Griechenland und Römischen Reich bis in die Mitte des 19. Jahrhunderts als eine verbreitete Methode zur Therapie vieler Krankheiten darstellte.²

1.1 Verbreitete Anämien im Kindes- und Jugendalter

1.1.1 Eisenmangel und Eisenmangelanämie

Eisenmangel („Iron Deficiency“ oder ID) ist der am weitesten verbreitete ernährungsbedingte Mangelzustand bei den Kindern dieser Welt.⁴ Es handelt sich um eine ungemein häufige Störung, die nahezu 1,2 Milliarden Menschen weltweit betrifft.⁵ Im Jahre 2008 berichtete die Weltgesundheitsorganisation („World Health Organisation“ oder WHO), dass 24,8 % der Weltpopulation an einer Anämie leiden.⁴ Obwohl es in den entwickelten Ländern keinen Mangel an Nahrung gibt, ist ID auch hier noch immer die häufigste nutritive Defizienz mit hoher Prävalenz.⁶ In entwickelten Ländern leiden mehr als 500 Millionen Menschen an Eisenmangel.^{7,8}

Das Eisengleichgewicht wird durch die Rate an Erythropoese und die Größe der Eisenspeicher reguliert.⁹ Der Übergang von einem normalen Eisenstatus zur Ausbildung einer Eisenmangelanämie („Iron Deficiency Anaemia“ oder IDA) zieht zwei sequenzielle Prozesse nach sich^{10,11}: eine Depletion des Speichereisens („Iron Store Depletion“ oder IDs) und eine eisendefiziente Erythropoese („Iron Deficiency Erythropoiesis“ oder IDE). Beide werden als subklinische Eisendefizienzen klassifiziert. Nach der Ausschöpfung des Speichereisenkompartiments beginnt eine Depletion des funktionellen Eisenkompartiments.¹¹ ID wird definiert als ein Abfall des gesamten Eisenbestandes im Körper. IDA tritt auf, wenn die ID hinlänglich ausgeprägt ist, um die Erythropoese zu reduzieren.¹² Es handelt sich hierbei um die häufigste chronische Anämieform. ID kann das Ergebnis von übermäßigem oder chronischen Blutverlust, oder seltener, geminderter Eisenresorption sein.¹³ Allgemein gleicht das täglich resorbierte Eisen den Haushalt um den kompensatorisch nötigen Umfang aus, so dass der gesamte Eisenbestand ausgeglichen bleiben kann.¹⁴

Eisen spielt eine essentielle Rolle in vielen biochemischen Prozessen.¹⁵ Wie bei allen Nährstoffen ist der Bedarf an Eisen in Perioden des schnellen Wachstums und der schnellen Differenzierung übergeordnet.¹⁶ Unzureichende Eisenkonzentrationen im Gewebe können zu

einer verminderten Erythropoese und mangelhafter Sauerstoffbindungskapazität führen. Das Nervensystem scheint sich im Säuglings- und Kindesalter besonders empfindlich gegenüber ID und Eisenüberladung zu verhalten.¹⁷ Folglich können Anämie, ID oder Eisenüberladung schwerwiegende Einflüsse auf die neurologische Entwicklung haben, die im Falle von ID trotz Eisensubstitution irreversibel sein können und im Falle von Eisenüberladung bis ins Erwachsenenalter persistieren können.^{18,19} Solch ein Vorkommnis der frühkindlichen Entwicklung kann dauerhafte Auswirkungen auf die neuronale Funktion des Erwachsenen haben.¹⁶ Der für die Beeinflussung der Hirnentwicklung durch ID verantwortliche Mechanismus ist nur unvollständig erfasst, jedoch scheint er mit allgemeinen metabolischen Mangelzuständen, gestörter Myelinisierung sowie Synaptogenese und Modifizierung der spezifischen Neurotransmitterfunktionen verbunden zu sein.²⁰ Da es einen höheren physiologischen Bedarf an Eisen für die Erythropoese gibt, ist ID im Kindesalter hoch prävalent.²¹ Kleinkinder, Kinder, Jugendliche und schwangere Frauen tragen aufgrund ihres schnellen Wachstums und erhöhten Bedarfs an Eisen das höchste Risiko, einen Eisenmangel zu entwickeln.²² Die Zeichen und Symptome des Eisenmangels und der IDA variieren in Funktion der Schwere der Defizienz und Anämie und können sich mitunter bis zu einer schweren IDA nicht manifestieren. Obgleich die klinischen Konsequenzen eines Eisenmangels im Kindesalter kontrovers diskutiert werden, sollten sich Ärzte dessen bewusst sein, da er eine ernsthafte Gesundheitsstörung bedingt.²³

Es ist wichtig, daran zu erinnern, dass für die meisten Kliniker eine ID mit einer Anämie assoziiert ist. Es handelt sich jedoch eher um einen kontinuierlichen Prozess, bestehend aus drei Stadien. Die erste Phase ist die Erschöpfung des Speichereisens, das Stadium I, bei welchem das Gesamtkörpereisen zwar abfällt, jedoch die Hämoglobinsynthese und die Erythrozytenindizes unberührt bleiben. Die beiden Erythrozytenindizes, mittleres korpuskuläres Volumen („Mean Corpuscular Volume“ oder MCV) und mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration („Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration“ oder MCHC), sinken ab, wenn das Eisenangebot für das Knochenmark in deutlichem Maße abnimmt. Das Stadium II ist die IDE. Ist nun das Eisenangebot insuffizient, um eine normale Hämoglobinkonzentration aufrecht halten zu können, kann sich eine IDA, und somit das Stadium III, entwickeln.^{24,25} Das übliche Zeichen einer IDA ist Blässe, jedoch mit Fortschreiten des Mangels können sich ebenso Abgeschlagenheit, erniedrigte Toleranz für körperliche Aktivitäten, Irritabilität, Tachykardien und sogar kongestives Herzversagen entwickeln. Eisenmangel des Kindes, dies vor allem im frühen Kindesalter, ist mit Entwicklungsverzögerungen und Verhaltensauffälligkeiten assoziiert, die trotz adäquater

Therapie irreversibel sein können. Diese kognitiven Defizite können bereits vor der Entwicklung einer IDA, das heißt im Stadium des Eisenmangels, auftreten.^{22,26,27} Verlässliche Labormessungen, die den Eisenstatus widerspiegeln, sind klinisch, zur Detektion eines Eisenmangels, von besonderer Bedeutung. Daher ist die Etablierung von verlässlichen Labormessungen zum frühzeitigen Eisenmangelscreening essentiell für das kindliche Wachstum und die kindliche Entwicklung.¹¹

1.1.2 Anämie chronischer Erkrankungen

Die Parameter, die zur Diagnose einer ID führen, werden mit verschiedenen Methoden erhoben. Erythrozytenindizes wie das MCV oder das MCHC können ein mikrozytäres, hypochromes Bild, mit häufig erniedrigtem Serumferritin, bestätigen. Leider sind diese beiden Tests bei koexistierenden Erkrankungen weniger verlässlich.²⁴ Messungen der peripheren Blutindizes, das heißt des MCV, MCH und Ferritins, können sich in bestimmten Patientengruppen, aufgrund von bekannten Einflussfaktoren wie Allgemeininfektionen, lokalisierten Entzündungen oder Krebserkrankungen, als inadäquat erweisen. Die Hämoglobinbestimmung (Hb), als meist verbreitete Screeningmethode für den Eisenmangel, birgt durch ihre niedrige Spezifität und Sensitivität beträchtliche Einschränkungen, wenn sie als einziger Labormarker eingesetzt wird. Dies erschließt sich daraus, dass ein großer Teil des Gesamtkörpereisens verloren gehen muss, damit der Eisenspeicher nachlässt und der Hb unter den normalen Spiegel abfällt.²⁸ Anämie chronischer Erkrankungen („Anaemia of Chronic Disease“ oder ACD), auch bekannt als Anämie der Entzündung, ist ein mit chronisch-inflammatorischen und -autoimmunen Zuständen, malignen Prozessen oder chronischen beziehungsweise akuten Infektionen assoziiertes Geschehen und ruft den Status einer „funktionellen“ ID hervor. ACD folgt einer anderen Bahn als IDA, da bei dieser Form der Anämie der Eisenspeicher meist zwar gefüllt ist, jedoch nicht zur Disposition der Erythropoese steht. Die Diagnostik der ACD ist komplexer als die der IDA. Häufig ist das erste identifizierte Symptom ein Ausbleiben einer Antwort auf diätetische oder parenterale Eisensupplementierung.²⁹ Bei Patienten mit Entzündungen ist, als Antwort auf die Anämie, die Erythropoetinsekretion für den Grad der vorliegenden Anämie zu gering und inadäquat, um normale Hämoglobinspiegel aufrecht erhalten zu können. Die abgeschwächte Erythropoetinantwort wird verursacht durch proinflammatorische Zytokine wie den transformierenden Wachstumsfaktor- β („Transforming Growth Factor- β “ oder TGF- β), das Interferon- γ (IFN- γ) und den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), die die Erythropoetinproduktion inhibieren. Diese Zytokine haben den gegensätzlichen Effekt des

Erythropoetins auf die erythroiden Vorläuferzellen im Stadium ihrer Entwicklung der erythroiden koloniebildenden Einheit („Colony-forming Unit Erythroid“ oder CFU-E). IFN- γ verursacht im Knochenmark den vorzeitigen Zelltod der erythroiden Vorläuferzellen und hebt somit den antiapoptotischen Effekt des Erythropoetins auf.³⁰ Der genaue Mechanismus, durch den die proinflammatorischen Zytokine in Vorläuferzellen der roten Zellreihe eine Resistenz gegenüber Erythropoetin auslösen, ist bislang nicht bekannt. Die inflammatorischen Zytokine reduzieren die Verfügbarkeit von Eisen für die Erythropoese, trotz adäquatem Körperspeichereisen, und führen so eine Produktion von hypochromen Erythrozyten herbei.³¹ Dieser Zustand ist bekannt als funktioneller Eisenmangel („Functional Iron Deficiency“ oder FID)³² und wird definiert als ein relativ gestörtes Gleichgewicht zwischen Eisenabgabe an die Erythroblasten und der durch den Mechanismus des Heparidins und der inflammatorischen Zytokine verursachten Erythropoetinstimulation.³³ Die Einschränkung der Eisenabgabe muss schwerwiegender sein als die Unterdrückung der im Knochenmark befindlichen Vorläufer und die Bildung von Erythropoetin.⁹ Unlängst wurde herausgefunden, dass Heparidin, ein durch die Leber produziertes Peptid, die Verbindung des Immunsystems mit der Übertragung des Eisens von und zu den Speicherdepots darstellt. Heparidin geht mit Ferroportin, ein transmembraner Eisenexporter in Makrophagen, Enterozyten und Hepatozyten, eine Bindung ein. Es konnte gezeigt werden, dass in-vitro Heparidin die Internalisierung und Degradation von Ferroportin auslöst. Indem es die Anzahl an Eisenexportern reguliert, ist Heparidin in die Kontrolle der Eisenaufnahme und -abgabe von Enterozyten oder Makrophagen involviert. Im Laufe von Prozessen, die diese regulatorischen Mechanismen beeinträchtigen, kann es somit zu einer gestörten Eisenmobilisation, ohne einen wirklichen Eisenmangel in den Eisenspeichern, kommen.³⁴

Die zwei Erkrankungen IDA und ACD können gemeinsam auftreten und der Nachweis des Eisenmangels bei chronischer Erkrankung kann dann eine echte diagnostische Herausforderung bedeuten.²⁴

Die Behandlung der ACD bleibt ein signifikantes Problem⁹, da niedrige Hämoglobinspiegel potentiell einen negativen Effekt auf die angewandte Therapie zeigen. Patienten müssen dann teilweise mit Blutkonserven transfundiert werden. Allerdings herrscht in industrialisierten Ländern nicht nur eine Knappheit an Blutkonserven, sondern führen wiederholte Transfusionen auch zu Nachteilen, wie Allosensibilisierung und Eisenüberladung, für den Patienten. Die Behandlung mit rekombinantem humanem Erythropoetin ist ein Weg zur partiellen Lösung dieser Probleme. Jedoch können optimale hämatologische Ergebnisse nur

produziert werden, wenn eine signifikante Antwort des Knochenmarks vorhergesagt werden kann und die Eisenverfügbarkeit gewährleistet ist. Das ist notwendig, damit der Eisenbedarf, der durch das Erythropoetin verbesserten Erythropoese, gedeckt werden kann. Daher ist es wichtig, diagnostische Tests zu empfehlen, die den erythropoetischen Status im Verlauf widerspiegeln und geeignet sind, das Fortschreiten des Eisenmangels von einem frühen Stadium, besonders bei Patienten mit kombinierter ID und ACD, kenntlich zu machen.⁹

1.1.3 Anämie bei chronischer Nierenkrankheit

Eisenmangel tritt bei einer großen Mehrheit der Patienten mit einer chronischen Nierenkrankheit („Chronic Kidney Disease“ oder CKD) auf. Die Entwicklung eines Eisenmangels ist meist mehreren Faktoren geschuldet. Hauptsächlichste Faktoren bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz (TNI), die zu einem Eisenmangel beitragen, sind reduzierte Aufnahme und geminderte intestinale Absorption des diätetischen Eisens, Blutverluste, chronische Inflammation, assoziiert mit der TNI, sowie ein erhöhter Eisenbedarf während einer Behandlung mit Erythropoese-stimulierenden Substanzen („Erythropoiesis-stimulating Agents“ oder ESA)³⁵. Anämie ist eine der wichtigsten Komplikationen einer CKD, die beunruhigende Symptome, einschließlich Fatigue und Dyspnoe, hervorrufen kann. Patienten müssen die Intensität ihrer täglichen Aktivitäten einschränken, um die Symptome beherrschen zu können. Dies kann die Lebensqualität mindern. Darüber hinaus, da anämische Zustände zu einem reduzierten Sauerstofftransport in Geweben und in Organen und zu vermehrter Herzarbeit führen, kann eine Anämie zu einer schlechteren Gesamtprognose des Leidens beitragen. Tatsächlich haben Beobachtungsstudien eine Korrelation zwischen dem Grad der Anämie bei CKD und der Mortalität sowie dem Hospitalisationsrisiko ergeben.³⁶

Die Anämie bei CKD kann durch den Einsatz von ESA korrigiert werden. Die hauptsächlichsten Gründe für eine verminderte Antwort auf eine ESA-Therapie sind der ungenügende Aufbau eines für den Grad der Anämie adäquaten Eisenspeichers beziehungsweise einer adäquaten Eisenverfügbarkeit.³⁷ Eine Therapie mit Eisen in Kombination mit ESA ist bei Kindern mit Anämie bei CKD häufig erforderlich, um ein befriedigendes Therapieergebnis zu erzielen. Die Einstellung des Eisenstatus bei Patienten mit CKD beinhaltet immer den Ausschluss eines Eisenmangels, das Bereitstellen angemessener Eisenspeicher, die dem Patienten eine effiziente Aufrechterhaltung eines Zielspiegels des Hämoglobins erlauben. Grundsätzlich muss man eine Eisenüberladung verhindern.³⁵

1.2 Untersuchte Parameter

Die **Untersuchung des Knochenmarks**, eine Färbung mit einer Berliner-Blau-Reaktion zum Nachweis von Eisen, wird noch immer als beste Methode - als der „Gold Standard“ - zur Bestimmung des Eisenstatus bei Patienten mit unklaren Laborbefunden, erachtet. Nachteile dieser Methode sind die Invasivität, die Schmerzhaftigkeit für den Patienten, der Kostenaufwand und die Abhängigkeit der Ergebnisse vom Untersucher.³⁸

Die Messung des **Serumferritins** ist ein treffender Indikator des Speichereisens.^{39,40,41} Zahlreiche Studien haben die Überlegenheit des Serumferritins gegenüber anderen Messungen zur Identifikation eines Eisenmangels bewiesen. Das Serumferritin war bei solch einer diagnostischen Fragestellung über 30 Jahre lang der wertvollste Labormarker.⁴²

Der **lösliche Transferrinrezeptor** („Soluble Transferrin Receptor“ oder sTfR) im Serum ist ein mit dem Grad der erythropoetischen Aktivität und dem Gewebeeisenstatus in Beziehung stehender Parameter.^{10,21,43,44,45,46} Seine Werte sind proportional zu der Masse des zellulären Transferrinrezeptors (TfR), deren Synthese, gemeinsam mit Ferritin, auf transkriptionaler Ebene durch das Angebot an Eisen reguliert wird.^{45,47} Die Konzentration des sTfR wurde als nützlich für die Diagnostik eines Eisenmangels beschrieben.^{48,49} sTfR ist ein verlässliches Werkzeug zur Bemessung des funktionellen Eisenstatus und der erythropoetischen Aktivität beim Erwachsenen, jedoch ist wenig über seine Rolle im Kindesalter bekannt.^{45,50} Der humane TfR ist ein transmembranes, Disulfid-verknüpftes, dimeres Glykoprotein mit zwei identischen 85 kDa Untereinheiten auf der Oberfläche von nahezu allen Zelltypen, vornehmlich auf schnell proliferierenden Zellen und Zellen mit speziellem Eisenbedarf, wie zum Beispiel erythropoetischen Zellen des Knochenmarks. Folglich ist die gegenwärtige Anzahl von TfRs auf der Zelloberfläche präzise sowohl durch den Eisenstatus als auch den Proliferationsstatus der Zelle reguliert.^{51,52} TfR vermittelt die Eisenaufnahme der Zellen.⁵³ Ein TfR bindet zwei-Fe(III)-Transferrin-Moleküle und der Rezeptor-Transferrin-Komplex wird in ein Endosom internalisiert, dort wo das Eisen in das Zytosol transferiert wird. Nach dem Rückfluss auf die Zelloberfläche dissoziiert das Apotransferrin und der Rezeptor ist frei, um den Prozess zu wiederholen. Da die TfR-Expression, wenn die Zellen mehr Eisen benötigen, hochreguliert wird und sTfR proportional zum gesamten TfR ist, sind die sTfR-Konzentrationen eines eisendefizienten Individuums im Plasma und im Serum erhöht.⁵⁴ Die beobachteten erhöhten sTfR-Konzentrationen bei Patienten mit IDE spiegeln die massive Expression von erythroiden Vorläuferzellen wider.⁵⁵ Die Expression von TfR wird hauptsächlich durch posttranskriptionale Regulation kontrolliert, die durch die Interaktion

zwischen „Iron Regulatory Protein“ (IRP) und „Iron Response Element“ (IREs), lokalisiert in der 3'-nichttranslatierten Region der TfR-mRNA, vermittelt wird.⁵⁶ Der sTfR ist ein proteolytisches Produkt des intakten TfR und zirkuliert im Blut als monomeres Fragment der extrazellulären TfR-Domäne. Da TfR überwiegend von erythroiden Vorläuferzellen exprimiert wird, ist der hauptsächliche Ursprung von sTfR die erythropoetische Zelle des Knochenmarks, einschließlich der zirkulierenden Retikulozyten. Die Konzentration von sTfR korreliert positiv mit der erythropoetischen Aktivität und negativ mit der Menge an verfügbarem Eisen für die Erythropoese. Damit liefert sie eine quantitative Messung des funktionellen Eisenstatus. Änderungen der sTfR-Konzentration konnten in verschiedenen pathologischen Zuständen, die mit Veränderungen der Erythropoese und des Körpereisenbestandes einhergehen, beobachtet werden.⁵⁷ Um Informationen über das funktionelle und das Speichereisen zu erlangen, wurde zuerst der sTfR/Ferritin-Quotient²¹ und darauf folgend der sTfR-F Index oder Ferritinindex (sTfR/log Ferritin)⁴⁶ eingeführt. Beide Parameter haben eine höhere diagnostische Aussagekraft als sTfR oder Ferritin allein^{10,58}.

Konventionelle biochemische Marker für die Differentialdiagnose der Anämie sind folgende Indikatoren des Eisenumsatzes: **Ferritin**, als das Eisenspeicherprotein, die **totale Eisenbindungskapazität** („Total Iron-binding Capacity“ oder TIBC) und die **Transferrinsättigung**. Viele Patienten mit ACD zeigen ein charakteristisches Muster von niedriger TIBC, bei der die Transferrinsättigung zwischen 10 % und 20 % liegt, gekoppelt mit einem Anstieg der Ferritinkonzentration.³¹ Es ist wichtig anzumerken, dass diese Muster merklich anders sind als bei klassischer ID, wo eine erhöhte TIBC von einer sehr niedrigen Ferritinkonzentration begleitet wird. Es ist bekannt, dass Patienten mit einer isolierten ACD übersättigte Eisenspeicher mit normalen bis erhöhten Ferritinspiegeln vorweisen.

