

Aus dem Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. R.E. Scharf

**Betrachtungen zur Rolle des Erythropoetins in der fetalen
Erythropoese bei Feten mit fetaler Alloimmunthrombozytopenie**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Christoph Schmülling
2005

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

gez.: Universitätsprofessor Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. Giers
Korreferent: Univ. Prof. Dr. Dr. Fritze

Meiner Familie

Verzeichnisse

Inhalt

VERZEICHNISSE

INHALT	4
ABBILDUNGEN	5
TABELLEN	5
ABKÜRZUNGEN UND ZEICHEN	6
1. EINLEITUNG	8
1.1 HISTORISCHER ÜBERBLICK	8
1.2 PHYSIOLOGIE DES ERYTHROPOETINS	9
1.3 BESONDERHEITEN DER EMBRYONALEN UND FETALEN ERYTHROPOESE	15
1.4 HÄMOGLOBINE DER INTRAUTERINEN PHASE	17
1.5 HÄMATOLOGISCHE BEFUNDE IN DER FETALZEIT	19
1.6 ERYTHROPOETIN IN DER FETALZEIT	22
1.7 ALLOIMMUNTHROMBOZYTOPENIE	23
1.8 ZIELSETZUNG	27
2. PATIENTEN UND METHODEN	28
2.1 PATIENTEN	28
2.2 TECHNIK DER INTRAUTERINEN PUNKTION/TRANSFUSION	28
2.3 BESTIMMUNG DES FETALGEWICHTES	29
2.4 BESTIMMUNG DES GESTATIONSALTERS	30
2.5 PATIENTENPROBEN	31
2.6 DER ENZYMIMMUNOASSAY	32
2.7 PROTOKOLL DES ENZYMIMMUNOASSAYS	33
2.8 DATENVERARBEITUNG UND STATISTISCHE AUSWERTUNG	36
3. ERGEBNISSE	38
3.1 AUSWERTUNG DES ENZYM-IMMUNOASSAY	38
3.2 EPO STANDARDKURVE	39
3.3 VERLÄUFE DER ERHOBENEN PARAMETER	40
3.4 VERLÄUFE DER ERHOBENEN PARAMETER DER FETEN	43
3.5 STATISTISCHE BERECHNUNGEN UND ERGEBNISSE	52
4. DISKUSSION	62
5. ZUSAMMENFASSUNG	66
6. LITERATUR	67
7: ANHANG	79
LEBENS LAUF	85
DANKSAGUNG	86

Abbildungen

Abbildung 1: Regelkreis der Erythropoese	9
Abbildung 2: Primärstruktur des humanen Erythropoetins	12
Abbildung 3: schematische Darstellung der Stadien der Erythropoese	13
Abbildung 4: Darstellung der embryonalen und fetalen Erythropoese	16
Abbildung 5: Verhältnis der einzelnen Hämoglobin-Polypeptidketten und Elektropheremuster während der intrauterinen und postnatalen Entwicklung	18
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Cordozentesetechnik:	29
Abbildung 7: Reaktionsschritte eins und zwei des Sandwich- ELISA	32
Abbildung 8: Reaktionsschritte drei und vier des Sandwich- ELISA	32
Abbildung 9: Mikrotiterplatte am Ende der Messung	34
Abbildung 10: Plattenreport	35
Abbildung 11: Standardkurve	39
Abbildung 12: sonografisch ermitteltes, fetales Gewicht im Vergleich zur Literatur	40
Abbildung 13: fetale Erythrozytenwerte im Vergleich zur Literatur	41
Abbildung 14: fetale Hb-Werte im Vergleich zur Literatur	41
Abbildung 15: fetale Hkt-Werte im Vergleich zur Literatur	42
Abbildung 16: fetales MCV im Vergleich zur Literatur	42
Abbildung 17: gemessene Parameter von Fetus 1 im Verlauf	44
Abbildung 18: gemessene Parameter von Fetus 2 im Verlauf	45
Abbildung 19: gemessene Parameter von Fetus 3 im Verlauf	46
Abbildung 20: gemessene Parameter von Fetus 4 im Verlauf	47
Abbildung 21: gemessene Parameter von Fetus 5 im Verlauf	48
Abbildung 22: gemessene Parameter von Fetus 6 im Verlauf	49
Abbildung 23: gemessene Parameter von Fetus 7 im Verlauf	50
Abbildung 24: gemessene Parameter von Fetus 8 im Verlauf	51
Abbildung 25: Erythropoetinkonzentrationen zu unterschiedlichen G.A.	53
Abbildung 26: Altersklassen Trimenon 2 und Trimenon 3	55
Abbildung 27: Fetalgewicht zu unterschiedlichem G.A.)	56
Abbildung 28: Erythropoetinkonzentration bei unterschiedlichen Fetalgewichten	58
Abbildung 29: Blockdiagramm der Gewichtsklassen ≤ 1400 g und > 1400 g	61
Abbildung 30: Linearer Anstieg der Erythrozytenzahl	83
Abbildung 31: Linearer Anstieg des Hämoglobins	83
Abbildung 32: Linearer Anstieg des Hämatokrits	84
Abbildung 33: Linearer Abfall des MCV	84