RET-Y ist der Mittelwert des Vorwärtsstreulichts der Retikulozytenpopulation. Ein entsprechender Wert, RBC-Y, ist der Mittelwert des Vorwärtsstreulichts der reifen, roten Zellpopulation. Vormalige Studien haben gute Korrelationen zwischen RBC-Y und dem mittleren korpuskulären Hämoglobin („Mean Corpuscular Haemoglobin“ oder MCH), besser noch als für das mittlere Erythrozytenvolumen (MCV), bewiesen. Daher kann man mittels einer mathematischen Transformation von RBC-Y das Hämoglobinäquivalent der Erythrozyten (RBC-H_e) in Pikogramm (pg) errechnen. Bei einer entsprechenden Anwendung bei RET-Y ergibt sich das Hämoglobinäquivalent der Retikulozyten (Ret-H_e), auch dies wird in pg angegeben.⁵⁹ Das **Retikulozytenhämoglobin** (Ret-Hb), gemessen als mittlerer

zellulärer Hämoglobingehalt der Retikulozyten („Mean Cellular Haemoglobin Content of Reticulocytes“ oder CHR), hat in der Beurteilung des funktionellen Eisenmangels in einem breiten Spektrum von krankheitsspezifischen Anämien, einschließlich des Nierenversagens im Endstadium, der Krebs-assoziierten Anämie, des klassischen Eisenmangels, der β -Thalassämia minor und anderen hämatologischen Funktionsstörungen an Bedeutung gewonnen. Im Thomasplot kann Ret-Hb (= CHR) ohne Verlust von Sensitivität und Spezifität durch Ret-H_e ersetzt werden.⁵⁹

Der neue Parameter Nearly Δ Hämoglobin (ndHb) wird anhand von Subtraktion des MCH vom Ret-H_e berechnet. Der griechische Buchstabe Delta (Δ) als Symbol weist daraufhin, dass es sich bei diesem Parameter um eine berechnete Differenz handelt. Sein Wert entspricht so nahezu der Differenz des RET-Y gegenüber dem RBC-Y, das heißt der Differenz zwischen Retikulozytenpopulation und der Erythrozytenpopulation. NdHb kann sowohl negative als auch positive Werte annehmen. Dieser Parameter kann im Gegensatz zum Ret-H_e Eisenmangel und Eisenmangelanämien von Anämien chronischer Erkrankungen und kombinierten Anämien unterscheiden. Bei Eisenmangel wird angenommen, dass der Parameter tendenziell positivere Werte, jedoch niedriger im Vergleich zu Gesunden, annimmt, bei ACD eher negative Werte.

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

In der Laboratoriumsmedizin erbringt ein während der Analyse von klinischen Fällen erhobener Messwert nur dann aussagekräftige Informationen, wenn ein Vergleich zu relevanten Referenzwerten von Individuen ohne apparente Krankheiten vorliegt. Wenn alte diagnostische Methoden verändert werden, auch bei marginalen Änderungen, scheint es für den Arzt unklar, ob die Referenzintervalle (RI) zur Interpretation der Laborergebnisse erhalten bleiben oder reetabliert werden müssen. Dies gilt allgemein insbesondere aber für die hämatologische Diagnostik.

Aufgrund der Wichtigkeit der suffizienten beziehungsweise präzise zu adaptierenden Eisenversorgung des Kindes sowie eines möglichen Schadens im Falle einer ID oder Eisenüberladung erscheint die Verlässlichkeit der Messung des Eisenstatus besonders zentral.

Die Bestimmung des Serumferritins kommt als ein verlässlicher Laborparameter zur Diagnostik des Eisenmangels ohne bestehende akute oder chronische Erkrankung in Frage. Die konventionellen Labormessungen bezüglich des Eisenstatus sind meist nicht geeignet,

streng zwischen diesen Störungen zu differenzieren. Für eine definitive Diagnosestellung und Evaluation des Eisenstatus erscheint somit die Untersuchung des Knochenmarks von Nöten. Die als Goldstandard angesehene Bestimmung des Depoteisens im Knochenmark ist für die Routinediagnostik ungeeignet, besonders bei Kindern, weil eine Narkose erforderlich ist, die mit einem zusätzlichen Risiko behaftet ist. Darüber hinaus ist eine Knochenmarkpunktion und zytologische Untersuchung des Punktats um vieles kostenaufwändiger als eine venöse Blutentnahme sowie Laboranalyse. Der Goldstandard zur Beurteilung des Eisenstatus besteht in der Färbung des Knochenmarks durch die Berliner-Blau-Reaktion. Sie bleibt diagnostisch schwierigen Fällen vorbehalten.

Ogleich sTfR-Werte für gesunde ^{50,60,61,62,63} und Kinder mit Eisendefizienz ^{64,65,66} publiziert wurden, werden starke Schwankungen je nach Hersteller des Kits zur Bestimmung des Parameters beobachtet. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Werte des sTfR, des Ferritinindex und des ndHb zusammen mit dem Ret-H_e bei gesunden Probanden, als Referenzwerte je nach Alter der Kindes, bei Probanden mit einer Eisenmangelanämie und mit einer ACD im Rahmen von chronischen Erkrankungen wie CED und JIA, sowie mit TNI im Kindesalter zu beurteilen. Die chronisch kranken Patienten, ACD und TNI, stellen ein experimentelles exemplarisches Modell zur Untersuchung der ACD dar. Das Ziel war die Evaluation der klinischen Effizienz der Parameter in der Diagnostik und Differentialdiagnostik und die Detektion eines potentiellen koexistierenden Eisenmangels bei ACD und TNI, sowie der Vergleich zwischen ACD und TNI.

Im Rahmen der Dissertation wurden folgende Fragen untersucht:

- Was ist der Referenzbereich von sTfR, Ferritinindex, Ret-H_e und ndHb bei gesunden Kindern verschiedenen Alters?
- Korrelieren die Konzentrationen dieser Parameter mit den Faktoren Geschlecht und Alter der Kinder und Jugendlichen?
- Wie verhalten sich diese Serumkonzentrationen der Parameter bei Kindern und Jugendlichen, die an Eisenmangel oder chronischen Erkrankungen leiden?
- Anhand welcher dieser Parameter kann eine verlässliche Diagnostik, Differentialdiagnostik sowie Verlaufskontrolle der Therapie bei den verbreiteten Anämieformen erfolgen?

2. MATERIAL UND METHODIK

2.1 Probanden

Das Probandenkollektiv wurde prospektiv im Otto-Heubner-Centrum für Kinder- und Jugendmedizin (OHC) der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Standort Virchow Klinikum, in der Klinik für Allgemeine Pädiatrie rekrutiert. Die Probanden waren dort zwischen dem 2. April 2008 und dem 16. Juni 2010 in ambulanter oder stationärer Behandlung. Entschieden sich die behandelnden Ärzte für eine Blutentnahme mit dem Ziel einer Verlaufskontrolle, Diagnosestellung oder -erhärtung, wurde die zusätzliche Anforderung der Parameter des Profil F veranlasst. Die Parameter des Profil F sind im Teil 2.2 (Ablauf der Studie, Seite 12) aufgetragen. Es wurden alle Studienteilnehmer im Alter zwischen 3 Monaten und 18 Jahren eingeschlossen.

2.1.1 Patientenkohorte der gesunden Testpersonen

Die Probandenkohorte zur Erstellung von Referenzwerten wurde in der Rettungsstelle, der Adipositas- und Stoffwechselsprechstunde und Gesundheitskontrolluntersuchungen selektiert. Es handelte sich um hämatologisch gesunde Patienten, die keine Eisensubstitution, keine Erythropoetingabe, keine Gabe von Erythrozytenkonzentraten oder Vollbluttransfusionen erhielten. Entsprechend dem Alter wurde jeder Proband einer der fünf Altersgruppen zugeteilt.

2.1.2 Studiengruppen

2.1.2.1 Eisenmangelanämie (IDA)

Das Kollektiv von Probanden mit hämatologischen Erkrankungen (IDA) wurde in der hämatologischen Sprechstunde und in der Rettungsstelle gesammelt. Die Probanden litten an einer symptomatischen Eisenmangelanämie.

2.1.2.2 Anämie chronischer Erkrankungen (ACD)

Die Probandengruppe ACD mit chronischen Erkrankungen wurde in der rheumatologischen Sprechstunde und auf der gastroenterologischen Station rekrutiert.

Die Probanden mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) waren teils an Colitis ulcerosa, teils an Morbus Crohn erkrankt. Es handelte sich um therapierte Patienten, die sich trotz Therapie klinisch im akuten Krankheitsgeschehen befanden.

Bei den rheumatologischen Probanden, die an einer juvenilen idiopathischen Arthritis (JIA) erkrankt waren, handelte es sich um Testpersonen, die schon diagnostiziert und therapiert waren und sich zum Zeitpunkt der Messung klinisch in einem akuten Schub der Erkrankung, mit fulminanten Entzündungszeichen, befanden.

2.1.2.3 Anämie bei chronischer Nierenkrankheit (NI)

Die Probanden der nephrologischen Station (NI) befanden sich im Stadium V der chronischen Nierenkrankheit. Alle Patienten wurden hämodialysiert und medikamentös therapiert.

2.2 Ablauf der Studie

Die Auswahl der Patienten erfolgte durch intensive Rücksprache mit den Klinikärzten im Rahmen des stationären Aufenthalts des Patienten, der Vorstellung in der Rettungsstelle sowie den Sprechstunden. Bei allen Patienten wurde, im Rahmen von durch den behandelnden Arzt angeforderten venösen Blutabnahmen von Heparinplasma und EDTA-Blut, zusätzlich auf dem Anforderungsbogen für das Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Standort Virchow Klinikum, statt der Blutbildkontrolle das Profil F durchgeführt. Das Profil F beinhaltet folgende Parametern des Blutbildes und des Eisenstatus:

- Leukozyten,
- Erythrozyten,
- Hämoglobin,
- Hämatokrit,
- mittleres Erythrozytenvolumen (MCV),
- mittleres korpuskuläres Hämoglobin („Mean Corpuscular Haemoglobin“ oder MCH),
- mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC),
- Thrombozyten,

- Retikulozyten,
- Hämoglobinäquivalent der Retikulozyten (Ret-H_e)
- Nearly Δ Hämoglobin (ndHb),
- mittleres Thrombozytenvolumen („Mean Platelet Volume“ oder MPV),
- Erythrozytenverteilungsbreite („Red Cell Distribution Width“ oder RDW),
- Eisen,
- Transferrin,
- löslicher Transferrinrezeptor (sTfR),
- C-reaktives Protein (CRP) und
- Serumferritin.

Aus Transferrin und Eisen, die in Heparinplasma gemessen werden, kann die Transferrin sättigung bestimmt werden.

Es erfolgte somit für keinen der Probanden eine zusätzliche Blutentnahme, es handelte sich bei allen Entnahmen um durch den behandelnden Arzt angeforderte Routinemessungen, die durch die Anforderung des Profil F erweitert wurden.

Es wurden ausschließlich venöse Standardblutabnahmen nach Stauung von maximal 60 Sekunden durchgeführt. Auf eine gute Durchmischung der EDTA-Röhrchen wurde geachtet. Zur Bestimmung des Blutbildes wurde das Probengefäß mindestens zur Hälfte gefüllt und durch 4- bis 5-maliges Überkopfschwenken gemischt. Die Etiketten des Etikettenbogens wurden zur Kennzeichnung des Anforderungsbeleges und der Röhrchen eingesetzt. Ein Etikett wurde zur Erinnerung an die durchgeführte Probenentnahme in die Patientenunterlagen eingeklebt. Die Markierung der Anforderungen erfolgte mit Bleistift. Der Barcode auf den Röhrchen wurde von oben nach unten angebracht. Zur korrekten Kennzeichnung wurden auf dem Anforderungsbeleg das Patientenetikett mit Barcode und das Stationsetikett mit Barcode angebracht. Der klinische Stationsarbeitsplatz bietet in seinem Krankenhausinformationssystem (KIS) die Möglichkeit, Laboranforderungen auch elektronisch zu übermitteln. In einer Eingabemaske können die gewünschten Parameter, in

lebensbedrohender Erkrankungen; Risikogruppe 4) und B (Gefahr weniger schwerer Erkrankungen; Risikogruppen 1-3) unterteilt. Bei den hier abgenommenen Proben handelt es sich um eine Beförderung der Risikogruppe 1 (geringe individuelle Gefahr und geringe Gefahr für die Allgemeinheit).

Eine Zuteilung zu einer der vier Probandengruppen konnte daraufhin anhand der Einsicht in die verfassten Arztbriefe sowie Patientenakten erfolgen.

Es wurde als Datenbank eine Microsoft® Office Excel®-Datei erstellt, die folgende Informationen enthielt:

- Probandencode,
- Geschlecht,
- Geburtsdatum,
- Diagnose,
- Abnahmedatum,
- stationäre oder ambulante Einheit und
- Parameter des Profil F.

2.3 Material

2.3.1 Geräte und Reagenzien

2.3.1.1 Sysmex XE-2100® und XE-5000 Case Manager®

Der XE-2100 und der XE-5000 Case Manager sind vollautomatische Hämatologieanalysegeräte, die eine Verwendung von Fluoreszenzdurchflusszytometrie in Kombination mit der Mehrkanalmesstechnologie ermöglichen. Spezifische Reagenzien heben die Charakteristika der Leukozyten hervor, sodass die Zellen identifiziert und gezählt werden können. Zusätzliche Softwaremodule erlauben die Erweiterung des Parameterspektrums für diagnostische Möglichkeiten. Der XE-5000 beinhaltet zusätzlich, als ein diagnostisches Konzept, den Case Manager. Dieser gestattet die Verwendung von Diagnosekonzepten bei der Beurteilung von Patientenfällen und bei der Therapieüberwachung. Dabei hilft der Case Manager dem Laborarzt, die relevanten klinischen Daten im Befund weiterzuleiten, und bei

deren Interpretation. Auf diese Weise kann der Case Manager den Kliniker bei der Diagnose und Therapieüberwachung unterstützen.

Folgende Messkanäle finden am XE-2100 und XE-5000 Case Manager in den verschiedenen Messprofilen Verwendung:

- Erythrozyten/Thrombozyten- (RBC/PLT-) Kanal: Impedanzmessung mittels hydrodynamischer Fokussierung,
- Hämoglobin-Kanal: Sulfolyser- (SLS-) Hämoglobin-Methode,
- Leukozyten/Basophile Granulozyten- (WBC/BASO-) Kanal: Durchflusszytometrie,
- Differential- (DIFF-) Kanal zur Bestimmung von Neutrophilen, Eosinophilen, Lymphozyten und Monozyten: Fluoreszenzdurchflusszytometrie,
- unreife Vorstufen der Granulozyten, Immature Myeloid Information- (IMI-) Kanal: RF-/DC-Widerstandsmessprinzip,
- Retikulozyten- (RET-) Kanal: Fluoreszenzdurchflusszytometrie,
- Kernhaltige erythrozytäre Vorstufen-, Nucleated Red Blood Cells- (NRBC-) Kanal: Fluoreszenzdurchflusszytometrie.

Der XE-5000 Case Manager bietet zusätzlich die Möglichkeit der Analyse von Körperflüssigkeiten in einem separaten Modus.

Analysenergebnisse des XE-2100 und XE-5000 Case Manager beinhalten Zahlenwerte, Histogramme und Scattergramme. So werden zum Beispiel die Zellverteilungen und die Lage von abnormalen Zellen im Scattergramm, sowie der Kurvenverlauf der Histogramme bei jeder Probe beurteilt und der Anwender automatisch durch interpretative Meldungen auf Abnormalitäten hingewiesen.

Das Vertriebsunternehmen dieser Geräte in Deutschland ist Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt und der Hersteller Sysmex Cooperation Japan, Kobe.

An diesen Geräten wurden aus den EDTA-Blutproben fluoreszenzdurchflusszytometrisch das Hämoglobinäquivalent der Retikulozyten (Ret-H_e) und das Nearly Δ Hämoglobin (ndHb) bestimmt.

CELLPACK	Verdünnungsflüssigkeit
CELLSHEATH	Reagenz für die hydrodynamische Fokussierung
STROMATOLYSER-FB	Analyse von WBC und BASO
STROMATOLYSER -4DL und -4DS	Analyse von NEUT, LYMPH, MONO, EO, IG
SULFOLYSER, Sodium-Lauryl-Sulfat (SLS)	HGB-Reagenz
RET-SEARCH (II)	Reagenz für den RET-Kanal
STROMATOLYSER-NR	Reagenz für den NRBC-Kanal
STROMATOLYSER-IM	Reagenz für den IMI-Kanal
CELLCLEAN	Reinigungsmittel

Tab. 1: Reagenzien für XE-2100 und XE-5000

2.3.1.2 Roche cobas R 6000 analyzer, modular®

Die klinische Chemie kann an diesen Analysatoren durch chemische Analyse, enzymatische Analyse mit Enzym und Substrat, Farbtests oder UV-Tests, quantitative Auswertung, Photometrie und ionenselektive Elektroden vonstattengehen.

In der Immundiagnostik hat das Gerät die Fähigkeit der Messung anhand verschiedener Immunoassays. Homogene Immunoassays sind der Tina-quant® Test für Analyten in besonders niedrigen Konzentrationen, wie zum Beispiel das CRP, und auch das Cloned Enzyme Donor Immunoassay Verfahren (CEDIA) und das Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay-Verfahren (FPIA). Die Quantifizierungen der Antigenkonzentrationen erfolgt anhand einer Kalibrationskurve, die mit Kalibratoren mit bekannten Antigenkonzentrationen erstellt wird. Heterogene Immunoassays dienen empfindlichen Messungen sehr niedriger Analytenkonzentrationen von bis zu 10^{-12} M. Bei geringem Molekulargewicht bietet sich ein kompetitives Testprinzip anhand von Tracern an. Beim Sandwich-Testprinzip mit zwei Reagenzien erfolgt eine Immunreaktion, bei der das Antigen der Probe von zwei Antikörpern „eingeklemmt“ wird. Dieses Verfahren existiert als 1-Schritt-assay oder 2-Schritt-assay.

sTfR	R1	TES/HCl-Puffer: 20 mmol/L, pH 7,7; NaCl: 500 mmol/L; Konservierungsmittel
	R2	Latexpartikel beschichtet mit monoklonalen Anti-Human-sTfR-Antikörpern (Maus); TRIS/HCl-Puffer: 20 mmol/L, pH 8,0; Konservierungsmittel
Ferritin	R1	Puffer, pH 8,0; Kaninchengammaglobulin; Stabilisatoren und Konservierungsmittel
	R3	Wässrige Matrix mit Latexpartikeln, die mit Anti-Human-Ferritin-Antikörpern (Kaninchen) beschichtet sind; Stabilisatoren und Konservierungsmittel
CRP	R1	TRIS- (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-) Puffer mit Rinderserumalbumin; Konservierungsmittel
	R2	Mit Anti-CRP (Maus) beschichtete Latexpartikel in Glycinpuffer; Immunglobuline (Maus); Konservierungsmittel

Tab. 2: Reagenzien zur Bestimmung des sTfR, des Ferritins und des CRP

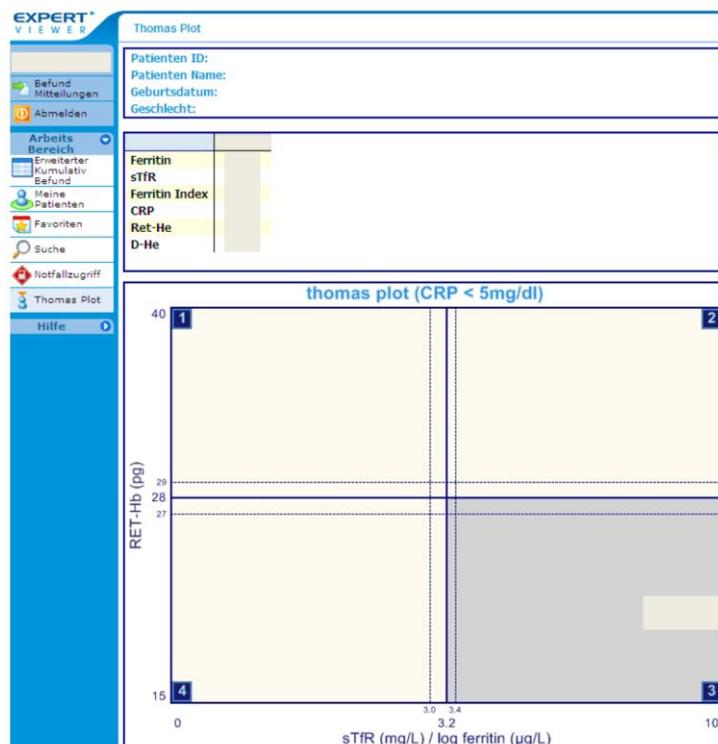
Die Analysen des sTfR (STRF 20763454122V4), des Ferritins (FERR3 04745515190V7), des CRP (CRPL3 04956842190V3) erfolgten anhand des cobas c 501 module für Roche/Hitachi cobas c Systeme, Roche Diagnostics GmbH.

2.3.2 Hard- und Software

2.3.2.1 EXPERTviewer®

Der EXPERTviewer ist ein hämatologisches Teleinformationssystem, das an der Charité-Universitätsmedizin gemeinsam mit der Firma Sysmex entwickelt wurde. Es basiert auf dem bereits vorhandenen Krankenhausinformationssystem (KIS) „Eclair“, ist jedoch spezialisiert auf die Übertragung von hämatologischen Befunden. Es kann nicht nur numerische Daten sondern auch Scattergramme, Histoplots, berechnete Graphiken, wie den Thomasplot oder den Haemaplot, und digitale Bilder darstellen. Sämtliche Befunde werden in einer zentralen Datenbank gesammelt und werden so als Komplettbefund abrufbar. Diese Komplettbefunde können über einen Standard-Webbrowser aus der Datenbank abgerufen werden. Der Abruf der Daten ist unabhängig vom Standort der Diagnostiksysteme. Innerhalb des Klinik-beziehungsweise Labornetzwerks ist der Zugriff auf die Daten, benutzername- sowie passwortgeschützt, von allen PC-Arbeitsplätzen möglich, die über einen Standard-Webbrowser, wie den Microsoft® Internet Explorer® oder Mozilla® Firefox®, verfügen.

Abb. 2: Der Thomasplot im EXPERTviewer

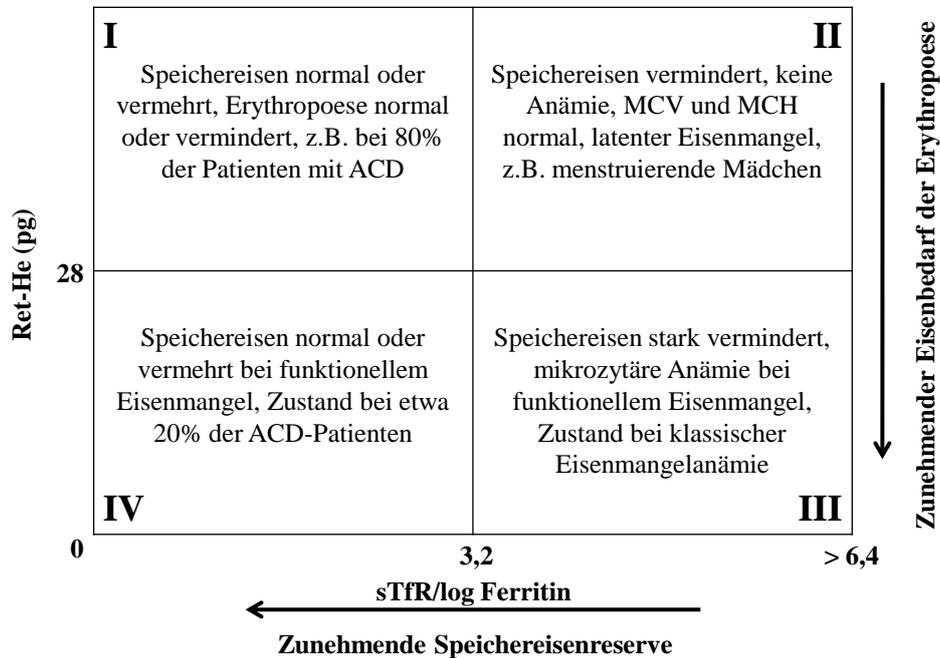


Der EXPERTviewer ist in drei verschiedenen Versionen verfügbar: „sis“, „lab“ und „ward“. Die Versionen unterscheiden sich im Umfang der nutzbaren Funktionen und in der Ausstattung der Hardware. Damit ist eine den jeweiligen Erfordernissen des Labors entsprechende Konfiguration des EXPERTviewers möglich. Der EXPERTviewer bietet webbrowsersbasierte Software, patientenselektive und auftragsbezogene Darstellung aller Befunde, Komplettbefunde mit allen hämatologischen und morphologischen Daten, patientenselektive Anzeige von Einzel- oder Kumulativbefunden, zahlreiche Funktionen für die Patienten- und Befundorganisation wie Suchen, Filtern, oder Sortieren, Zusatzfunktionen für die Bilddarstellung wie Zoomfunktion, Patientenorganisation einschließlich Farb- und Symbolcodes für die Befundkennzeichnung, Festlegung anwenderspezifischer Zugriffsrechte, optionale Archivierung aller Befunde ohne zeitliche Begrenzung.

Die hämatologischen Messwerte der untersuchten Probanden wurden aus der Datenbank des EXPERTviewers extrahiert und der Thomas- und Haemaplot auf diesem Weg beurteilt.

Thomasplot

Abb. 3: Thomasplot-diagnostisches Diagramm zur Klassifizierung des Eisenmangels

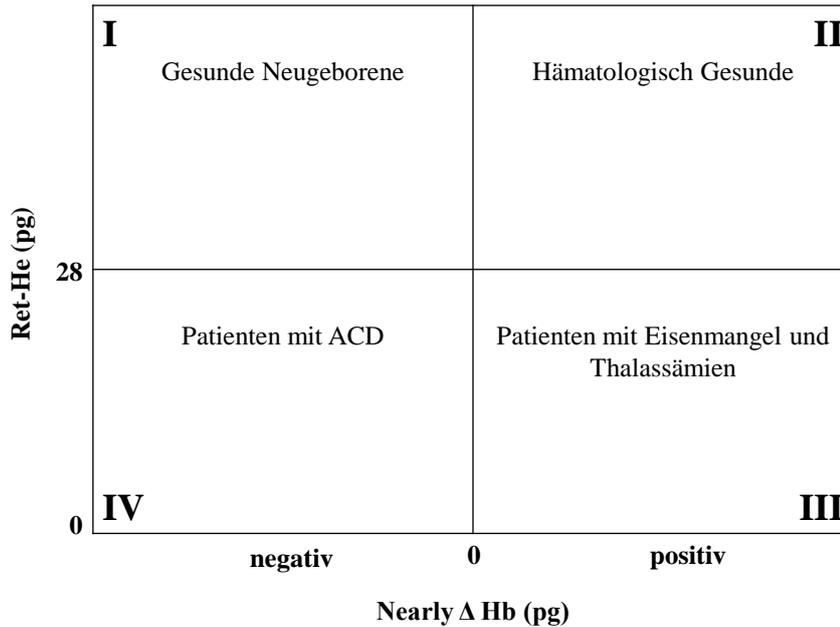


Es handelt sich um ein in vier Felder aufgeteiltes Koordinatensystem, auf dessen Achsen folgende Parameter aufgetragen werden: Der Ferritinindex erscheint als Quotient des gemessenen Serumspiegels des löslichen Transferrinrezeptors und des Logarithmus des Ferritinwertes (sTfR/log Ferritin) auf der X-Achse und das Hämoglobinäquivalent der Retikulozyten (Ret-He) auf der Y-Achse. Eine Teilung der Abszisse und der Ordinate

ermöglichen die Darstellung eines 4-feldrigen Diagramms. Dabei wird die Ordinate bei einem Wert des Ret- H_e von 28 pg geteilt, die Abszisse bei einem Ferritinindex von 3,2. Liegt eine Akute-Phase-Reaktion mit einem CRP-Wert > 5 mg/L vor, verschiebt sich der Entscheidungswert des Ferritinindexes von 3,2 auf 2,0.

Haemaplot

Abb. 4: Haemaplot-diagnostisches Diagramm zur Klassifizierung von Anämien



Der Haemaplot illustriert den Zusammenhang zwischen dem ndHb auf der X-Achse und dem Hämoglobinäquivalent der Retikulozyten (Ret- H_e) auf der Y-Achse. Mit dem ndHb kann nach dem gleichen Prinzip wie beim Thomasplot der 4-feldrige Haemaplot konstruiert werden.

2.3.2.2 SAP ECC®

Anhand des medizinischen Front-End-Systems SAP ECC 6,0 (SAP AG, Walldorf), das zu Zwecken des Patientenmanagements an der Charité-Universitätsmedizin genutzt wird, konnten Diagnosen und Therapien extrahiert werden. SAP ECC steht für SAP Enterprise-Resource-Planning Central Component, das heißt ein Unternehmens-Informationssystem. Es wird an der Charité nicht nur in der stationären und ambulanten Patientenorganisation, sondern auch im Rechnungswesen, der Personalwirtschaft und der Logistik genutzt.

2.4 Methodik

2.4.1 Fluoreszenzdurchflusszytometrie

Bei der Durchfluss- oder Flowzytometrie im Sysmex XE-2100 und XE-5000 werden die Blutproben aliquotiert und mit den angegebenen Reagenzien versetzt. Die Zellen durchqueren einzeln nacheinander in der Kapillare der Messkammer das Laserlicht. Es existieren mehrere Messkanäle, in denen simultan analysiert wird. Es kommt zeitgleich zur Erfassung der internen Zellstruktur, das heißt der Granularität, als auch des Zellvolumens. Dies erfolgt einerseits anhand optischer Parameter, so zum Beispiel der Absorption, des Streulichts und der Fluoreszenz, andererseits anhand von Messungen des elektrischen Widerstandes im Gleichstrom und im Wechselfeld. So können die Signale als Messwerte in einem Graphen dargestellt werden. Es kann somit durch Ermittlung dieser Messgrößen zu einer verlässlichen Differenzierung der Zellen kommen. Außerdem gibt es die Möglichkeit, Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern zu versetzen und so die Oberflächenmoleküle der verschiedenen Zellpopulationen zu identifizieren. Die Oberflächenmoleküle geben Auskunft über Funktion und Eigenschaften der Zellen.

2.4.1.1 Hämoglobinäquivalent der Retikulozyten (Ret-H_e)

Für diesen Messkanal zur Bestimmung der Retikulozyten und ihrer Altersstufen wird das Blut mit einem spezifischen Reagenziensystem inkubiert. RET-SEARCH (II) besteht aus einem Lysereagenz, welches die Membranen aller Blutzellen perforiert, und einem Fluoreszenzfarbstoff, der anschließend in die Zellen eindringt und sich an die vorhandenen Nukleinsäuren in Zellkern und Zytoplasma bindet. In der Durchflusszelle werden dann das Vorwärtstreulicht und die Fluoreszenzintensität analysiert. Aufgrund des deutlich höheren Nukleinsäuregehalts werden kernhaltige Zellen wie Leukozyten und Erythroblasten intensiver angefärbt und klar von den Retikulozyten getrennt. Erythrozyten dagegen enthalten so gut wie gar keine Nukleinsäuren und können deswegen eindeutig von den Retikulozyten unterschieden werden. Mit der Reifung der Retikulozyten nimmt der RNA-Gehalt in der Zelle kontinuierlich ab, sodass sich Retikulozyten in drei Altersstufen einteilen lassen: erstens die Gruppe der „reifen“ Retikulozyten („Low Fluorescence Reticulocyte“ oder LFR), zweitens die Gruppe der „halbreifen“ Retikulozyten („Medium Fluorescence Reticulocyte“ oder MFR) und drittens die Gruppe der „unreifen“ Retikulozyten („High Fluorescence Reticulocyte“ oder HFR). Gleichzeitig ermittelt der Sysmex XE-5000 in diesem Messkanal, ausgehend von der Analyse der Vorwärtstreulichtsignale der Retikulozytenpopulation, den Hämoglobingehalt dieser Zellen, ausgedrückt als Parameter RET-H_e.

2.4.1.2 Nearly Δ Hämoglobin (ndHb)

Diese Parameter werden ebenfalls durchflusszytometrisch bestimmt. Das ndHb ist die Differenz des Ret- H_e zum mittleren korpuskulären Hämoglobin (MCH) der Erythrozyten, welches anhand des Hämoglobins in der Einheit g/L und der Erythrozytenzahl in $10^{12}/L$ berechnet werden kann.

2.4.2 Immunturbidimetrie

Die Patientenprobe und im Überschuss zugesetzte Antikörper im Roche cobas 6000 modular bilden Antigen-Antikörper-Komplexe, die in den Reaktionsansatz eingestrahlt Licht einer geeigneten Wellenlänge streuen. Die Intensität des Streulichts hängt unter anderem von der Größe und der Anzahl der lichtstreuenden Partikel ab. Sie kann zum Beispiel durch den Zusatz von latexpartikelgebundenen Antikörpern und der daraus resultierenden starken Vergrößerung der Antigen-Antikörper-Komplexe erhöht werden. In der Immunturbidimetrie werden das durch die Messzelle durchtretende Licht und ein Teil des nach vorwärts gestreuten Lichts registriert. Die Abschwächung des Lichtes durch die Immunkomplexe entsteht durch Absorption, Streuung und Reflexion.

2.4.2.1 Löslicher Transferrinrezeptor (sTfR)

Der Tina-quant® soluble Transferrin Receptor Test ist ein In-vitro-Test zur quantitativen Bestimmung des sTfR. Die Messung geschieht mittels eines immunturbidimetrischen Verfahrens mit Reaktionsverstärkung durch Latexpartikel. Das Antigen sTfR aus der Blutprobe reagiert mit den sTfR-Antikörpern, die an Latexpartikel gebunden sind. Es bildet sich ein Antigen-Antikörper-Komplex. Dieser Niederschlag kann nach Agglutination turbidimetrisch mit dem Laborautomaten Roche COBAS 6000 Modular® von Roche Diagnostics bestimmt werden. Dies ist eine Trübungsmessung mittels Photometrie bei einer Nebenwellenlänge von 800 nm und einer Hauptwellenlänge von 570 nm. Für den Test werden Humanserum oder -plasma benötigt. Für die Bestimmung des löslichen Transferrinrezeptors reichen kleine Mengen von etwa 50 μL Probenmaterial aus. Die Angabe des sTfR erfolgt in mg/L.⁶⁷

2.4.2.2 Ferritin

Der genutzte In-vitro-Test Tina-quant® Ferritin Gen.3 dient der quantitativen Bestimmung von Ferritin in Humanserum und -plasma. Zur Ferritinbestimmung stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, wie der Radioimmunoassay (RIA), der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), der Fluoreszenzimmunoassay (FIA), der

Lumineszenzimmunoassay (LIA) und der nephelometrische Immunoassay. Der automatisierte Ferritintest von Roche beruht auf dem Prinzip des immunologischen Agglutinationstests mit Reaktionsverstärkung durch Latex. Es ist ein partikelverstärkter immunologischer Trübungstest, bei welchem Humanferritin mit Latexpartikeln agglutiniert, die mit Anti-Ferritin-Antikörpern beschichtet sind. Der Niederschlag wird turbidimetrisch bei 570/800 nm bestimmt und in der Einheit $\mu\text{g/L}$ angegeben.⁶⁸

2.4.2.3 Ferritinindex (sTfR/log Ferritin)

Anhand der gemessenen Werte des Ferritins und des löslichen Transferrinrezeptors kann der Ferritinindex berechnet werden. Der Ferritinindex ist der Quotient des sTfR und des Logarithmus des Ferritins. Der Index wird ohne Einheit angegeben.⁶⁹

2.4.2.4 C-reaktives Protein (CRP)

Der COBAS C-reactive Protein Gen.3 Test ist ein immunologischer Trübungstest zur quantitativen In-vitro-Bestimmung von CRP in Humanserum und -plasma. Humanes CRP agglutiniert mit Latexpartikeln, die mit monoklonalen Anti-CRP-Antikörpern beschichtet sind. Die Aggregate werden turbidimetrisch bei einer Nebenwellenlänge von 800 nm und einer Hauptwellenlänge von 570 nm bestimmt. Das Ergebnis trägt die Einheit mg/L .⁷⁰

2.5 Statistik

Alle statistischen Analysen wurden mit PASW® Version 18.0 (SPSS Inc., an IBM Company, Chicago, IL, USA) und SAS® 9.2 Software (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) für Windows durchgeführt. Folgende statistische Testverfahren kamen zur Anwendung:

- Die Untersuchung auf Normalverteilung der Parameter erfolgte mittels Betrachtung der Verteilung. Hierzu wurde die Schiefe der Verteilung der Parameter herangezogen. Die entsprechenden Histogramme wurden zur Bestätigung aufgezeichnet. Die Probandenpopulation wurde anhand von grundlegender Statistik, wie Mittelwerte und Standardabweichung (SD oder „standard deviation“) mit dem 95% Konfidenzintervall, charakterisiert. Wo immer möglich, wurde einfache deskriptive Statistik genutzt.
- Jeder der Parameter wurde mit dem Alter, dem Geschlecht und dem Krankheitszustand verglichen, um deren Beeinflussung zu evaluieren. Dies erfolgte mittels einer linearen Regressionsanalyse.

- Zur Verifizierung der linearen Regressionsanalyse wurde für die Parameter in SAS ein gemischtes Modell bestimmt. Dieses Modell beinhaltet nicht nur feste sondern auch zufällige (random) Effekte.
- Zur Erhebung der Referenzintervalle konnten aufgrund der Normalverteilung der Parameter die Perzentilen genutzt werden. Daher wurden von den Parametern sTfR, Ferritinindex, Ret-H_e und ndHb die 2,5. und 97,5 Perzentile, zur Feststellung des zentralen 95%-Referenzintervalls, in jeder Probandengruppe, untersucht.
- Zur Kompensierung des bei multipler Testung entstehenden Fehlers wurde ein Post-Hoc-Test, die Bonferroni-Korrektur, für die p-Werte angewandt.
- Eine „Receiver Operating Characteristic“ (ROC) -Analyse wurde für die Parameter sTfR, Ferritinindex und ndHb auch in Kombination mit Ret-H_e durchgeführt. ROC-Kurven wurden aufgetragen und die Flächen unter den Kurven („Area Under the Curve“ oder AUC) wurden zur Bemessung der diskriminativen Kraft, das heißt der Trennschärfe der Parameter zwischen gesund und ACD, beziehungsweise gesund und IDA und gesund und NI, berechnet. Die diagnostische Güte der untersuchten Parameter wurde anhand ihrer diagnostischen Sensitivität, Spezifität sowie der Erhebung eines Cut-Off-Wertes, definiert.
- Die gemessenen Werte der untersuchten Parameter wurden in den diagnostischen Plots und sowohl im Thomasplot als auch im Haemaplot aufgetragen.

3. ERGEBNISSE

Die insgesamt 373 untersuchten Probanden, bei denen von den behandelnden Klinikärzten Blutuntersuchungen angefordert wurden, befanden sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme in ambulanter ($n=166$) oder stationärer ($n=207$) Behandlung oder zur Konsultation aus anderen Kliniken im Otto-Heubner-Centrum für Kinder- und Jugendmedizin am Standort Virchow-Klinikum der Charité-Universitätsmedizin Berlin.

3.1 Normalverteilung der Parameter im Probandenkollektiv

Die Daten von sTfR, Ferritinindex, Ret-H_e und ndHb erwiesen sich als normalverteilt, mit einer Schiefe zwischen -1 und 1. Die entsprechenden Histogramme wurden erstellt und bewertet, sie konnten die Normalverteilung verifizieren. Die Verteilung der Werte ist für die Abgrenzung des normalen Spektrums von entscheidender Bedeutung. Viele Parameter folgen einer Normalverteilung, bei der man den Mittelwert (MW) plus oder minus der zweifachen Standardabweichung (SD) als Normbereich angibt. Dies erwies sich auch in dieser Arbeit als zutreffend. Zur Darstellung der Parameter konnten daher der Mittelwert mit dessen Standardabweichung in Kombination mit dessen 95%-Konfidenzintervall (KI) gewählt werden.

3.2 Einflussfaktoren auf die Parameter

Neben der Darstellung der Verteilung ist es wichtig, mögliche Einflussfaktoren auf die Konzentration der Parameter im Serum zu identifizieren. Für die folgenden Faktoren wurden die Zusammenhänge mit den Parametern untersucht: Geschlecht, Alter und Probandenkollektiv der Kinder und Jugendlichen. Mögliche mit diesen Faktoren verbundene Unterschiede in den gemessenen Konzentrationen der verschiedenen Parameter wurden mit Hilfe einer Regressionsanalyse, der linearen Regression (LR), bestimmt. Das so bestimmte Signifikanzniveau wurde mittels eines gemischten Modells (GM) verifiziert, die Signifikanzen zeigten mit den beiden Methoden nahezu völlige Übereinstimmung.

Es ergab sich für alle Parameter bezüglich der Zuordnung mittels der vier Parameter zu den Probandengruppen ein gutes Signifikanzniveau ($p<0,001$). Zur Bemessung der Beziehung der Parameter zum Alter erfolgte eine Transformation des Alters. Es wurde zunächst der Mittelwert des Alters aller Patienten berechnet. Dieser Mittelwert (MW(Alter)) wurde

daraufhin von dem Alter jedes einzelnen Probanden des Kollektivs subtrahiert und so eine neue, somit vergleichbare Variable für das Alter geschaffen.

Der sTfR-Wert erwies sich als nicht von Geschlecht sowie Alter der Probanden beeinflusst. Lediglich die Zugehörigkeit zu einer der Probandengruppen zeigte einen relevanten Zusammenhang mit dem sTfR-Wert.

sTfR (mg/L)	p-Werte	
	LR ($R^2=0,385$)	GM
Geschlecht	0,107	0,117
Probandengruppe	<0,001*	<0,001*
Alter-MW(Alter)	0,115	0,239

Tab. 3: p-Werte der LR sowie des GM für den sTfR (* $p < 0,01$)

Für die Messungen des Ferritinindex konnte gegenüber dem Alter der Probanden kein relevanter Zusammenhang gefunden werden, jedoch für das Geschlecht sowie deutlicher noch für die Zugehörigkeit zu den Probandengruppen.