Tabellen

Tabelle 1: fetale Hämoglobinformen	17
Tabelle 2: Referenzwerte hämatologischer Parameter	20
Tabelle 3: Entwicklung der hämatologischen Parameter in der Fetalzeit	20
Tabelle 4: Phänotypenfrequenzen und Nomenklatur thrombozytenspezifischer Antigene	23
Tabelle 5: Nomogramm nach Hansmann, hier z.B. für die 30. SSW	30
Tabelle 6: Extinktionsmesswerte der Standardkurve	39
Tabelle 7: Korrelationen der erhobenen Parameter	52
Tabelle 8: Häufigkeitsverteilung der Altersgruppen	53
Tabelle 9: Deskriptive Statistik der Gruppe bis 187 SST	53
Tabelle 10: Deskriptive Statistik der Gruppe über 187 SST	54
Tabelle 11: Ränge der Altersgruppen	54
Tabelle 12: Statistische Ergebnisse des Altergruppenvergleiches	54
Tabelle 13: Korrelation von Gestationsalter und Fetalgewicht	56
Tabelle 14: Korrelation von Serumerythropoetin, Gestationsalter und Fetalgewicht	57
Tabelle 15: partielle Korrelation von Serumerythropoetin und Fetalgewicht	57
Tabelle 16: Häufigkeitsverteilung der Gewichtsklassen	59
Tabelle 17: Deskriptive Statistik der Gewichtsklasse bis 1400 g	59
Tabelle 18: Deskriptive Statistik der Gewichtsklasse über 1400 g	59
Tabelle 19: Ränge des Gewichtsklassenvergleiches	60
Tabelle 20: Statistische Ergebnisse des Gewichtsklassenvergleiches	60
Tabelle 21: Erfasste Rohdaten	79
Tabelle 22: erfasste Rohdaten (Fortsetzung)	80
Tabelle 23: Bezeichnung der Variablen	81
Tabelle 24: Bezeichnung der Variablen (Fortsetzung)	82

Abkürzungen und Zeichen

Abkürzung	Bedeutung
° C	Grad Celsius
A.	arteria
Abb.	Abbildung
BFU-E	burst-forming unit-erythroid
BEP	Behring® ELISA Processor
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	cluster of differetiation
CFU	Colony-forming unit
CSF	Colonystimulierender Faktor
Da	Dalton
dl	Dezilter
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent assay
EPO	Erythropoetin
fl	femtoliter
FAITP	fetale Alloimmunthrombozytopenie
G.A.	Gestationsalter
G-CSF	Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor
GvH	graft versus host
Hb	Hämoglobin
HbF	fetales Hämoglobin
HIF	hypoxia inducible factor
HPA	human platlet antigen
HRE	Hypoxia-response-elements
IE =IU	internationale Einheit = international unit
IGF	insulin like growth factor
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IUTT	intrauterine Thrombozytentransfusion
L	Liter
MCV	Mittleres (Erythrocyten)Zellvolumen
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
m-RNA	messenger Ribonukleinsaäre
NESP	new erythropoiesis stimulating Protein
O.A.	Ovulationsalter
Abkürzung	Bedeutung
o.d.	optical density
O ₂	Sauerstoff

Abkürzung	Bedeutung
p	Signifikanzniveau
p.p.	post partum
r	Korrelationskoeffizient
rHuEPO	recombinant human Erythropoetin
s	Sekunde
SCF	stem cell factor
SD	Standardabweichung
sEPO	Serumerythropoetin
SO ₂	Sauerstoffsättigung
Tab.	Tabelle
TMB	Tetramethylbenzidin
uEPO	human urine derived Erythropoetin
V	vena
VEGF	vaskular endothelial growth factor
vgl.	vergleiche
vs.	versus
Vv.	venae
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
±	Plus Minus in Zusammenhang mit SD
≤	Kleiner Gleich = bis
>	größer

1. Einleitung

Der fundamentalste Vorgang in der fetalen Entwicklung von Mensch und Tier ist das Wachstum, welches durch eine Zunahme von Volumen und Gewicht definiert ist. Wachstum findet in unterschiedlichen Formen statt: Hyperplasie, Hypertrophie und Zunahme der Intrazellulärsubstanz. Alle Formen sind Sauerstoffabhängig. Entsprechend des Zuwachses an Zellmasse und des damit steigenden Sauerstoffbedarfes muß hierzu proportional die Masse des Blutvolumens und der Sauerstoffträger wachsen.

Die humorale Regulation der Erythropoese wird durch das Hormon Erythropoetin vermittelt. (Groopman et al. 1989). Die Physiologie des Erythropoetins beim Erwachsenen gilt als gut bekannt. Der Einfluß des Erythropoetins auf die fetale Erythropoese ist Gegenstand nur weniger Studien und bisher vornehmlich im Tiermodell untersucht, Lediglich vier Untersuchungen (Thomas et al., 1983; Forestier et al., 1991, Ireland et al., 1992, Moya et al., 1993) präsentieren Daten von Erythropoetinkonzentrationen gesunder Feten.

1.1 Historischer Überblick

Die ersten Hinweise auf einen erythropoetische Wachstumsfaktor ergaben sich aus den Versuchen von Carnot und Deflandre 1906. Sie injizierten das Serum anämisierter Hasen gesunden Artgenossen und sahen einen Anstieg der Erythrozytenmasse bei diesen von 20-40% innerhalb von nur zwei Tagen.

Erst die Entwicklung feinerer Untersuchungsmethoden ab Beginn der fünfziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts zum Nachweis erythropoetischer Aktivität sicherte die Theorie des hormonellen Regelkreises (Reissmann, 1950; Rubenstroth-Bauer, 1950; Erslev, 1953; Plzak et al., 1955).