Ferritinindex (sTfR/log Ferritin)	p-Werte	
	LR ($R^2=0,457$)	GM
Geschlecht	0,027*	0,0329*
Probandengruppe	<0,001*	<0,001*
Alter-MW(Alter)	0,089	0,290

Tab. 4: p-Werte der LR sowie des GM für den Ferritinindex (* $p < 0,01$)

Sowohl für das Geschlecht als auch für das Alter und für die Probandengruppen der Kohorte stellte sich ein signifikanter Zusammenhang mit den bestimmten Ret- H_e -Werten heraus.

Ret- H_e (pg)	p-Werte	
	LR ($R^2=0,449$)	GM
Geschlecht	0,039*	0,039*
Probandengruppe	<0,001*	<0,001*
Alter-MW(Alter)	<0,001*	<0,001*

Tab. 5: p-Werte der LR sowie des GM für das Ret- H_e (* $p < 0,01$)

Wie auch für den Ferritinindex ergab sich für die ndHb-Messungen ein Zusammenhang mit dem Geschlecht, deutlicher noch mit der Probandengruppe der Patienten und kein Zusammenhang mit dem Alter der Patienten.

ndHb (pg)	p-Werte	
	LR (R ² =0,170)	GM
Geschlecht	0,028*	0,028*
Probandengruppe	<0,001*	<0,001*
Alter-MW(Alter)	0,107	0,107

Tab. 6: p-Werte der LR sowie des GM für das ndHb (* $p < 0,01$)

3.3 Altersverteilung in den Probandengruppen

Es wurden pädiatrische Patienten im Alter zwischen 3 Monaten und 18 Jahren eingeschlossen. Das gesamte Kollektiv, das sich auf 373 Messungen belief, befand sich durchschnittlich im Alter von $9,19 \pm 5,79$ (8,60-9,78) Jahre. Die Tabelle 7 zeigt die Altersverteilung in den vier Gruppen der Probanden sowie für das gesamte Kollektiv. Der Mittelwert des Alters der IDA- und ferner der NI-Probanden erwies sich als niedriger als der der restlichen Gruppen.

Probandengruppe (n)	MW	SD	95% KI des MW	
			Untergrenze	Obergrenze
gesund (234)	9,82	5,47	9,11	10,52
ACD (80)	9,08	6,31	7,67	10,48
NI (22)	5,90	5,67	3,39	8,42
IDA (37)	7,40	5,79	5,47	9,34
Total (373)	9,19	5,79	8,60	9,78

Tab. 7: MW mit SD sowie 95% KI des MW des Alters der Probanden nach Probandengruppe

3.4 Referenzwerte für die Parameter

Die Messung der Serumkonzentration der Parameter in der Kontrollgruppe ($n=234$) diente der Festlegung eines Normalwertes in der pädiatrischen Population. Die 2,5. sowie 97,5. Perzentilen stehen für den zentralen 95%-Referenzintervall (RI).

Es erfolgte eine klinisch gestützte Einteilung des gesunden Kollektivs in fünf Altersgruppen:

- von 3 bis 6 Monate die Säuglinge,
- von einem halben Jahr bis 2 Jahren die Kleinkinder,
- von 2 bis 6 Jahren die Vorschulkinder,
- von 6 bis 12 Jahren entsprechend die Schulkinder und
- von 12 bis 18 Jahren die Jugendlichen.

Altersgruppe (n)	MW	SD	95% KI des MW	
			Untergrenze	Obergrenze
3-6 Monate (19)	0,30	0,05	0,28	0,33
0,5-2 Jahre (18)	1,14	0,44	0,92	1,36
2-6 Jahre (25)	4,31	1,27	3,78	4,83
6-12 Jahre (77)	9,49	1,64	9,11	9,86
12-18 Jahre (95)	15,09	1,61	14,76	15,41

Tab. 8: MW mit SD sowie 95% KI des MW des Alters der Probanden nach Altersgruppe

Die Referenzintervalle des sTfR, Ferritinindex, Ret-H_e und ndHb entsprechend dem Geschlecht in den verschiedenen Altersgruppen wurden in den Tabellen 9 bis 12 aufgetragen. Die Referenzintervalle der Parameter Ferritinindex ($p=0,027$), Ret-H_e ($p=0,039$) und ndHb ($p=0,028$) erwiesen sich in Hinsicht auf das Geschlecht der Probanden, Mädchen ($n=124$) und Jungen ($n=110$), als statistisch signifikant. Es erfolgte daraufhin eine Einteilung nach Geschlecht für diese Parameter. Die Messungen bei weiblichen Probanden ergaben stets tendenziell niedrigere Messwerte für den Ferritinindex, Ret-H_e sowie ndHb. Der Parameter sTfR erwies sich als nicht signifikant vom Geschlecht des Patienten beeinflusst ($p=0,107$), so dass weibliche und männliche Probanden gemeinsam betrachtet werden konnten.

sTfR (mg/L)	männlich				weiblich						
	Altersgruppe (n)	n	MW	SD	95% KI des MW		n	MW	SD	95% KI des MW	
					Untergrenze	Obergrenze				Untergrenze	Obergrenze
3-6 Monate (19)	12	3,15	1,20	2,39	3,91	7	2,48	0,67	1,86	3,10	
0,5-2 Jahre (18)	8	2,76	0,73	2,15	3,38	10	3,64	0,83	3,05	4,23	
2-6 Jahre (25)	15	3,57	0,59	3,25	3,89	10	3,69	0,62	3,25	4,14	
6-12 Jahre (77)	33	3,67	0,82	3,37	3,96	44	3,45	0,69	3,24	3,66	
12-18 Jahre (95)	42	3,31	0,96	3,01	3,61	53	2,99	0,79	2,78	3,21	

Tab. 9: MW mit SD sowie 95% KI des MW der sTfR-Werte nach Geschlecht und Altersgruppe

Ferritinindex (sTfR/log Ferritin)	männlich				weiblich						
	Altersgruppe (n)	n	MW	SD	95% KI des MW		n	MW	SD	95% KI des MW	
					Untergrenze	Obergrenze				Untergrenze	Obergrenze
3-6 Monate (19)	12	1,50	0,56	1,15	1,85	7	1,27	0,39	0,91	1,63	
0,5-2 Jahre (18)	8	1,68	0,69	1,11	2,25	10	2,13	0,57	1,72	2,53	
2-6 Jahre (25)	15	2,42	0,47	2,16	2,68	10	2,30	0,47	1,97	2,64	
6-12 Jahre (77)	33	2,24	0,51	2,06	2,43	44	2,11	0,48	1,96	2,26	
12-18 Jahre (95)	42	2,06	0,54	1,89	2,23	53	1,95	0,61	1,78	2,12	

Tab. 10: MW mit SD sowie 95% KI des MW der Ferritinindex-Werte nach Geschlecht und Altersgruppe

Ret-H _e (pg)	männlich				weiblich						
	Altersgruppe (n)	n	MW	SD	95% KI des MW		n	MW	SD	95% KI des MW	
					Untergrenze	Obergrenze				Untergrenze	Obergrenze
3-6 Monate (19)	12	30,28	1,24	29,49	31,06	7	30,61	1,80	28,95	32,28	
0,5-2 Jahre (18)	8	31,01	1,97	29,37	32,66	10	30,43	1,39	29,43	31,43	
2-6 Jahre (25)	15	30,93	2,24	29,68	32,17	10	31,41	3,63	28,81	34,01	
6-12 Jahre (77)	33	31,75	1,90	31,08	32,43	44	31,46	1,95	30,87	32,05	
12-18 Jahre (95)	42	32,69	1,51	32,22	33,16	53	32,38	1,90	31,86	32,91	

Tab. 11: MW mit SD sowie 95% KI des MW der Ret-H_e-Werte nach Geschlecht und Altersgruppe

ndHb (pg)	männlich					weiblich				
	MW	SD	95% KI des MW		MW	SD	95% KI des MW			
Altersgruppe (n)	n		Untergrenze	Obergrenze	n		Untergrenze	Obergrenze		
3-6 Monate (19)	12	1,85	1,90	0,64	3,06	7	2,11	1,67	0,57	3,66
0,5-2 Jahre (18)	8	3,80	2,18	1,98	5,62	10	3,42	1,48	2,36	4,48
2-6 Jahre (25)	15	3,67	1,78	2,68	4,65	10	3,38	2,57	1,54	5,22
6-12 Jahre (77)	33	4,16	1,33	3,69	4,63	44	3,90	1,63	3,40	4,40
12-18 Jahre (95)	42	3,59	1,45	3,14	4,04	53	3,28	1,76	2,80	3,77

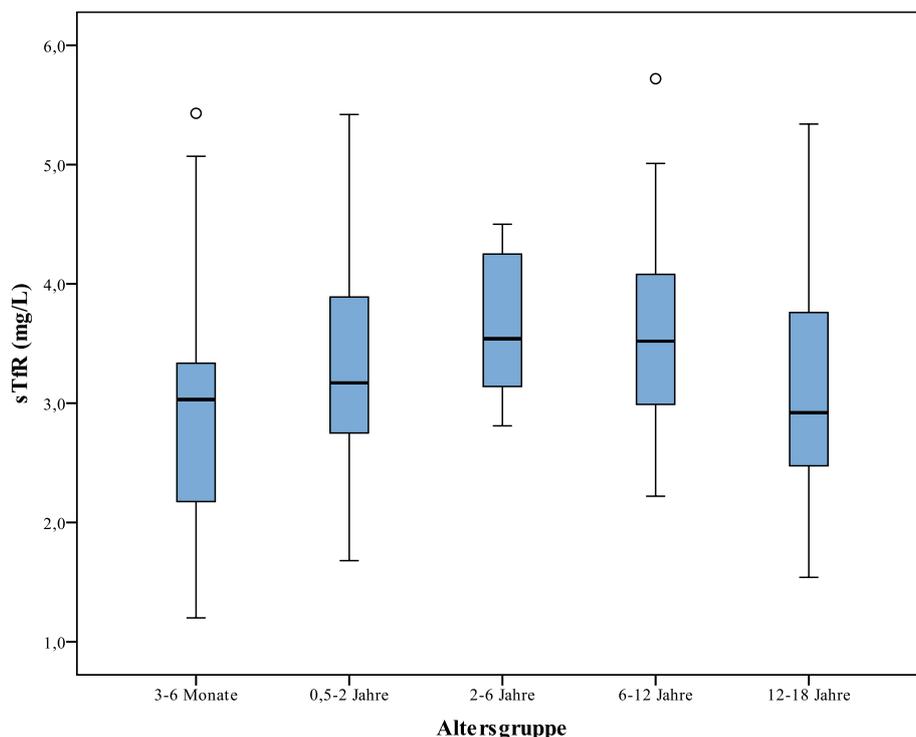
Tab. 12: MW mit SD sowie 95% KI des MW der ndHb-Werte nach Geschlecht und Altersgruppe

Der Mittelwert der untersuchten Parameter befand sich für die gesunden Probanden bei 3,31 mg/L für den sTfR und 2,04 für den Ferritinindex, mit einem Konfidenzintervall von 3,20-3,42 mg/L sowie entsprechend 1,97-2,12.

In den Abbildungen 5 bis 8 ist die Verteilung der gemessenen Parameter in den Altersgruppen dargestellt. Die Referenzwerte der Parameter in den verschiedenen Altersgruppen wurden in den Tabellen 13 bis 16 zusammengefasst. Die eingezeichneten Kreise entsprechen zwei Einzelmessungen außerhalb des Konfidenzbereichs, den sogenannten „Ausreißern“.

sTfR stieg bei den Messungen mit dem Alter bis zu einem Höchstwert zwischen dem zweiten bis sechsten Lebensjahr, um dann sich wieder den Werten des Kleinkindalters anzunähern. In den Altersgruppen zwischen 3 und 6 Monaten sowie zwischen 6 und 12 Jahren zeigte sich jeweils ein Ausreißer jenseits der Obergrenze der 95% KI des MW und der 97,5. Perzentile.

Abb. 5: Referenzwerte des sTfR entsprechend der Altersgruppe

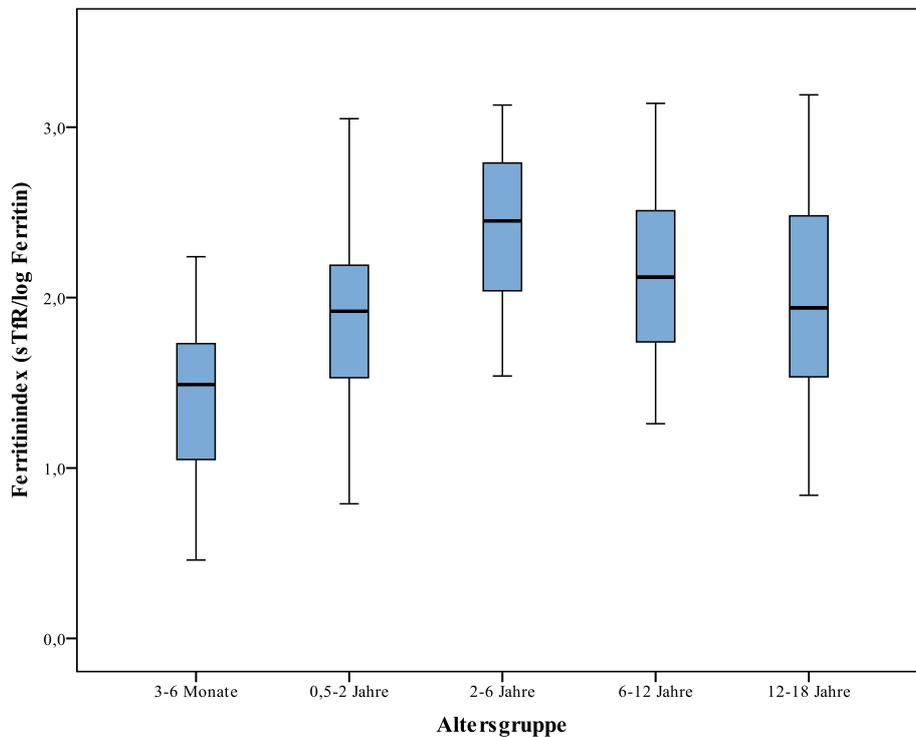


sTfR (mg/L)	MW	SD	95% KI des MW		Perzentilen	
Altersgruppe (n)			Untergrenze	Obergrenze	2,5.	97,5.
3-6 Monate (19)	2,90	1,06	2,39	3,42	1,20	5,27
0,5-2 Jahre (18)	3,25	0,89	2,81	3,69	1,68	4,81
2-6 Jahre (25)	3,62	0,59	3,38	3,86	2,81	4,48
6-12 Jahre (77)	3,54	0,75	3,37	3,71	2,32	5,05
12-18 Jahre (95)	3,13	0,88	2,95	3,31	1,60	5,02

Tab. 13: MW und zentraler Referenzintervall des sTfR in den Altersgruppen

Der Ferritinindex wies einen ähnlichen Verlauf wie der sTfR-Wert vor. Es zeigte sich ein progressiver Anstieg der Messwerte bis hin zu einem Maximum zwischen 2 und 6 Jahren. Darauf folgte ein langsamer Abfall der Intervalle bis zu einem Angleich an die der Erwachsenen. Diese sind in Hinsicht auf den Ausgangswert im Säuglingsalter höher.

Abb. 6: Referenzwerte des Ferritinindex entsprechend der Altersgruppe



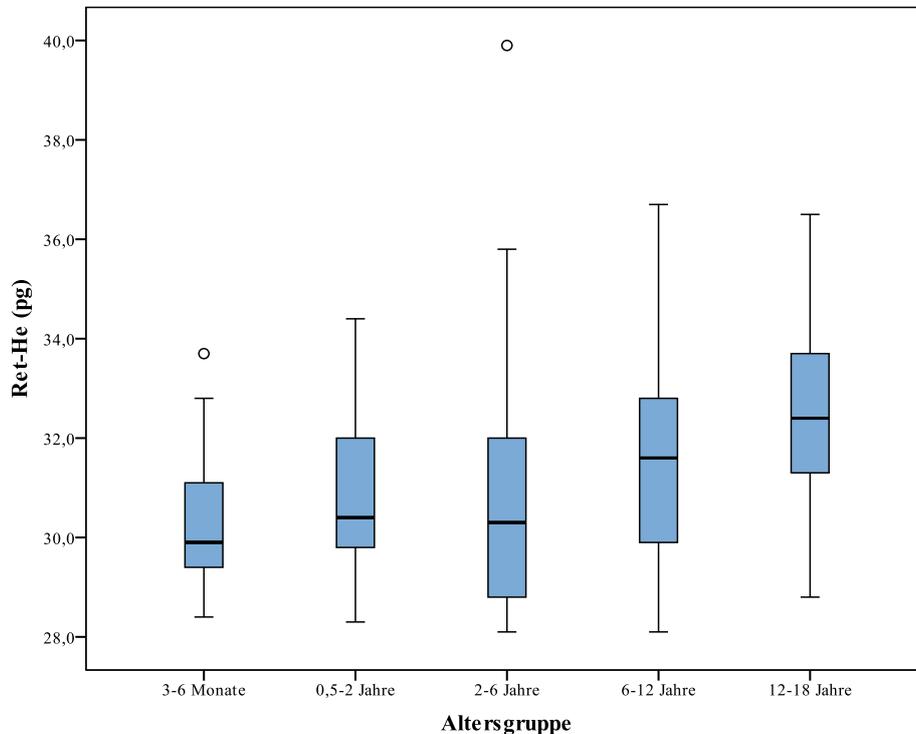
Ferritinindex (sTfR/log Ferritin)	MW	SD	95% KI des MW		Perzentilen	
Altersgruppe (n)			Untergrenze	Obergrenze	2,5.	97,5.
3-6 Monate (19)	1,41	0,50	1,17	1,66	0,46	2,20
0,5-2 Jahre (18)	1,93	0,64	1,61	2,25	0,79	3,02
2-6 Jahre (25)	2,37	0,46	2,18	2,56	1,54	3,03
6-12 Jahre (77)	2,17	0,50	2,05	2,28	1,30	3,10
12-18 Jahre (95)	2,00	0,58	1,88	2,12	0,92	3,15

Tab. 14: MW und zentraler Referenzintervall des Ferritinindex in den Altersgruppen

Das Ret-H_e begann mit niedrigen Werten im Säuglingsalter, um dann mit dem Alter der Probanden schrittweise anzusteigen. In der Gruppe zwischen 3 und 6 Monaten sowie

zwischen 2 und 6 Jahren konnte jeweils ein Ausreißer erkannt werden. Dieser befand sich in beiden Fällen weit oberhalb der übrigen Messwerte. Diese „Ausreißer“ sind als Kreise gekennzeichnet.

Abb. 7: Referenzwerte des Ret-H_e entsprechend der Altersgruppe

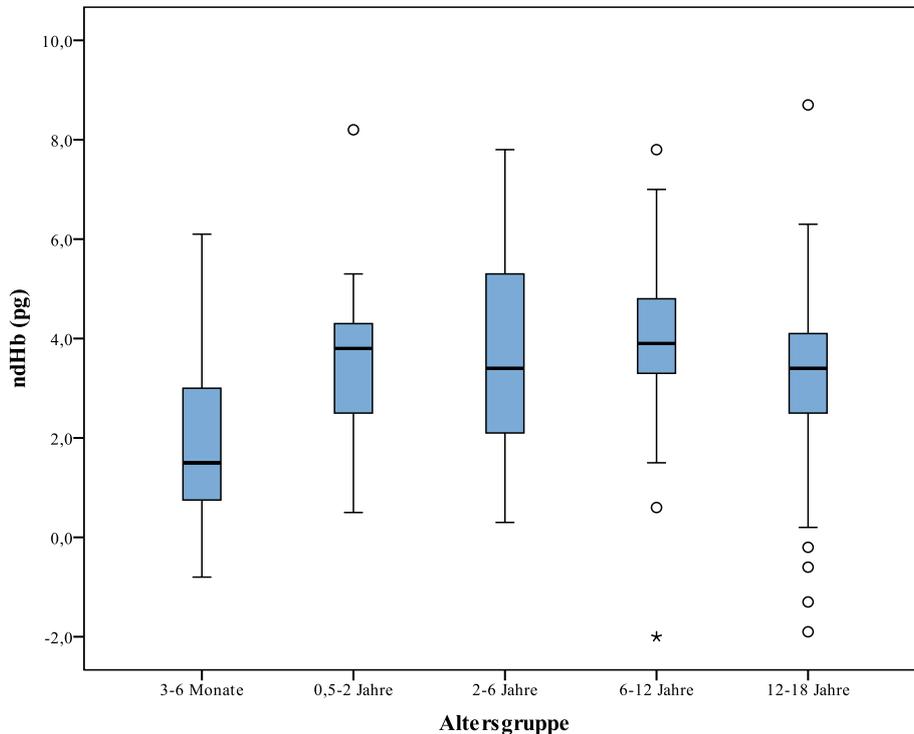


Ret-H _e (pg)	MW	SD	95% KI des MW		Perzentilen	
Altersgruppe (n)			Untergrenze	Obergrenze	2,5.	97,5.
3-6 Monate (19)	30,40	1,43	29,71	31,09	28,40	33,30
0,5-2 Jahre (18)	30,69	1,65	29,87	31,51	28,30	33,72
2-6 Jahre (25)	31,12	2,82	29,96	32,28	28,10	37,44
6-12 Jahre (77)	31,59	1,92	31,15	32,02	28,29	35,75
12-18 Jahre (95)	32,52	1,74	32,17	32,87	29,24	36,32

Tab. 15: MW und zentraler Referenzintervall des Ret-H_e in den Altersgruppen

Der Verlauf des ndHb glich dem des Ferritinindex bezüglich der Entwicklung der Mittelwerte in den Altersgruppen. Säuglinge zeigten die niedrigsten Messergebnisse und es konnte bei den darauf folgenden Gruppen einen Anstieg beobachtet werden. In den drei mittleren Altersgruppen waren die Werte nahezu konstant. Im Alter zwischen 12 und 18 Jahren erwiesen sich die Werte als marginal niedriger. Unter allen ndHb-Messungen ergaben sich insgesamt neun Ausreißer. Vier dieser Ausreißer traten in der Gruppe der Jugendlichen auf - hin zu niedrigeren Werten gegenüber dem Referenzbereich. Ansonsten handelte es sich um nur einzelne abweichende Ausreißer. Die eingezeichneten „Ausreißer“ sind als Kreise gekennzeichnet.

Abb. 8: Referenzwerte des ndHb entsprechend der Altersgruppe



ndHb (pg)	MW	SD	95% KI des MW		Perzentilen	
Altersgruppe (n)			Untergrenze	Obergrenze	2,5.	97,5.
3-6 Monate (19)	1,95	1,77	1,09	2,80	-0,80	5,61
0,5-2 Jahre (18)	3,59	1,77	2,71	4,47	0,50	6,97
2-6 Jahre (25)	3,55	2,08	2,69	4,41	0,30	7,32
6-12 Jahre (77)	4,01	1,50	3,67	4,35	0,47	7,04
12-18 Jahre (95)	3,42	1,63	3,09	3,75	-1,02	6,18

Tab. 16: MW und zentraler Referenzintervall des ndHb in den Altersgruppen

3.5 Vergleich der Studiengruppen gegenüber der Kontrollgruppe

Nach Ermittlung der Referenzwerte für die Parameter konnte der Vergleich zwischen Kontroll- und Studiengruppe geführt werden. Die statistische Analyse erfolgte mit der Bonferroni-Methode, einem Post-Hoc-Test basierend auf dem vormals durchgeführten gemischten Modell und der linearen Regression.

	Ferritinindex (sTfR/log Ferritin)	sTfR (mg/L)	Ret-He (pg)	ndHb (pg)
gesund gg. ACD	0,044*	<0.001*	<0.001*	<0.001*
gesund gg. NI	1,000	0,165	<0.001*	<0.001*
gesund gg. IDA	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*
ACD gg. NI	1,000	1,000	0,010*	0,418
ACD gg. IDA	<0.001*	<0.001*	0,329	<0.001*
NI gg. IDA	<0.001*	<0.001*	0,948	0,022*

Tab. 17: p-Werte im Vergleich der Probandengruppen

Die Ergebnisse erwiesen sich als hoch signifikant für ndHb. NdHb ermöglichte eine Unterscheidung nicht nur von Studiengruppe, das heißt im einzelnen IDA, ACD sowie NI, gegenüber der Kontrollgruppe sondern ermöglichte ebenso die Unterscheidung von ACD sowie NI gegenüber IDA. Diese Qualität zeigte auch der Ferritinindex und der sTfR, jedoch nicht das Ret-H_e.

Die Serumspiegel der Parameter in den Probandenkollektiven wurden in den Tabellen 18 bis 21 zusammengefasst. Im Vergleich zu gesunden Kindern zeigte sich der sTfR als signifikant höher bei Kindern mit IDA ($p < 0,001$) und ACD ($p < 0,001$). Der Ferritinindex stellte sich bei IDA-Kindern ($p < 0,001$) und auch bei ACD-Kindern ($p = 0,044$) gegenüber gesunden Kindern ebenso als signifikant höher dar.

Die Messergebnisse finden sich in Tabelle 17. Für alle untersuchten Parameter resultierten statistisch signifikante Ergebnisse, welche die Unterscheidung zwischen gesunden und erkrankten Kindern, das heißt den Gruppen IDA, ACD sowie NI ermöglichen.

Wie nahezu alle konventionellen hämatologischen und biochemischen Parameter zeigten die gemessenen Werte von Ret-H_e und ndHb statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollkohorte und der IDA-Patientengruppe, sowie zwischen der Kontrollkohorte und ACD-Patienten. Ebenso ergab sich ein deutlicher Unterschied zwischen IDA- und ACD-Patienten hinsichtlich des Ferritinindex, des sTfR und des ndHb. Hingegen wiesen die NI-Patienten gegenüber der Kontrollkohorte nur signifikante Differenzen des Ret-H_e sowie ndHb auf. Die NI-Patientengruppe zeigte gegenüber den ACD-Patienten eine Differenz des Ret-H_e und gegenüber den IDA-Patienten des Ferritinindex, sTfR und ndHb.

In den ACD-, NI- und IDA-Probandengruppen ließen sich im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant höhere sTfR- sowie Ferritinindex-Werte beobachten. Das Ausmaß der Differenz zum Referenzintervall schwankte je nach Probandengruppen. Für den Ferritinindex war die Differenz bei IDA-Probanden am ausgeprägtesten, es folgten ACD- und am dichtesten NI-Probanden. Das entsprechende Verhältnis für den sTfR zeigte sich relativ vergleichbar.

sTfR (mg/L)	MW	SD	95% KI des MW	
Probandengruppe (n)			Untergrenze	Obergrenze
gesund (234)	3,31	0,85	3,20	3,42
ACD (80)	4,08	1,02	3,85	4,30
NI (22)	3,78	1,22	3,24	4,31
IDA (37)	6,05	1,15	5,67	6,43

Tab. 18: MW des sTfR in den Probandengruppen

Ferritinindex (sTfR/log Ferritin) Probandengruppe (n)	MW	SD	95% KI des MW	
			Untergrenze	Obergrenze
gesund (234)	2,04	0,58	1,97	2,12
ACD (80)	2,26	0,62	2,12	2,40
NI (22)	2,18	0,84	1,81	2,55
IDA (37)	4,67	0,78	4,40	4,93

Tab. 19: MW des Ferritinindex in den Probandengruppen

Ret-He (pg) Probandengruppe (n)	MW	SD	95% KI des MW	
			Untergrenze	Obergrenze
gesund (234)	31,75	2,03	31,49	32,01
ACD (80)	24,29	2,96	23,63	24,95
NI (22)	26,10	2,56	24,96	27,23
IDA (37)	25,19	2,75	24,28	26,11

Tab. 20: MW des Ret-He in den Probandengruppen

ndHb (pg) Probandengruppe (n)	MW	SD	95% KI des MW	
			Untergrenze	Obergrenze
gesund (234)	3,52	1,74	3,30	3,75
ACD (80)	-0,18	2,01	-0,63	0,27
NI (22)	0,59	1,71	-0,17	1,35
IDA (37)	1,98	1,25	1,56	2,39

Tab. 21: MW des ndHb in den Probandengruppen

Parameter des Profil F nach Geschlecht in den Probandengruppen

Die Erhebung schloss 168 männliche und 205 weibliche Probanden ein. In den Tabellen 22 bis 25 ist der Mittelwert der Parameter aufgetragen. Eine Differenz hinsichtlich des Geschlechts zeigte sich für den Parameter sTfR als nicht statistisch signifikant. Die Differenzen für die drei anderen Parameter zeigten jedoch eine Signifikanz. Die Messwerte des Ferritinindex, des Ret-He sowie des ndHb für männliche Probanden erwiesen sich als höher im Vergleich zu denen der weiblichen Probanden.

sTfR (mg/L) Probandengruppe (n)	männlich				weiblich			
	n	MW	SD	95% KI des MW Untergrenze Obergrenze	n	MW	SD	95% KI des MW Untergrenze Obergrenze
gesund (234)	110	3,39	0,91	3,22 3,57	124	3,23	0,79	3,09 3,37
ACD (80)	28	3,99	1,03	3,59 4,39	52	4,13	1,01	3,84 4,41
NI (22)	8	3,63	1,51	2,37 4,89	14	3,86	1,07	3,24 4,47
IDA (37)	22	6,33	1,15	5,81 6,84	15	5,64	1,05	5,06 6,23

Tab. 22: MW der sTfR-Werte nach Geschlecht und Probandengruppe

Ferritinindex (sTfR/log Ferritin) Probandengruppe (n)	männlich				weiblich			
	n	MW	SD	95% KI des MW Untergrenze Obergrenze	n	MW	SD	95% KI des MW Untergrenze Obergrenze
gesund (234)	110	2,08	0,59	1,96 2,19	124	2,01	0,58	1,91 2,11
ACD (80)	28	2,22	0,64	1,97 2,47	52	2,28	0,62	2,11 2,46
NI (22)	8	2,28	1,10	1,37 3,20	14	2,12	0,69	1,72 2,52
IDA (37)	22	4,78	0,74	4,45 5,11	15	4,50	0,84	4,03 4,96

Tab. 23: MW der Ferritinindex-Werte nach Geschlecht und Probandengruppe

Ret-He (pg)	männlich				weiblich					
	MW	SD	95% KI des MW		MW	SD	95% KI des MW			
Probandengruppe (n)	n		Untergrenze	Obergrenze	n		Untergrenze	Obergrenze		
gesund (234)	110	31,78	1,92	31,42	32,15	124	31,72	2,13	31,34	32,10
ACD (80)	28	24,43	2,79	23,34	25,51	52	24,22	3,07	23,36	25,07
NI (22)	8	26,00	2,15	24,20	27,80	14	26,15	2,85	24,51	27,79
IDA (37)	22	25,24	2,70	24,04	26,43	15	25,13	2,92	23,52	26,75

Tab. 24: MW der Ret-H_e-Werte nach Geschlecht und Probandengruppe

ndHb (pg)	männlich				weiblich					
	MW	SD	95% KI des MW		MW	SD	95% KI des MW			
Probandengruppe (n)	n		Untergrenze	Obergrenze	n		Untergrenze	Obergrenze		
gesund (234)	110	3,60	1,68	3,28	3,91	124	3,45	1,79	3,14	3,77
ACD (80)	28	-0,15	2,03	-0,93	0,64	52	-0,20	2,02	-0,76	0,37
NI (22)	8	0,46	1,36	-0,68	1,60	14	0,66	1,92	-0,45	1,78
IDA (37)	22	2,18	1,29	1,60	2,75	15	1,68	1,17	1,03	2,33

Tab. 25: MW der ndHb-Werte nach Geschlecht und Probandengruppe

3.5.1 Diagnostische Trennschärfe der Parameter

Der diagnostische Wert eines hämatologischen Parameters lässt sich durch die Angabe der Sensitivität und Spezifität beschreiben. Bei einem diagnostischen Test ist der Grenzwert entscheidend, ab dem ein positives Ergebnis angezeigt werden soll. Für einen Screeningtest wird eine hohe Sensitivität gefordert, das heißt: es sollen möglichst alle kranken Personen auch als solche erkannt werden. Bei einem Bestätigungstest ist wiederum die Spezifität von großer Bedeutung, da hier möglichst keine Gesunden als krank eingestuft werden sollen. Der Grenzwert für die Konzentration der Parameter im Serum wurde durch eine ROC („Receiver Operating Characteristic“) -Kurve festgelegt (Abbildungen 9 und 10). Die Berechnung erfolgte für die drei Studiengruppen im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

Für alle diagnostischen Ansichten erlangte der Parameter Ret-H_e höhere Trennschärfe gegenüber den anderen Parametern. Dieser Parameter unterscheidet in diesem Probandenkollektiv sicher zwischen hämatologisch krank und hämatologisch gesund. Der für sTfR ermittelte Cut-Off-Wert ergab für die drei Krankheitskollektive einen Wert nahe 28 pg.

Parameter	AUC	SD	95% KI	
			Untergrenze	Obergrenze
Ferritinindex (sTfR/log Ferritin)	1			
sTfR (mg/L)	0,990	0,004	0,982	0,999
Ret-He (pg)	1			
ndHb (pg)	0,776	0,039	0,700	0,852

Tab. 26: AUC für die Parameter des Profil F zur Differenzierung von IDA

	sTfR (mg/L)	Ferritinindex	Ret-He (pg)	ndHb (pg)
Cut-Off-Wert	4,64	3,26	28,00	2,85
Sensitivität (%)	100,00	100,00	100,00	78,38
Spezifität (%)	93,59	100,00	100,00	70,09

Tab. 27: Diagnostische Sensitivität und Spezifität für die Parameter bei IDA-Patienten beim Cut-Off-Wert

Abb. 9: ROC-Kurve für die Parameter Ferritinindex und sTfR zur Diagnostik von IDA

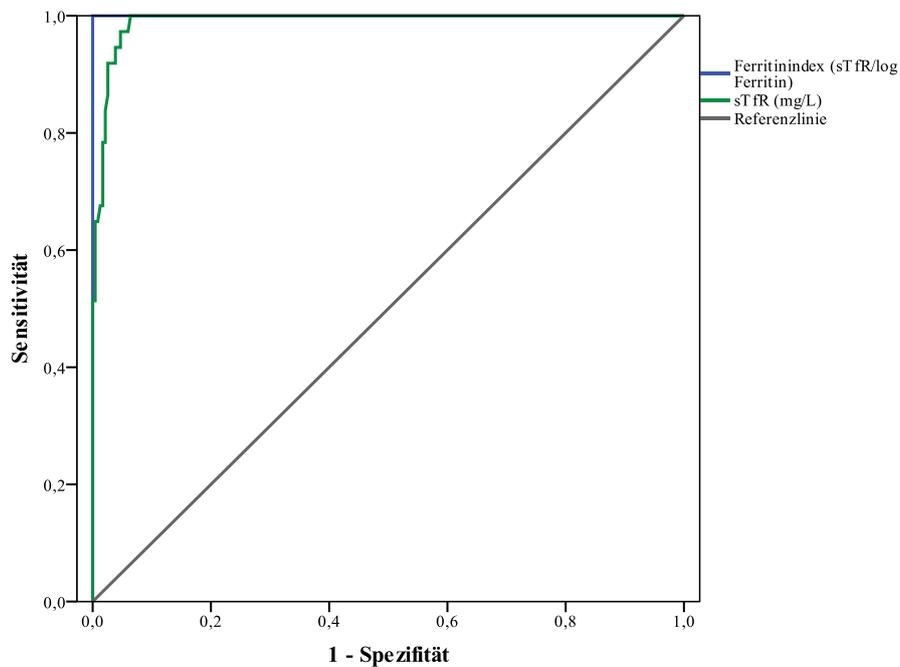
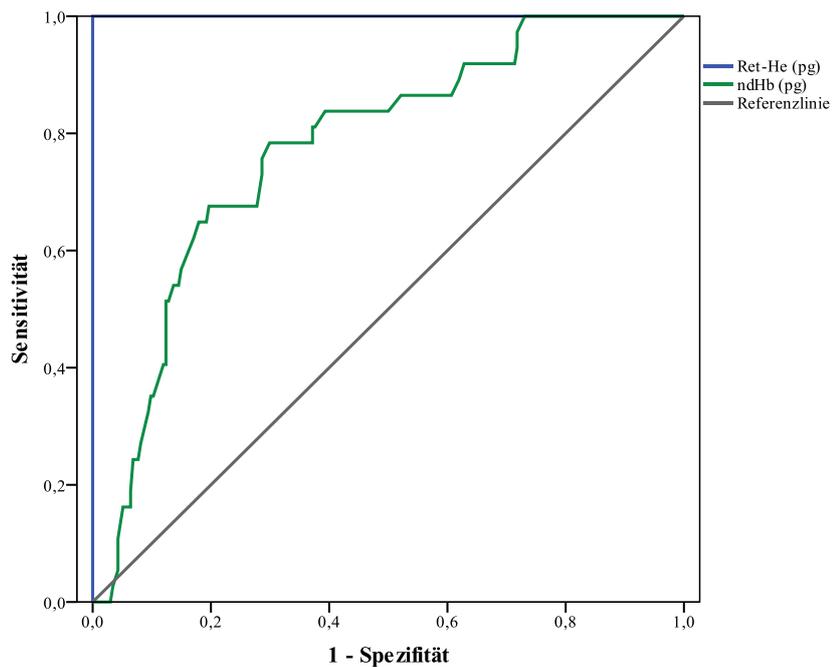


Abb. 10: ROC-Kurve für die Parameter Ret-H_e und ndHb zur Diagnostik von IDA



Die ROC-Analyse beweist, dass die Parameter Ferritinindex und Ret-H_e über eine sehr starke Trennschärfe in der Diagnose von IDA mit AUCs von 1 verfügen. Die AUC des sTfR zur Diagnose von IDA ist dieser mit 0,99 leicht unterlegen. Auch der neue Parameter ndHb zeigte für die Diagnostik von IDA eine gute AUC von 0,776.

Parameter	AUC	SD	95% KI	
			Untergrenze	Obergrenze
Ferritinindex (sTfR/log Ferritin)	0,612	0,037	0,539	0,686
sTfR (mg/L)	0,727	0,031	0,666	0,789
Ret-He (pg)	1			
ndHb (pg)	0,927	0,015	0,897	0,957

Tab. 28: AUC für die Parameter des Profil F zur Differenzierung von ACD

	sTfR (mg/L)	Ferritinindex	Ret-He (pg)	ndHb (pg)
Cut-Off-Wert	3,62	2,62	28,05	2,10
Sensitivität (%)	71,60	40,74	100,00	87,65
Spezifität (%)	65,81	80,77	100,00	85,04

Tab. 29: Diagnostische Sensitivität und Spezifität für die Parameter bei ACD-Patienten beim Cut-Off-Wert

Abb. 11: ROC-Kurve für die Parameter Ferritinindex und sTfR zur Diagnostik von ACD

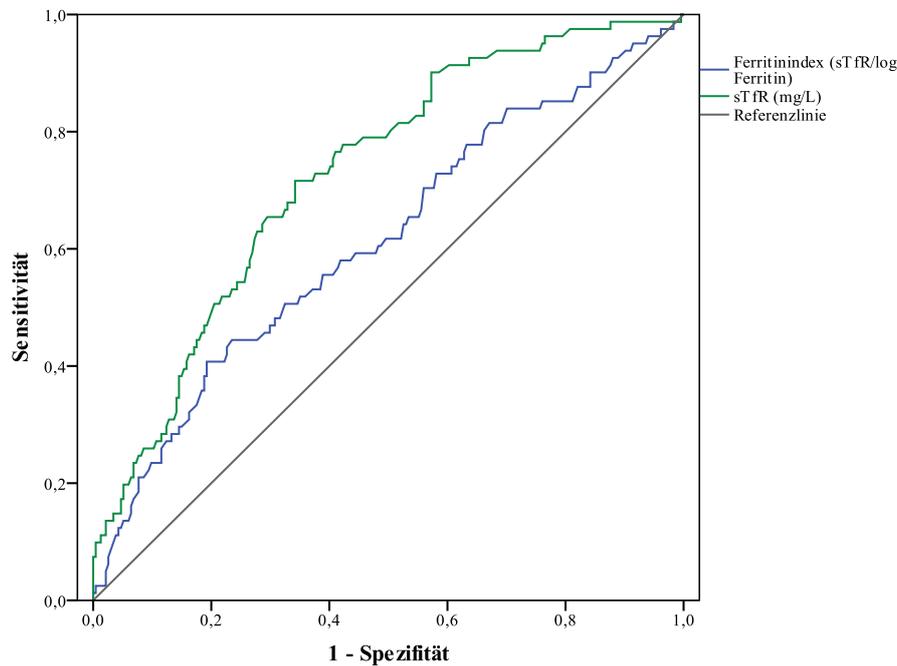
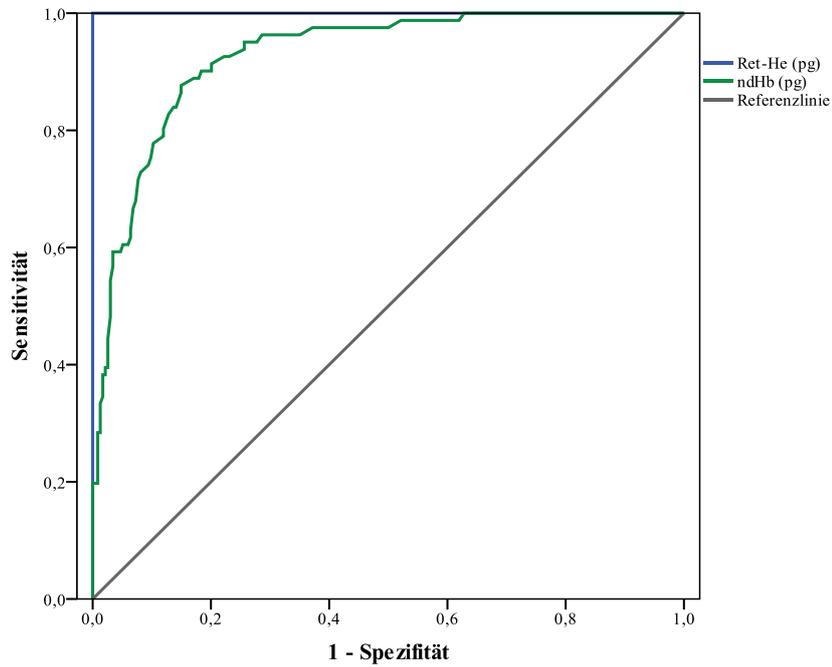


Abb. 12: ROC-Kurve für die Parameter Ret-H_e und ndHb zur Diagnostik von ACD



Das beste diagnostische Unterscheidungsvermögen zwischen Kontrollgruppe und ACD-Patienten besaß die Ret-H_e-Messung mit einer AUC von 1. Diese AUC ist dicht gefolgt von der des ndHb in Höhe von 0,927.