1977 gelang es Miyake et al. aus einem Pool von 2550 Litern Urin aplastisch, anämischer Patienten, Erythropoetin mittels Alkoholpräzipitation, Gelfiltration und Adsorptionschromatografie zu fraktionieren und extrahieren. Das aus Urin gewonnene Erythropoetin (uEPO) hatte eine Aktivität von 74.000 IU/mg Protein, die Molekülmasse betrug 34.000 Dalton und der Kohlenhydratanteil 40%. Nach dieser erstmaligen reinen Darstellung des urinen Erythropoetins konnte durch Gewinnung von Teilaminosequenzen mittels Hybridisierungstechnik das Erythropoetingen auf

dem langen Arm des Chromosoms 7 identifiziert werden. Von diesem Gen mit seinen fünf Exons und vier Introns ausgehend wird zunächst ein 193 Aminosäuren (AS) umfassendes Propeptid translatiert, dessen aktive Form nach Abspaltung von 27 AS und des carboxyterminalen Arginins entsteht (Lei et al., 1986; Recny et al., 1987).

Seit 1988 ist rekombinantes Erythropoetin (rHuEPO) als Arzneimittel in Deutschland (Erypo[®], Janssen Cilag, persönliche Mitteilung) zur Behandlung von Anämien unterschiedlichster Ätiologie sowie zur Vermeidung bzw. Reduktion homologer Erythrozytentransfusionen zugelassen.

Rekombinantes Erythropoetin wird mit Hilfe eines Erythropoetingen tragenden Expressionsplasmides hergestellt, das in Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen eingeschleust wird. Diese Säugetierzellen exprimieren und synthetisieren in der Folge Erythropoetin (siehe Darstellung Meyer, 1989).

1.2 Physiologie des Erythropoetins

Synthese und Sekretion des Erythropoetins folgen einer Feedback Regulation im Sinne eines *Regelkreises* (siehe Abbildung 1), der die Konstanzhaltung bzw. Adaption der Erythrozytenmasse (=Hämatokrit) steuert und folglich die Sauerstoffversorgung aller Körperzellen gewährleistet. Dies entspricht der *Regelgröße*.

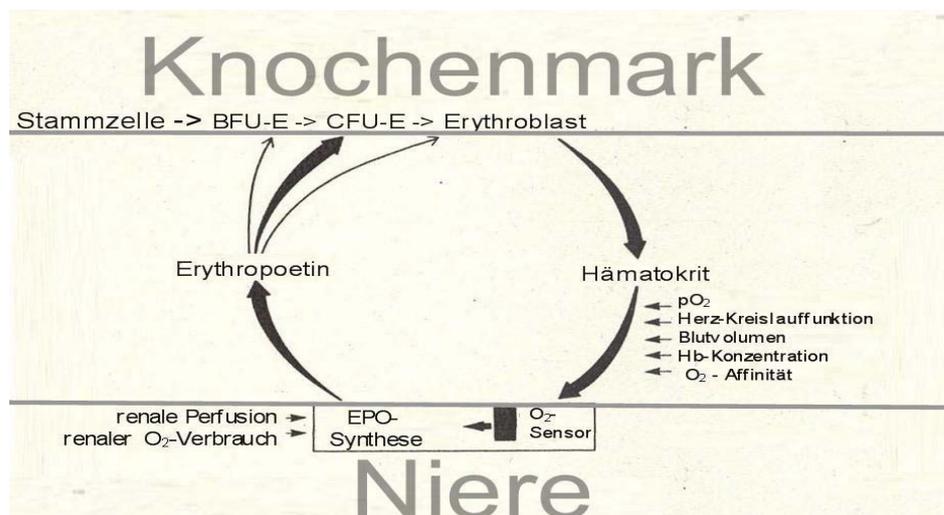


Abbildung 1: Regelkreis der Erythropoese modifiziert und übersetzt nach AJ Erslev, The New England Journal Of Medicine, S 1340, 1991

Messwerk ist ein Sauerstoffsensoren zur Ermittlung des *Ist-Wertes*. Abweichungen vom *Sollwert* sind hinsichtlich der Erythropoetinsynthese bedingt durch verschiedene Arten der Gewebshypoxie und führen zu einer konsekutiven Anpassung des *Stellgliedes*.

1. **Anämische Hypoxie** a: Blutungen: akute Blutverluste eines Erwachsenen von 450 ml führen zu einem signifikanten Erythropoetinanstieg innerhalb von 24 Stunden (Cotes, 1989). Ebenfalls wurden bei linearem Abfall von Hämatokrit und Hämoglobinkonzentration exponentiell steigende Erythropoetinwerte beschrieben (Bauer et al., 1989; Jelkmann et al., 1990; Erslev, 1988) b: Hämolyse
c: Knochenmarksynthesestörungen
2. **Hypoxämische Hypoxie** a: Kohlenmonoxidintoxikationen
b: hypokapnische Hypoxämie, Aufenthalte in großen Höhen mit vermindertem Sauerstoffpartialdruck führen zu exponential steigenden Erythropoetinkonzentrationen (Cotes, 1989; Pagel et al., 1989)
c: hyperkapnische Hypoxämie mit einer O₂-Verteilungsstörungen wie bei Asthma bronchiale oder Lungenemphysem-bedingten Diffusionsstörungen, hier ist die zu beobachtende Polyglobolie auf erhöhte Erythropoetinkonzentration zurückzuführen (Rhyner, 1989)
3. **Zirkulatorische Hypoxämie** a: reduzierte kardiopulmonale Funktion und b: zyanotische Herzvitien: diese gehen mit erhöhten Erythropoetinkonzentrationen einher (Hågå et al., 1987)

Der Sensor- und Syntheseort des Erythropoetins sind Fibroblasten der peritubulären Kapillare in der Niere (Bachmann et al., 1993; Maxwell et al., 1993 und 1997). Leiden mehrere Fibroblasten unter einer Hypoxie kommt es zu einer vermehrten Produktion von Erythropoetin.