Parameter	AUC	SD	95% KI	
			Untergrenze	Obergrenze
Ferritinindex (sTfR/log Ferritin)	0,558	0,080	0,402	0,714
sTfR (mg/L)	0,634	0,710	0,495	0,773
Ret-He (pg)	1			
ndHb (pg)	0,890	0,031	0,830	0,950

Tab. 30: AUC für die Parameter des Profil F zur Differenzierung von NI

	sTfR (mg/L)	Ferritinindex	Ret-He (pg)	ndHb (pg)
Cut-Off-Wert	4,12	2,84	28,05	1,80
Sensitivität (%)	47,62	33,33	100,00	85,71
Spezifität (%)	82,05	90,17	100,00	86,33

Tab. 31: Diagnostische Sensitivität und Spezifität für die Parameter bei NI-Patienten beim Cut-Off-Wert

Abb. 13: ROC-Kurve für die Parameter Ferritinindex und sTfR zur Diagnostik von NI

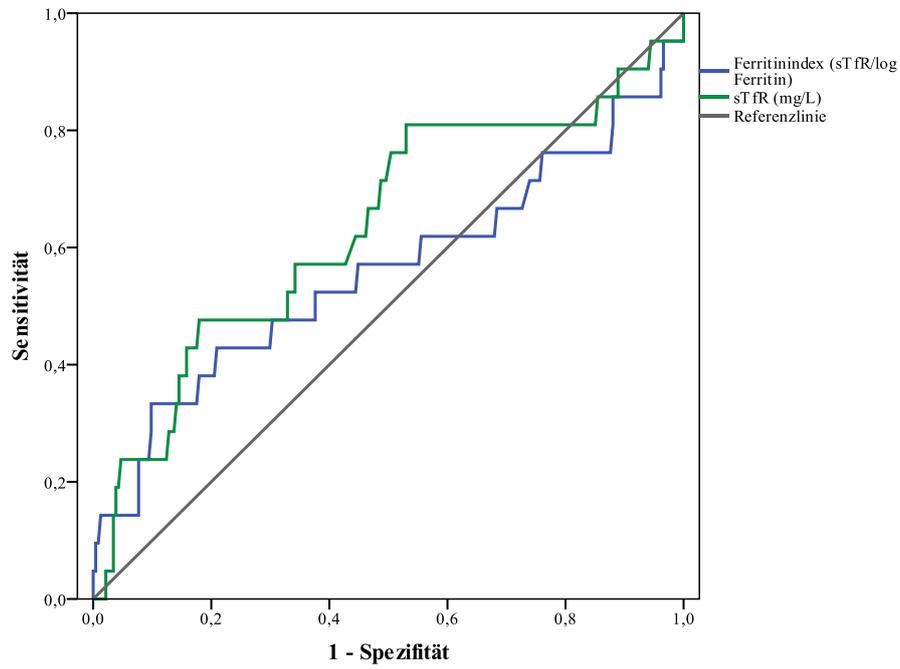
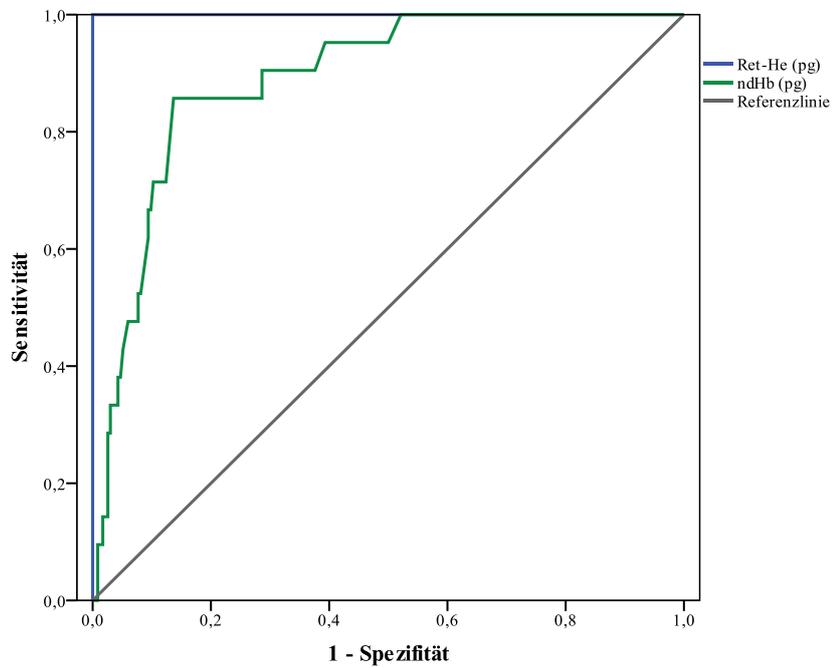


Abb. 14: ROC-Kurve für die Parameter Ret-H_e und ndHb zur Diagnostik von NI



3.5.2 Kontroll- und Studiengruppe in den diagnostischen Plots

Abb. 15: Thomasplot mit Messungen aller Probanden

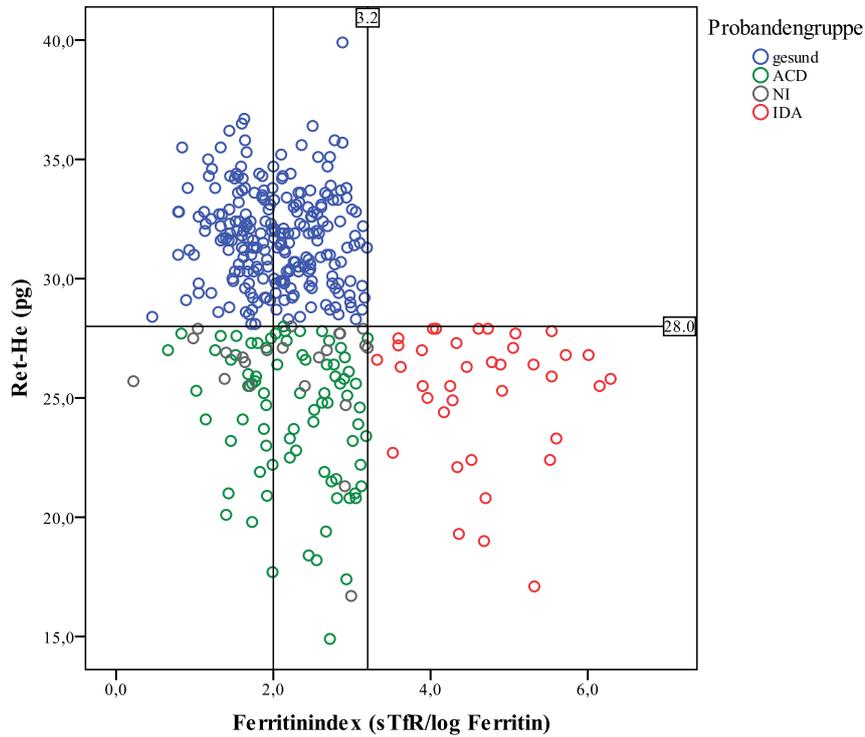
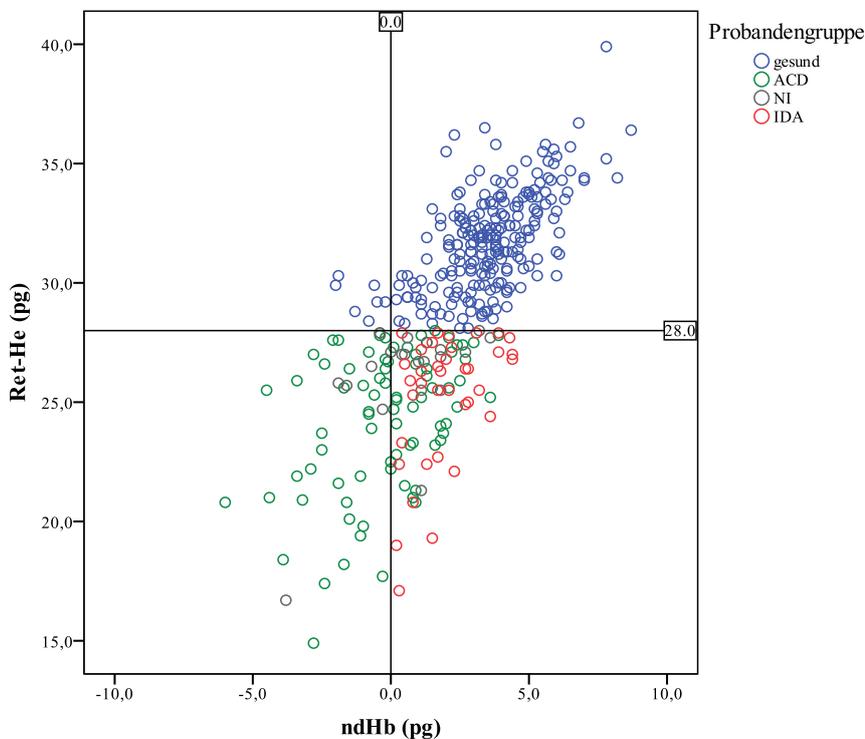


Abb. 16: Haemplot mit Messungen aller Probanden



Die Abbildung 15 zeigt die Verteilung der erbrachten Messungen in die vier Felder des Thomasplots. Dabei entspricht ein Kreis einer Messung. Es sind die bekannten Unterteilungen

des Thomasplot, vertikal bei einem Ferritinindex-Wert von 3,2 beziehungsweise 2,0 sowie horizontal einem Ret-H_e-Wert von 28 pg aufgetragen. Die Verteilung der Messwerte der Probandengruppen in die für sie bestimmten vier Quadranten ist größtenteils zutreffend.

Im Falle des Haemaplots (Abbildung 16) sehen wir die vertikale Unterteilung des Plots bei der Nulllinie des ndHb-Wertes, sowie die vom Thomasplot gewohnte horizontale Unterteilung des Ret-H_e bei 28 pg. Alle Kreise entsprechen auch hier Einzelmessungen.

4. DISKUSSION

Es gibt viele verschiedene Ursachen, die im Kleinkindes-, Schulkindesalter oder bei Jugendlichen zur Entstehung einer Anämie zugrunde liegen. Am häufigsten ist der Eisenmangel. Aber auch das ist keine Ursache, sondern ein Symptom. Eine verlässliche Diagnostik ist deshalb für den behandelnden Arzt unabdingbar. Die Dringlichkeit rückt vor allem in den Vordergrund, da chronische anämische Zustände erhebliche Folgen für Wachstum und Entwicklung des betroffenen Kindes haben.¹⁷ In der vorliegenden Arbeit wurden die Parameter des Thomasplot und des Haemaplot im Serum von Patienten mit Eisenmangel, wichtigen chronischen Erkrankungen sowie bei gesunden Probanden untersucht. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass der Ferritinindex dem sTfR für die Differenzierung von IDA gegenüber gesunden Kindern sehr hilfreich ist. Das selbe gilt auch für die ACD.^{52,64,71} Auch konnte bewiesen werden, dass diese beiden Parameter keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von dem Wert des CRP aufweisen. Sie werden also nicht von einer Akuten-Phase-Reaktion beeinflusst.^{52,72}

4.1 Referenzwerte in der Kontrollgruppe

Auf der Basis von 234 Serumproben der Kontrollgruppe wurden in der vorliegenden Arbeit Referenzwerte für den sTfR, den Ferritinindex, das Ret-H_e sowie das ndHb festgelegt. Die Werte zeigten hierbei eine Normalverteilung, weshalb als Referenzbereich nicht nur die zentralen 95% zwischen der 2,5. und der 97,5. Perzentile, sondern auch der Mittelwert mit Standardabweichung und 95% Konfidenzintervall angegeben werden konnten. Ein Referenzbereich kann sowohl durch den Mittelwert ± 2 Standarddeviationen als auch als durch den Bereich zwischen der 2,5. und der 97,5. Perzentile beschrieben werden.

Veröffentlichungen zu den Referenzintervallen der Parameter des Thomasplot für das Kindes- und Jugendalter sind in der medizinischen Fachliteratur derzeit noch selten. Es herrscht ein Mangel an klinisch anwendbaren pädiatrischen Referenzintervallen für den sTfR mit dem dazugehörigen Ferritinindex wie auch für das Ret-H_e. Das ndHb des Haemaplots ist ein neuer Parameter, der noch nicht für die pädiatrischen Altersgruppen erforscht und publiziert worden ist.

Viele vormals durchgeführte Studien zeigten, dass Mittelwert und Referenzbereich des sTfR, je nach Analyseverfahren, starken Variationen unterworfen sind.^{73,49,74} Pädiatrische

Referenzintervalle des sTfR, des Ferritinindex und vereinzelt des Ret-H_e mit Einsatz der Methoden von BN ProSpec® mit Dade Behring, Inc., Nichols Institute®, Quest Diagnostics, Inc. und Quantikine IV sTfR Immunoassay mit R&D Systems, Inc. wurden bereits veröffentlicht.^{22,72,71} Es konnten jedoch keine Veröffentlichungen mit Einsatz der Kits der Firma Sysmex in Kombination mit denen der Firma Roche gefunden werden. Im Zuge der vormals durchgeführten Studien zeigten sich für die Parameter starke Diskrepanzen der Ergebnisse bei den verschiedenen Autoren sowie angewandten Analyse-Kits.^{72,73,49} Diese Variabilität erfordert daher, für eine verlässliche Aussagekraft in der klinischen Diagnostik, die Festlegung von Referenzintervallen je nach benutzter Methode im jeweiligen Labor einer Klinik. Die vorliegende Arbeit legt aus diesem Grund Referenzintervalle nach Alter und im Falle signifikanter Differenzen nach Geschlecht für gesunde Kinder zwischen 3 Monaten und 18 Jahren für klinisch relevante Altersintervalle fest. In dieser Arbeit wurden im Vergleich zu vormals durchgeführten Arbeiten zusätzlich Referenzintervalle für Kinder unter sechs Monaten ermittelt sowie die Altersgruppen an den klinischen Alltag angepasst.

Die Parameter Ferritinindex und Ret-H_e können als diagnostischer Thomasplot aufgeführt werden. Für den neuen Haemaplot, der, nach dem gleichen Prinzip wie der Thomasplot, mittels der Parameter ndHb und Ret-H_e gebildet werden kann, ist die vorgelegte Arbeit die erste systematische Analyse dieses neuen Parameters im Kindesalter. Die kombinierte Anwendung von Ret-H_e beziehungsweise CHr und dem Ferritinindex als Indikatoren der Eisenbereitstellung für die Erythropoese in einem diagnostischen Plot erlaubt die Bewertung des Eisenstatus des Patienten unabhängig von der Akuten-Phase-Reaktion, die gerade im Kindesalter im Zusammenhang mit interkurrenten Infektionen, leicht Fehlinterpretationen zulassen können.

4.1.1 Löslicher Transferrinrezeptor

Seit der Entdeckung des sTfR im Jahre 1986⁴³ wurde mittels zahlreicher Studien dargelegt, dass es sich um ein gutes Mittel zur Bewertung des Gewebeeisenstatus und der erythropoetischen Leistung handelt.^{10,21,46,58} Der besondere Vorteil zur Anwendung in der Diagnostik bei Kindern, der den sTfR zu einem potentiell nützlichen Parameter macht, besteht in seiner geringen biologischen Variabilität, seiner Sensitivität und Spezifität.^{21,75} sTfR stammt aus den erythroiden Vorstufen, den Erythroblasten, im Knochenmark und so auch zu einem kleinen Teil von den Retikulozyten und spiegelt daher die Erythropoeserate wider.⁶³ Es konnte gezeigt werden, dass sTfR die Gewebeeisenversorgung verlässlich wiedergibt.⁷⁶ Der Nutzen von sTfR, einsetzbar in verschiedensten klinischen Situationen, ist vor allem als

Kennzeichen einer beschleunigten Erythropoese und eines Eisenmangels wertvoll.^{21,65} Dies ist besonders relevant in Phasen des schnellen Wachstums, in der Kindheit und Jugend, in der Schwangerschaft.

Im Unterschied zum Serumeisen, zum Anteil an Transferrinsättigung und zum Serumferritin, wird der sTfR-Spiegel nicht durch die Akute-Phase-Antwort beeinflusst. Er ist daher ein verlässlicher Parameter in der Differentialdiagnostik des Eisenstatus. Das trifft auf die von entzündlichen Prozessen beeinflussten Parameter nicht zu.^{65,77} sTfR liefert nicht nur Informationen über den Spiegel des intrazellulären Eisens, sondern ist auch proportional zu der gesamten erythroiden Masse.⁶⁵ Einige Studien haben jedoch darauf verwiesen, dass die sTfR-Konzentration die diskriminative Aussagekraft des Serumferritins nur leicht erhöht.⁷⁸

In der Literatur tauchen einige Studien zu den Referenzintervallen von sTfR bei gesunden Kindern auf.^{22,54,60,63,71,72,79} So wurden bei Olivares et al. 144 Kleinkinder zwischen 8 und 15 Monaten untersucht und es ergab sich ein Referenzbereich von $8,9 \pm 2,0$ mg/L.⁶⁴ Bei Malope et al. wurde bei 177 Kindern, zwischen einem und 6 Jahren, ein RI von $6,1 \pm 2,2$ µg/mL beschrieben.⁶⁵ Kratovil et al. fanden bei 37 Kindern zwischen 6 und 24 Monaten ein RI von 1,37-2,85 mg/L, bei den $n=42$ 2- bis 6-jährigen einen RI von 1,05-3,05 mg/L, bei den $n=39$ 7- bis 12-jährigen einen RI von 1,16-2,72 mg/L und bei den $n=37$ 13- bis 17-jährigen einen RI von 0,97 bis 2,60 mg/L.²² Danise et al. bestimmten bei 851 Kindern zwischen 6 und 10 Jahren einen RI von 0,93-3,00 mg/L.⁸⁰ Heiduk et al. kamen zwischen null und einem Jahr ($n=95$) auf einen RI von 1,55-5,7 mg/L, zwischen einem und 3 Jahren ($n=87$) auf einen RI von 1,65-5,6 mg/L, zwischen 4 und 6 Jahren ($n=109$) auf einen RI von 1,47-5,4 mg/L, zwischen 7 und 12 Jahren ($n=202$) auf einen RI von 1,95-5,5 mg/L, zwischen 13 und 17 Jahren ($n=172$) auf einen RI von 1,76-5,9 mg/L. Ab der Altersgruppe zwischen 4 und 6 Jahren wurden bei Heiduk et al. leicht höhere sTfR-Konzentrationen für männliche Probanden beobachtet, sodass die Referenzintervalle aller Gruppen nach Geschlecht unterteilt aufgetragen wurden. Heiduk et al. sahen eine leichte Altersabhängigkeit des sTfR sowie einen leichten Abfall der Messwerte im Laufe der Kindheit. Auch in dieser Studie kommen die Autoren zu dem Ergebnis, dass es aufgrund der fehlenden Standardisierung der Messmethode zu starken Schwankungen der Referenzbereiche kommen kann.⁸¹

Chouliaras et al. bestimmten Referenzintervalle für $n=25$ ein bis 2-jährige (2,19-3,24 mg/L), $n=78$ 2- bis 3-jährige (2,02-3,49 mg/L), $n=73$ 3- bis 4-jährige (1,80-3,54 mg/L), $n=59$ 4- bis 5-jährige (1,84-3,24 mg/L) und $n=26$ 5- bis 6-jährige (1,57-2,8 mg/L).⁷¹ Ooi et al. bestimmten Referenzintervalle für $n=13$ 0,4 bis 6 Monate alte Kinder (1,26-3,17 mg/L), $n=17$ 6 bis 12

Monate alte Kinder (1,12-2,91 mg/L), $n=16$ 12 bis 18 Monate alte Kinder (1,37-2,52 mg/L), $n=20$ 18 Monate bis 2 Jahre alte Kinder (1,33-2,93 mg/L), $n=46$ 2 bis 3 Jahre alte Kinder (0,98-2,91 mg/L), $n=38$ 3 bis 4 Jahre alte Kinder (1,08-2,55 mg/L), $n=76$ 4 bis 6 Jahre alte Kinder (1,10-2,74 mg/L), $n=64$ 6 bis 9 Jahre alte Kinder (0,93-2,63 mg/L), $n=44$ 9 bis 12 Jahre alte Kinder (0,81-2,67 mg/L) sowie $n=85$ 12 bis 18 Jahre alte Kinder (0,91-1,91 mg/L).⁷²