Sauerstoffabhängige Regulation des Hypoxia-inducible-factors (HIF) abhängigen Transkriptionsfaktors spielt eine wesentliche Rolle in der Hochregulation hypoxischer Zellen (Semenza, 1999; Zhu et al., 2001; Ivan et al., 2001). Die Feststellung, dass die HIF 1 α Untereinheit die Expression des EPO-Gens und anderer Sauerstoffregulierter Gene kontrolliert, ist eine der wichtigsten Erkenntnisse der jüngsten Vergangenheit. Nicht-hypoxische Zellen enthalten keine messbaren HIF 1 α -Konzentrationen, wo hingegen hypoxische Zellen eine HIF 1 α -Expression nach 30 Minuten zeigen. Oberhalb einer kritischen intrazellulären Sauerstoffkonzentration wird HIF 1 α schnell in Zellorganellen, sog. Proteasomen, abgebaut. Unterhalb dieser kritischen Sauerstoffkonzentration wird HIF 1 α mehrschrittig konserviert und stabilisiert, so dass es zu einer stabilen, heterodimeren Bindung von HIF 1 α und HIF

1 β kommt. Dieser HIF α - β -Heterodimer wandert in den Zellnucleus und bindet an „Hypoxia-response-elements“ (HRE), ein Bestandteil von Genen, deren Expression durch Hypoxie hochreguliert wird. (Siehe auch Semenza, 2001) Neben Erythropoetin gehören beispielsweise „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) und IGF zu denjenigen Hormonen, deren Genexpression HIF-reguliert sind und eine bedeutende Rolle in der Sauerstoff-Homeostase haben. Nach Genexpression und –Transkription erfolgt die Translation des Proteins Erythropoetin.

Stellgröße ist das Erythropoetin.

Erythropoetin ist ein Glykoprotein mit einer Molekülmasse von 30,4 kDa, bestehend aus 166 Aminosäuren und einem Kohlenhydratanteil von 40%, wobei der Peptidanteil die Rezeptorbindung vermittelt und in vitro die Erythropoese stimuliert (Imai et al., 1990) und der Kohlenhydratanteil für das in vivo Überleben des Hormons notwendig ist. (Dordal et al., 1985).

Das Erythropoetinmolekül (siehe Abbildung 2) ist hydrophob und temperaturstabil bis 80°C, Es bewahrt seine biologische Aktivität in einem pH-Fenster von 3,5 bis 10,0 (Lappin et al., 1989).

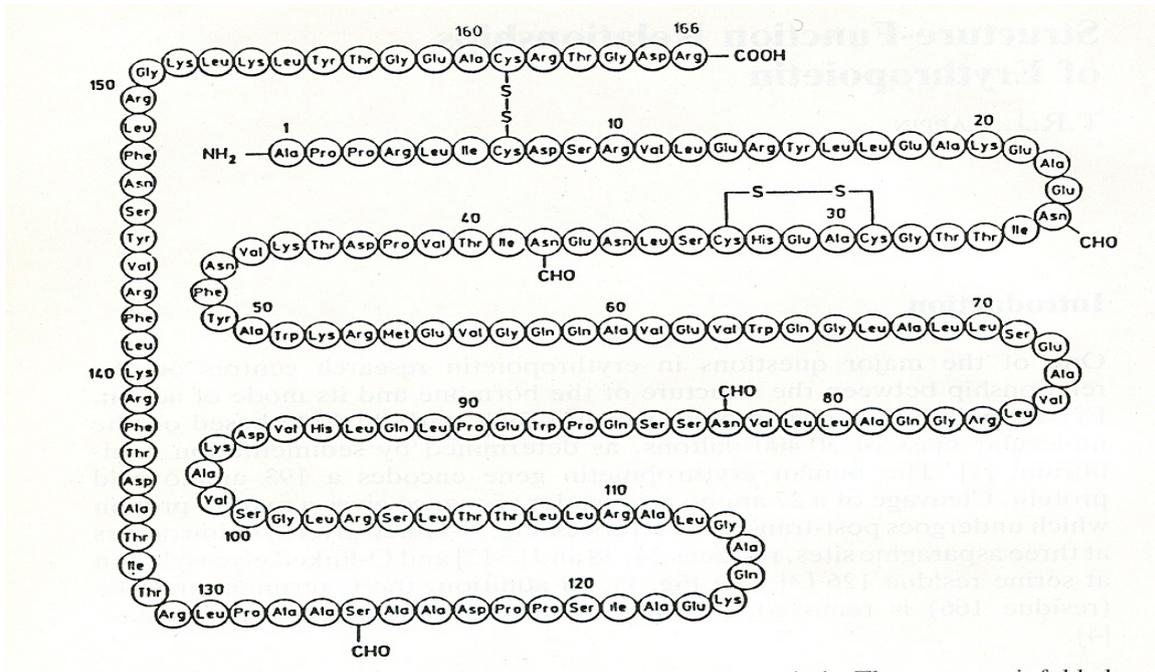


Abbildung 2: Primärstruktur der Aminosäuresequenz des humanen Erythropoetins, willkürlich zu Darstellungszwecken gefaltet. Zwei Disulfidbrücken verbinden Cys7 mit Cys 161 und Cys 29 mit Cys 33. An den Positionen 24,38 und 83 finden sich 3 N-gebundene Kohlenhydratanteile und an Position 126 1 O-gebundene Glycosidkette. aus Lappin et al., 1989

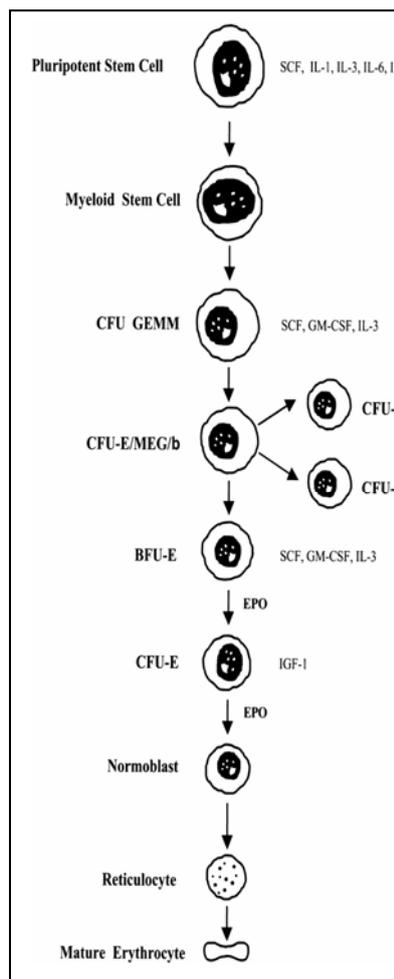
Die in der Abbildung 2. zu erkennenden Disulfidbrücken zwischen den Aminosäuren 7 und 161 sowie 29 und 33 scheinen für die Proteinstruktur verantwortlich zu sein. Die Untersuchung der Sekundärstruktur zeigt einen 50%igen Anteil von α -Helix, der Rest ist wahllos angeordnet. Eine Tertiärstruktur ist nicht vorhanden (Lai et al., 1986) Hinsichtlich der biochemischen Eigenschaften können mehrere Erythropoetinformen unterschieden werden. Die spezifische Aktivität variiert zwischen 70.000 IU/mg Peptid für uEPO und 200.000 IU/mg für rHuEPO. Die Plasmahalbwertszeit beträgt sechs bis acht Stunden. 2001 berichteten Egrie et al. erstmals über NESP, auch bezeichnet als Darbopoetin α . Dabei handelt es sich um ein rHuEPO-Analogon, das zwei zusätzliche N-gebundene Kohlenhydratkette besitzt. Die Plasmahalbwertszeit ist im Vergleich zu rHuEPO auf das Drei- bis vierfache verlängert.

Stellglied und *Regelwerk* entspricht dem Knochenmark und hier den EPO-sensiblen determinierten Stammzellen (Abb. 3). Der Erythropoetinrezeptor wurde mit Jod-

markiertem RHuEPO auf Erythroiden Zellen entdeckt, Insbesondere auf den Zellen der CFU-E und Proerythroblasten finden sich Erythropoetinrezeptoren mit einer Dichte von einigen hundert bis wenigen Tausend Rezeptoren pro Zelle (D'Andrea et al., 1990; Sawada et al., 1991; Broudy et al., 1991).

Ihren Ursprung hat die Erythropoese in der pluripotenten, hämatopoetischen Stammzelle, die unter dem Einfluß von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren – zusammengefaßt unter dem Oberbegriff der Zytokine - verschiedene Grade der Differenzierung durchmacht.

Der nächste Reifungsgrad ist die multipotente lymphatische oder myeloische Stammzelle, die unter der Wirkung von SCF,IL-6 und IL-11 eine gemischte CFU oligopotenter Progenitorzellen bildet. Aus dieser wird unter der Regulation von EPO, GM-CSF und Interleukin 3 die erythropoetisch determinierte Progenitorzelle (BFU-E) entwickelt. Diese reift unter Einfluß von EPO und wenigstens eines IGF, z.B. IGF 1, weiter zu Zellen der CFU-E, welche die Vorstufe der ersten morphologisch identifizierbaren Proerythroblasten (E1) ist. Die anschließenden



Differenzierungsstufen, reguliert durch EPO (Gregory et al., 1974 und 1978), umfassen den basophilen Proerythroblasten (E2) und den polychromatischen Erythroblasten (Makroblast E3). Zu diesem Zeitpunkt verliert sich die Zellteilungsfähigkeit.

Ohne weitere Zellteilung reift der polychromatische Normoblast (E4) zum orthochromatischen Normoblasten (E5) und nach Ausstoßung des Zellkerns zum Retikulozyten. In diesem Reifungszustand verlassen wahrscheinlich alle Erythrozyten das Knochenmark und sind im peripheren Blut nachweisbar. Für die Dauer von 2-5 Tagen findet in den noch verbliebenen Zellorganellen (Ribosomen, Mitochondrien und Resten des endoplasmatischen Retikulums, etc.) eine geringfügige Hämoglobinbildung statt.