Die in der vorliegenden Arbeit erlangten Ergebnisse befanden sich insgesamt unterhalb der von Olivares et al. und Malope et al. sowie oberhalb der von Kratovil et al. veröffentlichten Ergebnisse. Es zeigten sich jedoch anders als bei Heiduk et al. keine statistisch relevanten Unterschiede für sTfR zwischen den Geschlechtern. sTfR zeigte in der vorliegenden Arbeit keine statistisch signifikanten Differenzen bezüglich des Alters. Die signifikante Altersabhängigkeit der Serum-sTfR-Konzentrationen ist eine häufige Schlussfolgerung vieler Studien. Die Art dieser Korrelation konnte jedoch noch nicht exakt benannt werden. Es zeigten sich außerdem kaum Schwankungen der Spiegel bei Kindern zwischen 8 und 15 Monaten.⁶⁰ Ab einem Alter von 1 bis 2 Jahren ließ sich in allen Studien, wie auch in der vorliegenden Arbeit, ein eher negativer Trend der Messwerte mit zunehmendem Alter beobachten.^{62,63,80} In einer Studie wurde eine positive Korrelation zwischen sTfR und dem Kindesalter gefunden, jedoch vom Autor als klinisch nicht signifikant bewertet.⁸⁰ In einer Veröffentlichung wurden zwischen 3 und 10 Jahren keine signifikanten Differenzen der Konzentrationen, allerdings niedrige Konzentrationen bei Mädchen zwischen 10 und 20 Jahren gegenüber Jungen der gleichen Altersgruppe, ermittelt.⁶²

Es zeigten sich höhere Referenzwerte (1,6-5,0 mg/L) bei Kindern als bei Erwachsenen (0,9-2,3 mg/L).⁸² Einige Autoren fanden heraus, dass Jugendliche und Erwachsene niedrigere sTfR-Spiegel als Kinder aufweisen.^{22,62,83,84} Diese altersbedingten Schwankungen des TfR können durch eine höhere erythropoetische Aktivität pro Körpergewicht während der Kindheit erklärt werden, sodass der relative Anteil an zirkulierenden Erythrozytenvorläuferzellen in diesem Alter höher sein könnte. In den jüngeren Altersgruppen zeigten sich somit die sTfR-Spiegel erhöht, was eine höhere erythroide Aktivität in diesem Alter suggeriert. Eine höhere TfR-Konzentration, ähnlich wie die hier bei Kindern ermittelten, wurde bei Erwachsenen, die in Höhenlagen leben, beobachtet. Dieser Anstieg liegt vermutlich an der Zunahme der gesamten erythroiden Masse in Bezug auf das Körpergewicht.⁸⁵ Unterschiede zwischen den Geschlechtern zeigten sich in der hämatologisch

gesunden Kohorte dieser Arbeit als nicht signifikant für den sTfR-Wert. Dies gleicht den Ergebnissen anderer vergleichbarer Studien zu dieser Thematik.^{62,63,83,86}

4.1.2 Ferritin und Ferritinindex

Serumferritin ist der spezifischste bis heute bekannte Marker des Depoteisenbestands, es kommt jedoch nur zu einer relativ geringen Schwankung des Serumspiegels, wenn der Speicher völlig erschöpft ist. Der sTfR-Spiegel hingegen ist ein Indikator des funktionellen Eisenbestandes und steigt mit einer Zunahme der Eisendefizienz. Serumferritin ist somit der Index mit der höchsten Sensitivität für den Eisenstatus und sTfR mit der für die funktionelle Eisendefizienz (FID). Der sTfR-Spiegel gibt außerdem die Erythropoeserate wieder, was seine Spezifität als alleiniger Marker der ID abnehmen lässt. Der Ferritinindex (sTfR/log Ferritin), als kombinierter Parameter, vermag daher den Eisenstatus über seinen gesamten Bereich zu beurteilen, da er das wechselseitige Verhältnis des Serumferritins und des sTfR darstellt.^{10,46,65}

Malope et al. errechneten für 561 Kinder zwischen einem und 6 Jahren einen Referenzbereich von $4,1 \pm 1,7$.⁶⁵ Angeles Vázquez López et al. fanden für 206 gesunde Kinder zwischen einem und 10 Jahren einen Wert von $1,38 \pm 0,34$.⁴⁷ Danise et al. nennen bei 916 Kindern zwischen 6 und 10 Jahren einen Referenzintervall von $0,55-2,09$.⁸⁰ Margetic et al. bestimmten bei 61 gesunden Erwachsenen zwischen 18 und 63 Jahren einen RI von $0,67 \pm 0,25$.⁵² Ooi et al. bestimmten Referenzintervalle für $n=13$ 0,4 bis 6 Monate alte Kinder ($0,57-4,81$), $n=17$ 6 bis 12 Monate alte Kinder ($0,81-2,96$), $n=16$ 12 bis 18 Monate alte Kinder ($0,82-2,70$), $n=20$ 18 Monate bis 2 Jahre alte Kinder ($0,97-2,34$), $n=46$ 2 bis 3 Jahre alte Kinder ($0,65-5,55$), $n=38$ 3 bis 4 Jahre alte Kinder ($0,67-4,29$), $n=76$ 4 bis 6 Jahre alte Kinder ($0,69-2,34$), $n=64$ 6 bis 9 Jahre alte Kinder ($0,60-5,26$), $n=44$ 9 bis 12 Jahre alte Kinder ($0,35-2,27$) sowie $n=85$ 12 bis 18 Jahre alte Kinder ($0,67-3,05$).⁷² Allein die letztere Veröffentlichung ergibt eine Aussage über die Konzentrationen des Ferritinindex als alterskonformem Referenzintervall.

Die Säuglinge von 3 bis 6 Monaten wiesen aufgrund der erhöhten Ferritinwerte in diesem Alter niedrigere Ferritinindexwerte als die älteren Kinder auf.⁵⁴ Im Verlauf zeigte sich in der darauf folgenden Altersgruppe ein Anstieg des Index bis hin zu einem Maximum in der Altersgruppe zwischen 2 und 6 Jahren. Dies entspricht betreffend die Tendenz den Ergebnissen anderer Studien. Ooi et al. beobachteten die höchsten Ferritinindex-Werte zwischen 18 Monaten und 4 Jahren Lebensalter.⁷²

Für die Abweichungen zwischen den einzelnen Studien werden folgende Faktoren verantwortlich gemacht: der Einsatz von unterschiedlichen Bestimmungsmethoden, Geräten und Kits. Vermutlich führt die bereits teilweise behandelte Problematik des Fehlens einer standardisierten Methode dazu, dass kaum ein Vergleich zwischen den Studien zustande kommen kann und somit keine internationalen Referenzintervalle, unabhängig vom angewandtem Kit und Gerät, bestimmt werden können.

4.1.3 Hämoglobinäquivalent der Retikulozyten

Die Messung des Ret-H_e hat sich in der Diagnostik der eisendefizitären Erythropoese durchgesetzt und wird außerdem als Indikator von funktionellem Eisenmangel bei Patienten im Endstadium des Nierenversagens und Krebs-assoziiertes Anämie angewandt.^{9,87,88,89} In der pädiatrischen Anämiediagnostik ist die Ret-H_e-Messung noch rar. Der Referenzbereich für Erwachsene bewegt sich zwischen 28 pg und 35 pg.⁹ Für das Kindesalter finden sich in der aktuellen Literatur kaum Referenzwerte für das Ret-H_e.

Es liegt eine Studie von Danise et al. vor, die Referenzwerte bei 851 gesunden Kindern zwischen 6 und 10 Jahren betrachtet. In dieser Studie erfolgte keine weitere Einteilung in Altersgruppen. Es wird hier ein Referenzintervall von 25,94-31,84 pg angegeben.⁸⁰

Die jüngste Altersgruppe der untersuchten Probanden wies die niedrigsten Ret-H_e-Werte auf. In den darauf folgenden Altersgruppen von 6 Monaten bis zum 2. Lebensjahr sowie vom 2. bis zum 6. Lebensjahr ergab sich tendenziell ein Anstieg der im Säuglingsalter niedrigen Messwerte. In der Altersgruppe zwischen 6 und 12 Jahren entsprachen die Referenzwerte nahezu denen der Erwachsenen. Im Altersverlauf zeigte sich folglich mit zunehmendem Alter eine Angleichung an die Referenzwerte im Erwachsenenalter, wobei beachtet werden muss, dass der signifikante Unterschied zwischen den Werten von Mädchen und Jungen in den Altersgruppen zwischen 12 und 18 Jahren am beträchtlichsten ist. Dies ist sicherlich physiologisch auf die Menarche bei den jugendlichen Mädchen sowie die darauf folgende monatliche Menstruationsblutung zurückzuführen. Ähnliche Verläufe lassen sich bei Aufzeichnungen des Hb im Altersverlauf beobachten.^{4,90}

Eine Behandlung mit rekombinantem Erythropoetin (rHuEPO) bei gesunden Probanden führt zur Entwicklung eines funktionellen Eisenmangels und zu einem Abfall des Ret-H_e. Es ist berichtet worden, dass die Produktion der Retikulozyten mit vermindertem Ret-H_e sich gegenüber dem Logarithmus des Serumferritins gegensätzlich verhält.⁵⁹

4.1.4 Nearly Δ Hämoglobin

Für den neuen errechneten Parameter ndHb ist diese Arbeit, die sich mit dem Kindes- und Jugendalter befasst, die erste Betrachtung und die hier erlangten Ergebnisse können daher nicht mit anderen verglichen werden. Es finden sich ebenso in der Literatur noch keine Aufzeichnungen zu Referenzwerten des ndHb im Erwachsenenalter. Er ist jedoch anzunehmen, dass sich dieser Parameter, wie auch die anderen hämatologischen Parameter, im Jugendalter denen der Erwachsenen angleicht. Insgesamt zeigte sich die höchste 97,5. Perzentile der ndHb im Kleinkindesalter zwischen 2 und 6 Jahren. In den beiden angrenzenden Altersgruppen befanden sich die nächst höchsten 97,5. Perzentilen.

Die niedrigsten Werte des ndHb konnten wie erwartet in der jüngsten Probandenkohorte zwischen 3 Monaten und 6 Monaten beobachtet werden. Es ist ein zunehmender Anstieg des Wertes bis etwa zum 1. beziehungsweise 2. Lebensjahr zu beobachten. Danach folgt ein leichter progressiver Abfall. Somit verhält sich das ndHb in den Altersgruppen ähnlich wie der sTfR.

Die anhand der zwei Parameter, Ret- H_e gemeinsam mit dem Ferritinindex sowie Ret- H_e gemeinsam mit ndHb, gebildeten Punkte in den diagnostischen Plots für hämatologisch gesunde Probanden befanden sich im Thomasplot im Quadranten Nummer I, im Haemaplot im Quadranten Nummer II. Hieraus lässt sich schließen, dass bei Verlaufskontrollen im Rahmen einer Therapie eines Patienten der beispielsweise an einer Eisenmangelanämie leidet, es das Ziel sein sollte anhand der Therapie den Quadranten I im Thomasplot und entsprechen den Quadranten II im Haemaplot zu erreichen.

4.2 Verhalten der Parameter in der Studiengruppe

Es zeigte sich bezüglich der Zuordnung in die Morbiditätsgruppen eine deutliche Signifikanz für alle vier untersuchten Parameter. Diese Ergebnisse finden sich so auch in anderen Arbeiten wieder.^{52,91}

4.2.1 Erhöhte sTfR- und Ferritinindex-Werte in der Studiengruppe

Beim Vergleich der Studiengruppe mit der Kontrollgruppe ergaben sich für die anämischen Patienten signifikant erhöhte sTfR-Werte und Ferritinindex-Werte (MW des sTfR $3,31 \pm 0,85$ mg/L versus $4,08 \pm 1,02$ mg/L für ACD und $6,05 \pm 1,15$ mg/L für IDA; MW des Ferritinindex $2,04 \pm 0,58$ versus $2,26 \pm 0,62$ für ACD und $4,67 \pm 0,78$ für IDA). Die Werte in der NI-Gruppe waren leicht erhöht bei $3,78 \pm 1,22$ mg/L sowie $2,18 \pm 0,84$, dies entsprach jedoch keiner

signifikanten Differenz. Der Serumspiegel vom sTfR bei ID steigt durch die Hochregulierung des Transferrinrezeptors an den Zelloberflächen als Antwort auf erhöhte zelluläre Nachfrage. Die sTfR-Spiegel bei IDA zeigten sich in der vorliegenden Arbeit, wie auch in ähnlichen vormals durchgeführten Studien^{47,54,65}, als die mit Abstand höchsten im Vergleich zu Kontrollgruppe sowie den anderen Probandenkohorten. In dieser Arbeit wiesen die 37 IDA-Patienten signifikant erhöhte sTfR-Spiegel auf.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Werte von sTfR und Ferritinindex bei Kindern mit IDA signifikant höher sind als bei Anämie in Verbindung mit Infektionen und ACD.^{47,65,71,92} Es wurde ebenso bereits gezeigt, dass der sTfR-Spiegel bei Eisenmangel so wie auch bei Erwachsenen, bei erhöhter erythropoetischer Aktivität, wie beispielsweise in der Neonatalperiode, und bei hämolytischen Anämien, steigt.⁵⁴ Die Ferritinindex-Werte bei Neugeborenen sind als eher herabgesetzt beschrieben.⁵⁴ Bereits bekannt ist, dass die Werte von sTfR und seinem Index proportional zur Ausprägung der ID steigen. Es wurde ebenfalls bereits beobachtet, dass die Werte des sTfR und des Ferritinindex bei IDA-Kindern signifikant höher als bei gesunden Kindern sind, obwohl aufgrund der unterschiedlichen Methoden ein endgültiger Vergleich nicht möglich zu sein scheint. Bei Kleinkindern erreichten die sTfR-Messungen höhere Werte. Die im Jugendalter erhobenen Daten entsprachen zunehmend den Werten der Erwachsenen.

Mehrere Studien haben darauf hingewiesen, dass der sTfR-Spiegel bei IDA sogar beim Vorliegen einer entzündlichen Erkrankung ansteigt und einen verlässlichen Messwert der Erschöpfung des Eisenspeichers darstellt.^{46,77,78}

Es konnte, ähnlich wie bei früheren Analysen, bestätigt werden, dass IDA mit erhöhten sTfR- und Ferritinindex-Werten assoziiert ist.^{10,21} Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zweierlei: 1. die sTfR- und Ferritinindex-Werte bei IDA-Patienten sind im Vergleich zu den gesunden Kontrollen erhöht, 2. diese zwei Parameter lassen eine Differenzierung zwischen den Patienten mit IDA und denen mit ACD zu.

4.2.2 Verminderte Ret-H_e-Werte in der Studiengruppe

Im Verhältnis zur Kontrollkohorte (31,75±2,03 pg) erwies sich die Ret-H_e-Konzentration in der ACD-Gruppe mit 24,29±2,96 pg als die niedrigsten aller untersuchten Kohorten. Es folgte die IDA-Gruppe mit einem MW von 25,19±2,75 pg und darauf folgend die NI-Gruppe mit einem MW von 26,10±2,56 pg. Die Konzentrationen bei allen Studiengruppen waren somit signifikant erniedrigt. Bei Danise et al. ergaben die Messungen bei 53 Kindern zwischen 6

und 10 Jahren mit einem Speichereisenmangel einen Referenzintervall von 23,39-31,40 pg im Gegensatz zu einem bei 851 gesunden Kindern erhobenen Referenzintervall von 25,94-31,84 pg.

4.2.3 Verminderte ndHb-Werte in der Studiengruppe

Der MW der ndHb-Konzentration wurde für die ACD-Kohorte für $-0,18 \pm 2,01$ pg als am deutlichsten vermindert gegenüber dem Kontrollwert von $3,52 \pm 1,74$ pg bestimmt. In unmittelbarer Nähe lag der MW für die NI-Kohorte bei $0,59 \pm 1,71$ und der MW für die IDA-Kohorte als am dichtesten bei den Werten der Gesunden bei $1,98 \pm 1,25$ pg. Zur Unterscheidung zwischen krank und gesund zeigte sich der ndHb-Wert für alle Krankheitsgruppen als besonders aussagekräftig. In dieser Arbeit wurden erstmals Kinder mit Anämien und auch gesunde Probanden auf das ndHb hin untersucht. Es konnten hier stark signifikant erniedrigte Werte nachgewiesen werden. Der Unterschied zwischen allen Gruppen außer zwischen der ACD- und NI-Gruppe war signifikant. Weitere Untersuchungen mit größerer Fallzahl sind zur Absicherung der Ergebnisse erforderlich.

4.3 Diagnostische Applikation der Parameter

4.3.1 Diagnostik von Eisenmangelanämien

Die ROC-Analyse der IDA-Kohorte zeigte, dass der Ferritinindex und das Ret-H_e, mit AUCs nahe 1, eine sehr hohe Trennschärfe für die Diagnostik von IDA erbringen. Die beste Kombination von Sensitivität und Spezifität, für beide Parameter nahe 100%, befand sich bei einem Cut-Off-Wert von 3,26 für den Ferritinindex und 28 pg für das Ret-H_e. Diese Parameter können somit sowohl als Screeninguntersuchung als auch als Bestätigungstest angewandt werden.

Bei einer Sensitivität nahe 100% und einer Spezifität von 93,59%, ergab sich für sTfR gegenüber Ferritinindex und Ret-H_e eine nur leicht schwächere Trennschärfe von $0,990 \pm 0,004$. Der Cut-Off-Wert lag bei 4,64 mg/L. Bei einer leicht im Vergleich zum Ferritinindex erniedrigten Spezifität, dürfen weniger falsch positive Ergebnisse erwartet werden. Eine Bestimmung des sTfR-Spiegels ist hilfreich, jedoch nicht vollends verlässlich zur Diagnose von IDA.

ndHb zeigte eine Trennschärfe von $0,776 \pm 0,039$ und ist so von den vier Parametern am wenigsten sinnvoll als isoliertes Werkzeug zur Diagnostik einer IDA geeignet. Bei einem

Cut-Off-Wert von 2,85 pg konnte eine Sensitivität von über 78% und eine Spezifität von 70% erreicht werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse liegt es nahe, für eine primäre Diagnostik bei klinischem Verdacht auf Eisenmangel die Parameter des Thomasplot, Ferritinindex und Ret-H_e einzusetzen. Sie können kombiniert die hier untersuchten häufigsten Anämien sicher unterscheiden und sind bei Eisenmangel am präzisesten und zuverlässigsten. Da auch ndHb gute Ergebnisse erlangt, kann, auch aufgrund der im Vergleich zu der sTfR recht einfachen und somit auch im Vergleich günstigeren Bestimmung, in Betracht gezogen werden, den Haemplot nach erfolgter primärer Diagnostik für die Verlaufskontrolle im Falle einer anstehenden Therapie beziehungsweise zur konsequenten Verfolgung des hämatologischen Status einzusetzen.

Im Thomasplot und auch im Haemplot sind Patienten mit einer Eisenmangelanämie im Quadranten Nummer III zu finden. Dies entspricht den Veröffentlichungen von Thomas et al., in denen der Thomasplot zum Teil auch diagnostisch zum Einsatz kommt. Es erfolgt in dieser Weise für den Kliniker und jedoch auch für den Patienten eine leicht ersichtliche graphische Darstellung. Der anämische und eisendefiziente Patient weist Messwerte auf, die sich im Quadranten 3 im Thomasplot finden, und hat das Ziel mittels einer Therapie, hier zumeist eine orale Eisensubstitution, Werte zu erreichen, die sich unter der Therapie in den Quadranten 1 bewegen.

4.3.2 Diagnostik der Anämie chronischer Erkrankungen, Anämie bei chronischer Nierenkrankheit

Mit einem Schwellenwert des Ret-H_e bei nahezu 28 pg erreicht die Messung eine Sensitivität und Spezifität nahe 100%. Bei einer AUC nahe 1, zeigt sich für die ACD- und NI-Gruppe, dass Ret-H_e allein fähig ist sicher zwischen gesund und chronisch krank zu unterscheiden. Darauf folgt die Trennschärfe des ndHb von $0,927 \pm 0,015$ für ACD und $0,890 \pm 0,031$ für NI. Hier wurde ein Cut-Off-Wert von 2,10 pg für ACD, mit einer Sensitivität von über 87% und einer Spezifität von 85%, sowie ein Cut-Off-Wert von 1,8 pg für NI, mit einer Sensitivität von über 85% und einer Spezifität von 86%, bestimmt.

Der Ferritinindex erlangte nur eine geringe Trennschärfe zwischen Kontrollkohorte und ACD- ($0,612 \pm 0,037$) sowie NI-Kohorte ($0,558 \pm 0,080$). Jedoch bei Cut-Off-Werten von 2,62 für ACD eine Spezifität von über 80%, bei einer Sensitivität von nur 40 % und von 2,84 für NI eine Spezifität von über 90% bei einer Sensitivität von 33%. Der Test kann bei dieser

hohen Spezifität als Bestätigungstest, nicht jedoch als Screeningtest angewandt werden, da zu viele falsch negative Ergebnisse erwartet werden müssen.

Es sollte somit auch hier eine kombinierte diagnostische Anwendung von Thomasplot und Haemaplot erfolgen. Für die primäre Diagnostik ist zu empfehlen, sowohl den Ferritinindex als auch das ndHb zusammen mit Ret-H_e zu bestimmen. In den Folgeuntersuchungen kann auch hier ein Monitoring der Therapie oder die Verlaufskontrolle mittels Haemaplot sinnvoll sein.