Abbildung 3: schematische Darstellung der Stadien der Erythropoese aus Fisher JW, 2003

Die Zellorganellen und RNA-Reste sind spezifisch anfärbbar und verleihen der Zelle ihren Namen. Nach deren Verlust ist die Reifung des Erythrozyten abgeschlossen. Nach den verschiedenen o.g. Teilungen, die in vivo mehrere Tage dauern, durchlaufen die Zellen eine typische morphologische und funktionelle Differenzierung. Vom Stadium der Proerythroblasten bis zum Retikulozyten vergehen ca. fünf Tage und aus einem Proerythroblasten entstehen acht bis 16 Retikulozyten. Dabei verlieren sie stufenweise ihre proliferative Kapazität. Während die Synthese von RNA und Proteinen im Laufe der erythropoetischen Differenzierung abnimmt, steigt die Hämoglobinbildung deutlich an (Thomas L, 1998).

Bei Gesunden besteht eine inverse logarrhythmisch-lineare Beziehung zwischen Erythropoetinkonzentration und dem Hämatokrit bzw. der Hämoglobinkonzentration. Das sezernierte EPO wirkt im Knochenmark als linienspezifisch regulierend auf das Überleben, die Proliferation und Differenzierung der erythroiden Progenitorzellen. Eine erhöhte EPO-Synthese führt folglich zu einer Erhöhung der Erythrozytenmasse, die wiederum im feedback die EPO-Synthese und Sekretion hemmt.

1.3 Besonderheiten der embryonalen und fetalen Erythropese

Die Blutkreisläufe von Mutter und Fetus sind zwei getrennte Systeme. Beide Kreisläufe kommen in der Plazenta zusammen und sind durch mehrere Gewebeschichten, die sogenannte Plazentaschranke voneinander getrennt. Mütterliche und fetale Erythrozyten passieren die plazentare Barriere nicht. Dementsprechend unterliegt die Blutbildung und die Blutbildungsregulation der eigenständigen Kontrolle des Fetus. In der Embryonal- bzw. Fetalphase verläuft die Blutbildung in drei sich überschneidenden und ablösenden Phasen.

1.3.1 Megaloblastische Erythropese

Sie beginnt etwa am 14. Tag -dem Gefäßsystem ähnlich- zunächst extraembryonal in den Blutinseln des Dottersacks und des Chorions. Hier entstehen die ersten Hämozytoblasten ausgehend von großen kernhaltigen Megaloblasten. Die sich hieraus entwickelnden embryonalen Erythrozyten sind groß und kernhaltig. Das Maximum dieser Blutzellbildung liegt etwa in der vierten Woche und ist nach 6 Wochen nicht mehr nachweisbar.

1.3.2 Hepatolienale Erythropese

Während und nach der Involution des Dottersackes ab der vierten Woche übernimmt das Mesenchym der Leber- und Milzanlage die Erythropese. Diese Erythrozyten enthalten ausschließlich fetales Hämoglobin, die Lebensdauer der Erythrozyten dieser Phase beträgt 45-70 Tage. Die Steuerung erfolgt anfangs durch ein intrahepatisch und später durch ein von der Niere sezerniertes Erythropoetin. Das Maximum dieser Blutbildung wird für die Leber mit der 10.-12. Woche und für die Milz mit der 20. Woche angegeben. Diese Form der Erythropese ist unter pathologischen Umständen auch postnatal reaktivierbar.

1.3.3 Medulläre Erythropoese

Bereits ab der 10. Woche beginnt die Blutbildung im Knochenmark (Yoffrey 1971), dominiert ab der 28. Woche und geht dann kontinuierlich in die postnatale Erythro- und Myelogenese (siehe Abb. 4) über. Die hier gebildeten Erythrozyten enthalten bereits adultes Hämoglobin. Bis zur Geburt ist das gesamte Knochenmark blutbildend. Erst nach der postnatalen überwiegenden Umwandlung in gelbes Knochenmark ist die Erythropoese auf das rote Knochenmark in den Epyphysen der Röhrenknochen und in den platten Knochen (z.B. Sternum) beschränkt. Diese Form besteht lebenslang fort.