Die hier bestimmten Messwerte befanden sich im Thomasplot im Quadranten IV, dies ist der Quadrant, in dem die Kombination von Messungen im Sinne eines funktionellen Eisenmangels und eines verminderten Hämoglobingehalts der Erythrozyten bei ACD vorherrscht.⁹ Die hier untersuchten Patienten waren zum Zeitpunkt der Messung chronisch erkrankt. Sie haben nahezu alle eine kombinierte ACD und IDA oder ID. Dies bestätigt der Thomasplot. Alle Patienten der ACD- und NI-Kohorte befanden sich mit ihren Werten in den Quadranten III und IV des Haemaplots.

4.4 Fazit und Ausblick

Es wurden Referenzwerte für den sTfR, den Ferritinindex, das Ret-H_e sowie das ndHb für das Kindes- und Jugendalter festgelegt und es konnte gezeigt werden, dass die Parameter in diesem Lebensabschnitt normalverteilt sind. Die Kontrollkohorte, die als hämatologisch gesund angesehen wurde, war hier keine homogene Gruppe. Eine verlässliche Bewertung der Ergebnisse ist dadurch sicher erschwert. Die Erhebung von Referenzwerten bei ausschließlich gesunden Kindern und Jugendlichen könnte zu stabileren und verlässlicheren Messwerten führen. Die Probanden wurden in dieser Arbeit, um die Anwendbarkeit in der Praxis zu erhöhen, in klinisch relevante Altersgruppen eingeteilt. Sicherlich könnte auch eine Einteilung in andere Altersbereiche sinnvoll sein.

Keiner der vier Parameter kann allein zu der Diagnose hämatologisch gesund, Eisenmangelanämie, Anämie chronischer Erkrankungen und Anämie bei chronischer Nierenkrankheit führen. Jedoch ergeben sich bei einer Kombination von jeweils zwei Parametern im Sinne des Thomas- beziehungsweise Haemaplot signifikante Trennschärfen, Sensitivitäten und Spezifitäten. Zur primären Diagnostik bei Verdacht auf Anämie im Kindes- und Jugendalter stellt der Thomasplot, mit den Parametern Ferritinindex und Ret-H_e, das

verlässlichste Mittel dar. Zur weiteren Verlaufskontrolle kann auf den Haemaplot, gebildet aus ndHb und Ret-H_e, dienen.

Das Verhalten und der zeitliche Verlauf der Parameter in Hinsicht auf deren erwartete Reaktion auf eine Therapie wie Eisensubstitution oder Erythropoetingabe bei sukzessiven Messungen sollte weiterführend betrachtet werden. Auch der Haemaplot bietet Möglichkeiten im Sinne des Therapiemonitorings.

Die Plots können der bildlichen Darstellung des momentanen hämatologischen Status sowohl für den Patienten selbst als auch für den behandelnden Arzt beitragen. Das erkrankte ältere Kind kann den eigenen Therapiefortschritt durch Wanderung in Richtung hämatologisch gesunde Quadranten mitverfolgen. Die Quadranten könnten zur besseren Veranschaulichung wie die Farben einer Ampel eingefärbt werden.

Diese Maßnahmen könnten so eventuell die oft eingeschränkte Compliance bei der Therapie mit Eisenpräparaten, aufgrund deren Unverträglichkeit und Nebenwirkungen, verbessern helfen.

Für den niedergelassenen Pädiater könnte die Benutzung der Plots bedeuten, dass die Therapie einer Anämie sich wirkungsvoller gestalten lässt. Therapiebedürftige Eisenmangelzustände sind eindeutig zu erkennen und der Therapieeffekt ist ebenfalls klar erkennbar. Andererseits sind Anämien bei chronischer Erkrankung durch die Eisenverwertungsstörung bedingt. Unnötige und nutzlose Therapieversuche mit Eisen würden unterbleiben. In der Diagnostik der Anämien im Kindes- und Erwachsenenalter sind die neuen Parameter, wenn sie miteinander kombiniert und geplottet werden, eine große Hilfe, wie die vorliegende Studie gezeigt hat.

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. Meletis J, Konstantopoulos. The beliefs, myths, and reality surrounding the word hema (blood) from homer to the present. *Anemia*. 2010;2010:857657.
2. Bollet A, Brown A. Anemia. In: Kiple K. ed. *The Cambridge World History of Human Disease*. Cambridge University Press 1993.
3. Menke WT. Mediterranean anaemia in antiquity. *Br Med J*. 1973 May 26;2(5864):489.
4. McLean E, Cogswell M et al. Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993-2005. *Public Health Nutr*. 2009 Apr;12(4):444-54.
5. Grosbois B, Decaux O et al. Human iron deficiency. *Bull Acad Natl Med*. 2005 Nov;189(8):1649-63; discussion 1663-4.
6. Oski FA. Iron deficiency in infancy and childhood. *N Engl J Med*. 1993 Jul 15;329(3):190-3.
7. Cook JD. Iron-deficiency anaemia. *Baillieres Clin Haematol*. 1994 Dec;7(4):787-804.
8. Hercberg S, Preziosi P et al. Iron deficiency in Europe. *Public Health Nutr*. 2001 Apr;4(2B):537-45.
9. Thomas C, Kirschbaum A et al. The diagnostic plot: a concept for identifying different states of iron deficiency and monitoring the response to epoetin therapy. *Med Oncol*. 2006;23(1):23-36.
10. Suominen P, Punnonen K et al. Serum transferrin receptor and transferrin receptor-ferritin index identify healthy subjects with subclinical iron deficits. *Blood*. 1998 Oct;92(8):2934-9.
11. Lin XM, Ji CY et al. Levels of serum transferrin receptor and its response to Fe-supplement in Fe-deficient children. *Br J Nutr*. 2006 Dec;96(6):1134-9.
12. Bermejo F, García-López S. A guide to diagnosis of iron deficiency and iron deficiency anemia in digestive diseases. *World J Gastroenterol*. 2009 Oct 7;15(37):4638-43.
13. Gaedicke G. Klassifikation der Anämien. In: Gadner H, Gaedicke G et al. eds. *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag 2006:86-91.
14. Goddard AF, McIntyre AS et al. Guidelines for the management of iron deficiency anaemia. *British Society of Gastroenterology*. *Gut*. 2000 Jun;46 Suppl 3-4:IV1-IV5.
15. Dunn LL, Rahmanto YS et al. Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends Cell Biol*. 2007 Feb;17(2):93-100.
16. Collard KJ. Iron homeostasis in the neonate. *Pediatrics*. 2009; Apr;123(4):1208-16.
17. Fredriksson A, Schröder N et al. Maze learning and motor activity deficits in adult mice induced by iron exposure during a critical postnatal period. *Brain Res Dev Brain Res*. 2000 Jan 3;119(1):65-74.

18. Beard J. Iron deficiency alters brain development and functioning. *J Nutr.* 2003 May;133(5 Suppl 1):1468S-72S.
19. Beard JL. Why iron deficiency is important in infant development. *J Nutr.* 2008 Dec;138(12):2534-6.
20. Beard JL, Connor JR. Iron status and neural functioning. *Annu Rev Nutr.* 2003;23:41-58. Epub 2003 Apr 10.
21. Skikne BS, Flowers CH et al. Serum transferrin receptor: a quantitative measure of tissue iron deficiency. *Blood.* 1990 May 1;75(9):1870-6.
22. Kratovil T, DeBerardinis J et al. Age specific reference intervals for soluble transferrin receptor (sTfR). *Clin Chim Acta* 2007 May 1;380(1-2):222-4.
23. Gera T, Sachdev HP. Effect of iron supplementation on incidence of infectious illness in children: systematic review. *BMJ.* 2002 Nov 16;325(7373):1142.
24. Koulaouzidis A, Said E et al. Soluble transferrin receptors and iron deficiency, a step beyond ferritin. A systematic review. *J Gastrointest Liver Dis.* 2009 Sep;18(3):345-52.
25. Metzgeroth G, Adelberger V et al. Soluble transferrin receptor and zinc protoporphyrin--competitors or efficient partners? *Eur J Haematol.* 2005 Oct;75(4):309-17.
26. Grantham-McGregor S, Ani C. A review of studies on the effect of iron deficiency on cognitive development in children. *J Nutr.* 2001 Feb;131(2S-2):649S-666S; discussion 666S-668S.
27. Lozoff B, Jimenez E et al. Long-term developmental outcome of infants with iron deficiency. *N Engl J Med.* 1991 Sep 5;325(10):687-94.
28. Cook JD. Diagnosis and management of iron-deficiency anaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2005 Jun;18(2):319-32.
29. Handelman GJ, Levin NW. Iron and anemia in human biology: a review of mechanisms. *Heart Fail Rev.* 2008 Dec;13(4):393-404.
30. Macdougall IC, Cooper A. The inflammatory response and epoetin sensitivity. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17 Suppl 1:48-52.
31. Means RT Jr, Krantz SB. Progress in understanding the pathogenesis of the anemia of chronic disease. *Blood.* 1992 Oct 1;80(7):1639-47.
32. Cavill I, Macdougall IC. Functional iron deficiency. *Blood.* 1993 Aug;82(4):1377.
33. Andrews NC. Anemia of inflammation: the cytokine-hepcidin link. *J Clin Invest.* 2004 May;113(9):1251-3.
34. Kemna EH, Tjalsma H et al. Heparin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica.* 2008 Jan;93(1):90-7.
35. Hörl WH. Clinical aspects of iron use in the anemia of kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2007 Feb;18(2):382-93.

36. Fishbane S. Anemia treatment in chronic renal insufficiency. *Semin Nephrol.* 2002 Nov;22(6):474-8.
37. Locatelli F, Aljama P et al. Revised European best practice guidelines for the management of anaemia in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 2004 May;19 Suppl 2:ii1-47.
38. Barron BA, Hoyer JD et al. A bone marrow report of absent stainable iron is not diagnostic of iron deficiency. *Ann Hematol.* 2001 Mar;80(3):166-9.
39. Walters GO, Miller FM et al. Serum ferritin concentration and iron stores in normal subjects. *J Clin Pathol.* 1973 Oct;26(10):770-2.
40. Bentley DP, Williams P. Serum ferritin concentration as an index of storage iron in rheumatoid arthritis. *J Clin Pathol.* 1974 Oct;27(10):786-8.
41. Jacobs A, Worwood M. The clinical use of serum ferritin estimation. *Br J Haematol.* 1975 Sept;31(1):1-3.
42. Brugnara C. Iron deficiency and erythropoiesis: new diagnostic approaches. *Clin Chem.* 2003 Oct;49(10):1573-8.
43. Kohgo Y, Nishisato T et al. Circulating transferrin receptor in human serum. *Br J Haematol.* 1986 Oct;64(2):277-81.
44. Cazzola M, Beguin Y. New tools for clinical evaluation of erythron function in man. *Br J Haematol.* 1992 Mar;80(3):278-84.
45. Beguin Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clin Chim Acta.* 2003 Mar;329(1-2):9-22.
46. Punnonen K, Irjala K et al. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood.* 1997 Feb 1;89(3):1052-7.
47. Angeles Vázquez López M, Molinos FL et al. Serum transferrin receptor in children: usefulness for determining the nature of anemia in infection. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2006 Dec;28(12):809-15.
48. Kohgo Y, Niitsu Y et al. Serum transferrin receptor as a new index of erythropoiesis. *Blood.* 1987 Dec;70(6):1955-8.
49. Remacha AF, Sarda MP et al. The role of serum transferrin receptor in the diagnosis of iron deficiency. *Haematologica.* 1998 Nov;83(11):963-6.
50. Vázquez López MF, Carracedo Morales A et al. Serum transferrin receptor in healthy children. *An Esp Pediatr.* 2001 Aug;55(2):113-20.
51. Thorstensen K, Romslo I. The transferrin receptor: its diagnostic value and its potential as therapeutic target. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1993;215:113-20.
52. Margetic S, Topic E et al. Soluble transferrin receptor and transferrin receptor-ferritin index in iron deficiency anemia and anemia in rheumatoid arthritis. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43(3):326-31.

53. Jing SQ, Trowbridge IS. Identification of the intermolecular disulfide bonds of the human transferrin receptor and its lipid-attachment site. *EMBO J.* 1987 Feb;6(2):327-31.
54. Dimitriou H, Stiakaki E et al. Soluble transferrin receptor levels and soluble transferrin receptor/log ferritin index in the evaluation of erythropoietic status in childhood infections and malignancy. *Acta Paediatr.* 2000 Oct;89(10):1169-73.
55. Kalmanti M, Kalmantis T. Committed erythroid progenitors and erythropoietin levels in anemic children with lymphomas and tumors. *Pediatr Hematol Oncol.* 1989;6(2):85-93.
56. Ponka P, Lok CN. The transferrin receptor: role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999 Oct;31(10):1111-37.
57. Feelders RA, Kuiper-Kramer EP et al. Structure, function and clinical significance of transferrin receptors. *Clin Chem Lab Med.* 1999 Jan;37(1):1-10.
58. Suominen P, Möttönen T et al. Single values of serum transferrin receptor and serum transferrin index can be used to detect true and functional iron deficiency in rheumatoid arthritis patients with anemia. *Arthritis Rheum.* 2000 May;43(5):1016-20.
59. Thomas L, Franck S et al. Reticulocyte hemoglobin measurement--comparison of two methods in the diagnosis of iron-restricted erythropoiesis. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43(11):1193-202.
60. Yeung GS, Zlotkin SH. Percentile estimates for transferrin receptor in normal infants 9-15 mo of age. *Am J Clin Nutr.* 1997 Aug;66(2):342-6.
61. Kling PJ, Roberts RA et al. Plasma transferrin receptor levels and indices of erythropoiesis and iron status in healthy term infants. *J Pediatr Hematol Oncol.* 1998 Jul-Aug;20(4):309-14.
62. Choi JW, Pai SH et al. Change in transferrin receptor concentrations with age. *Clin Chem.* 1999 Sep;45(9):1562-3.
63. Suominen P, Virtanen A et al. Regression-based reference limits for serum transferrin receptor in children 6 months to 16 years of age. *Clin Chem.* 2001 May;47(5):935-7.
64. Olivares M, Walter T et al. Usefulness of serum transferrin receptor and serum ferritin in diagnosis of iron deficiency in infancy. *Am J Clin Nutr.* 2000 Nov;72(5):1191-5.
65. Malope BL, MacPhail AP et al. The ratio of serum transferrin receptor and serum ferritin in the diagnosis of iron status. *Br J Haematol.* 2001 Oct;115(1):84-9.
66. Takala TI, Suominen P et al. Increased serum soluble transferrin receptor concentration detects subclinical iron deficiency in healthy adolescent girls. *Clin Chem Lab Med.* 2003 Feb;41(2):203-8.
67. Thomas L. Eisenstoffwechsel. In: Thomas L ed. *Labor und Diagnose.* Frankfurt/Main: Th-Books 2007:405-410.
68. Thomas L. Eisenstoffwechsel. In: Thomas L ed. *Labor und Diagnose.* Frankfurt/Main: Th-Books 2007:399-405.

69. Thomas L. Eisenstoffwechsel. In: Thomas L ed. Labor und Diagnose. Frankfurt/Main: Th-Books 2007:399.
70. Thomas L. C-Reaktives Protein (CPR). In: Thomas L ed. Labor und Diagnose. Frankfurt/Main: Th-Books 2007:1010-1022.
71. Chouliaras GL, Premetis E et al. Serum transferrin receptors: Distribution and diagnostic performance in pre-school children. *Blood Cells Mol Dis.* 2009 Sep-Oct;43(2):163-8. Epub 2009 Apr 24.
72. Ooi CL, Lepage N et al. Pediatric reference intervals for soluble transferrin receptor and transferrin receptor-ferritin index. *World J Pediatr.* 2009 May;5(2):122-6.
73. Cotton F, Thiry P et al. Measurement of soluble transferrin receptor by immunoturbidimetry and immunonephelometry. *Clin Biochem.* 2000 Jun;33(4):263-7.
74. Wians FH Jr, Urban JE et al. Soluble transferrin receptor (sTfR) concentration quantified using two sTfR kits: analytical and clinical performance characteristics. *Clin Chim Acta.* 2001 Jan;303(1-2):75-81.
75. Cooper MJ, Zlotkin SH. Day-to-day variation of transferrin receptor and ferritin in healthy men and women. *Am J Clin Nutr.* 1996 Nov;64(5):738-42.
76. Woorwood R. Serum transferrin receptor assays and their application. *Ann Clin Biochem.* 2002 May;39(pt 3):221-30.
77. Cook JD, Skikne BS et al. Serum transferrin receptor. *Annu Rev Med.* 1993;44:63-74.
78. Pettersson T, Kivivuori SM et al. Is serum transferrin receptor useful for detecting iron-deficiency in anaemic patients with chronic inflammatory diseases? *Br J Rheumatol.* 1994 Aug;33(8):740-4.
79. Kuiper-Kramer EP, Huisman CM et al. Analytical and clinical implications of soluble transferrin receptors in serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1996 Aug;34(8):645-9.
80. Danise P, Maconi M et al. Reference limits and behaviour of serum transferrin receptor in children 6-10 years of age. *Int J Lab Hematol.* 2008 Aug;30(4):306-11.
81. Heiduk M, Päge I et al. Pediatric reference intervals determined in ambulatory and hospitalized children and juveniles. *Clin Chim Acta.* 2009 Aug;406(1-2):156-61.
82. Suominen P, Punnonen K et al. Automated immunoturbidimetric method for measuring serum transferrin receptor. *Clin Chem.* 1999 Aug;45(8 Pt 1):1302-5.
83. Virtanen MA, Viinikka LU et al. Higher concentrations of serum transferrin receptor in children than in adults. *Am J Clin Nutr.* 1999 Feb;69(2):256-60.
84. Raya G, Henny J et al. Soluble transferrin receptor (sTfR): biological variations and reference limits. *Clin Chem Lab Med.* 2001 Nov;39(11):1162-8.
85. Allen J, Backstrom KR et al. Measurement of soluble transferrin receptor in serum of healthy adults. *Clin Chem.* 1998 Jan;44(1):35-9.

86. Thomas C, Thomas L. Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem*. 2002 Jul;48(7):1066-76.
87. Chuang CL, Liu RS et al. Early prediction of response to intravenous iron supplementation by reticulocyte haemoglobin content and high-fluorescence reticulocyte count in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2003 Feb;18(2):370-7.
88. Fishbane S, Shapiro W et al. A randomized trial of iron deficiency testing strategies in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 2001 Dec;60(6):2406-11.
89. Mittman N, Sreedhara R et al. Reticulocyte hemoglobin content predicts functional iron deficiency in hemodialysis patients receiving rHuEPO. *Am J Kidney Dis*. 1997 Dec;30(6):912-22.
90. Rolland-Cachera MF, Bellisle F et al. Nutritional status and food intake in adolescents living in Western Europe. *Eur J Clin Nutr*. 2000 Mar;54 Suppl 1:S41-6.
91. Vernet M, Doyen C. Assessment of iron status with a new fully automated assay for transferrin receptor in human serum. *Clin Chem Lab Med*. 2000 May;38(5):437-42.
92. Jain S, Narayan S et al. Evaluation of serum transferrin receptor and sTfR ferritin indices in diagnosing and differentiating iron deficiency anemia from anemia of chronic disease. *Indian J Pediatr*. 2001 Feb;77(2):179-83.

6. ANHANG

6.1 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Gerhard Gaedicke für die Überlassung des Themas, die konstante Förderung und die wissenschaftliche Unterstützung dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei meinem Betreuer Herrn Dr. med. Andreas Weimann für die wertvollen Hinweise und Ratschläge, die mir bei der Organisation und Durchführung der Arbeit eine große Hilfe waren.

Allen Ärztinnen und Ärzten sowie den Patientinnen und Patienten, die an dieser Studie teilgenommen haben gilt mein ganz besonderer Dank.

Mein Dank gilt außerdem den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Otto-Heubner-Centrums für Kinder- und Jugendmedizin für die gute Zusammenarbeit insbesondere bei der Rekrutierung von Studienteilnehmern auf den Stationen, in den Sprechstunden und der Rettungsstelle.

Für die Unterstützung bei der praktischen Umsetzung der Arbeit möchte ich mich bedanken bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Zentralinstituts für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie (ZLP).

Ein Dankeschön auch an Frau Dipl.-Math. Christine Gericke vom Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie für die geduldige Beratung bei der statistischen Auswertung.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern für die unerschöpfliche Unterstützung und den kompromisslosen Rückhalt danken.

Nicht zuletzt danke ich meinen Freunden und meiner Familie für die Geduld, das Verständnis und die vielen aufmunternden Worte.

6.2 Lebenslauf

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

6.3 Publikationen

Kongressbeitrag CCLM 2008

Weimann A, Blank C, Lun A, Gaedicke G. Rational anemia diagnostics of pediatric patients employing the novel Haemaplot and Thomasplot. Clin Chem Lab Med. 2008;46(9):A172.

6.4 Erklärung an Eides Statt

„Ich, Clara Petronia Blank, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [Dynamische Anämiediagnostik im Kindes- und Jugendalter] 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.“

Datum

Unterschrift