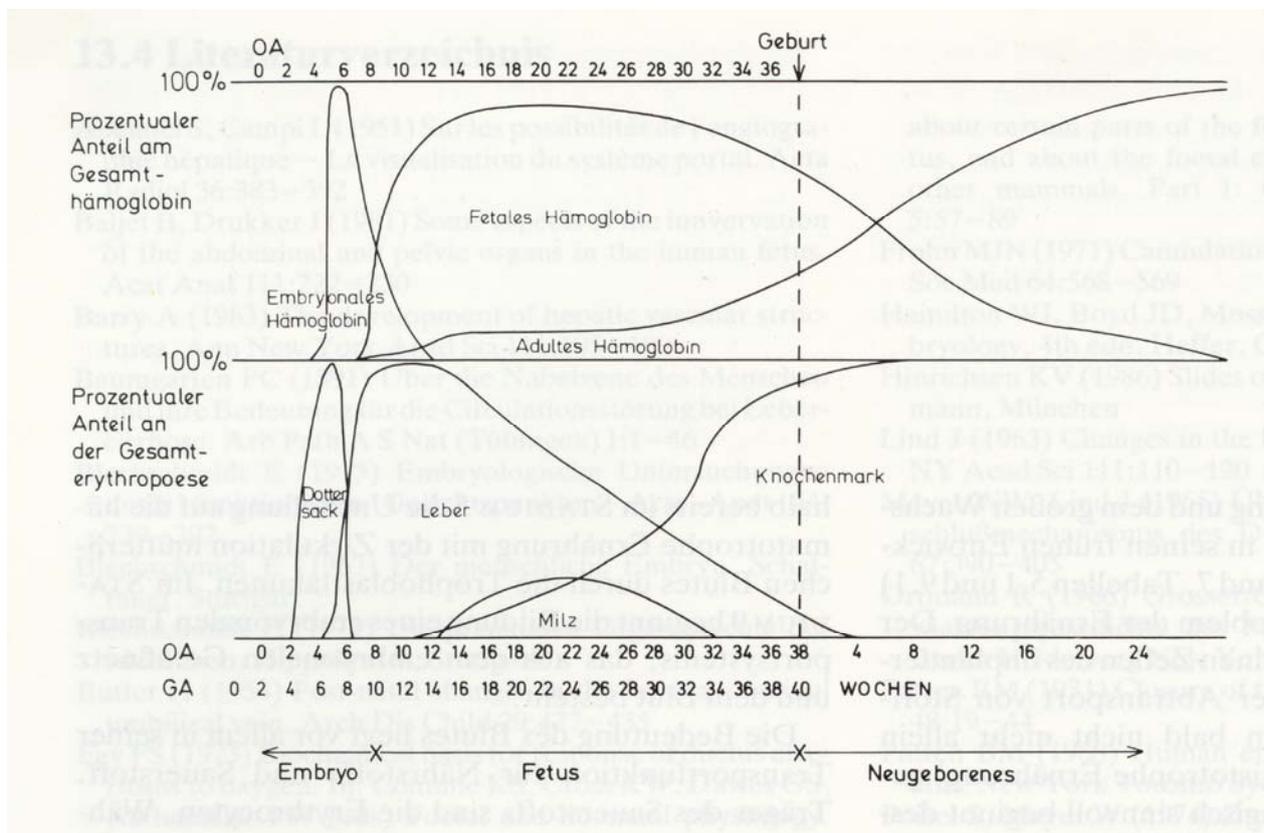


Abbildung 4: Darstellung der embryonalen und fetalen Erythropoese

Legende: OA = Ovulationsalter

GA = Gestationsalter

(nach Nathan und Oski, 1981) aus KV Hinrichsen Humanembryologie 1990

1.4 Hämoglobine der intrauterinen Phase

In Abhängigkeit der oben genannten Blutbildungsorgane werden unterschiedliche Hämoglobinmoleküle gebildet.

Hämoglobin ist ein aus einem Protein-(Globin-) und einem Porphyrinanteil zusammengesetztes Chromoprotein. Man unterscheidet Globine vom β -Typ (ϵ, γ, δ und β) und α -Typ (α und ξ). Jedes Hämoglobinmolekül besteht aus vier Polypeptidketten, je einem Paar des α -Typs und einem Paar des β -Typs. Jede Polypeptidkette trägt als prosthetische Gruppe ein Hämmolekül.

Entwicklungszustand	Hämoglobintyp	Globinketten
Fetus	Gower 1 Gower 2 Portland	$\xi_2\epsilon_2$ $\alpha_2\epsilon_2$ $\xi_2\gamma_2$
Fetus	HbF	$\alpha_2\gamma_2$
Adult	HbA HbA2	$\alpha_2\beta_2$ $\alpha_2\delta_2$

Tabelle 1: fetale Hämoglobinformen

In Abhängigkeit von der Entwicklungsphase werden unterschiedliche Hämoglobintypen gebildet (vgl. Tabelle 1 und Abb. 5). Während der megaloblastischen Phase werden drei embryonale Hämoglobine gebildet Hb Gower 1, Hb Gower 2 und Hb Portland. Die Synthese dieser frühen Globinmoleküle erfolgt in der vierten bis sechsten Woche auch noch in der Leber und wird ab der sechsten Woche bis postnatal durch die Bildung der Untereinheiten des HbF abgelöst. HbF besitzt im Vergleich zu den adulten Hämoglobinen eine sehr viel höhere Sauerstoffaffinität. Dies gewährleistet eine optimale Aufnahme von O_2 aus dem mütterlichen Plazentablut (A. uterina: $pO_2 \sim 100$ mmHg, $SO_2 \sim 97\%$, $pH \sim 7,42$) und trägt gleichzeitig dem relativ hohem pH des fetalen Blutes Rechnung (V. umbilicalis: $pO_2 \sim 30$ mmHg, $SO_2 \sim 60-70\%$, $pH \sim 7,30$).

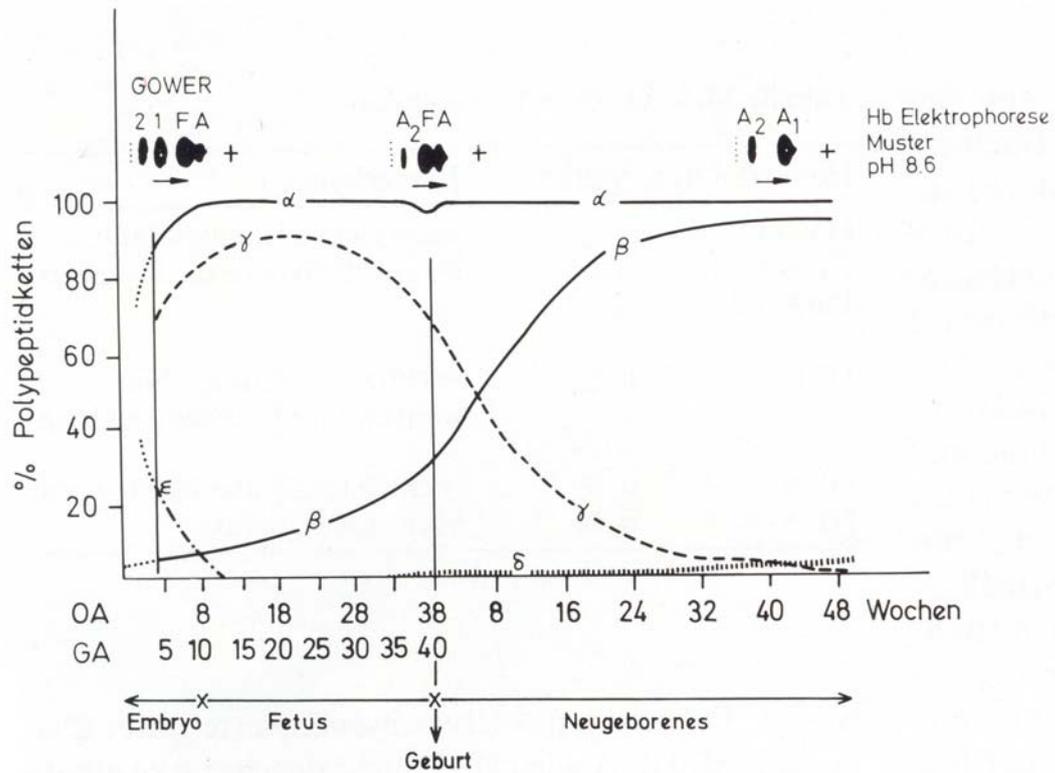


Abbildung 5: Verhältnis der einzelnen Hämoglobin-Polypeptidketten und Elektrophoresemuster während der intrauterinen und postnatalen Entwicklung
 Legende: OA = Ovulationsalter
 GA = Gestationsalter
 (nach Pearson, 1966) aus KV Hinrichsen Humanembryologie 1990

1.5 Hämatologische Befunde in der Fetalzeit

Bei Geburt besitzt ca. 55-70% des Hämoglobins die fetale Struktur. Nach zwölf Monaten p.p. beträgt dieser Anteil konstant 2%. Adultes Hämoglobin wird in kleinen Mengen bereits in der Embryonalzeit gebildet. Bis zur Geburt beträgt sein Anteil ca. 30%, erst postnatal erfolgt die Umstellung von fetaler auf adulte Erythropoese, konkret der Ersatz der γ -Kette durch die β -Kette. Dies ist auch an der Veränderung der Erythrozytengröße erkennbar. Bei Geburt beträgt das MCV noch ca 95 fl und erreicht nach ca. sechs Monaten den durchschnittlichen Erwachsenenwert von 80-96 fl. Die Mechanismen und Ursachen der Hämoglobinumstellung als auch der Wechsel des Syntheseortes sind nicht geklärt. Wie aus der Veränderung des postpartalen MCV zu ersehen, ergeben sich für auch für die Fetalzeit Gestationsalter-abhängige Werte der Erythrozytenmasse und -morphologie. In Tabelle 2 finden sich vergleichende Blutbildbefunde aus der Fetalzeit in unterschiedlichen Gestationsaltern. Sämtliche Proben wurden mittels Cordozentese – fetal blood sampling- (hierzu siehe Kapitel 2) gewonnen. Forestier et al untersuchten 1986 163 Feten von der 18. bis 30. SSW, derselbe Autor veröffentlichte 1991 die Werte von 2860 Feten in der 18. bis 30. SSW, Zwischenzeitlich berichteten Takagi et al 1989 über 45 Feten in der 18. bis 38. SSW. Boulot et al publizierten ihre Blutbildergebnisse von 541 Feten in der 18. bis 38. SSW. In allen vier Studien wurden ausschließlich nur Proben von reifgeborenen, gesunden oder Kindern mit einer die Hämopoese nicht beeinträchtigenden Behinderung – z.B. Spina bifida, Klumpfuß - berücksichtigt.

SSW	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
Gestationsalter in d	119	126	133	140	147	154	161	168	175	182	189	196	203	210	217	224	231	238	245	252	259	266	273	280	Studie
Probanden / Parameter	25		55			61			22												Forestier et al, 1986				
	760				1200				460				440								Forestier et al, 1991				
	8		253				139				110				31				Boulot et al, 1993						
Erythrozyten in 10^{12} /liter	2,66 ± 0,29		2,96 ± 0,26			3,06 ± 0,26			3,52 ± 0,32												Forestier et al, 1986				
	2,85 ± 0,36				3,09 ± 0,34				3,46 ± 0,42				3,82 ± 0,64								Forestier et al, 1991				
	2,7 ± 0,6		2,7 ± 0,4				3,2 ± 0,4				3,5 ± 0,5				3,8 ± 0,5				Boulot et al, 1993						
Hb in g/dl	11,47 ± 0,78		12,28 ± 0,89			12,40 ± 0,77			13,35 ± 1,17												Forestier et al, 1986				
	11,69 ± 1,27				12,20 ± 1,6				12,91 ± 1,38				13,64 ± 2,21								Forestier et al, 1991				
	10,9 ± 0,6		11,3 ± 1,5				12,2 ± 1,6				13,1 ± 1,7				13,9 ± 1,6				Boulot et al, 1993						
Hkt in %	35,86 ± 3,29		38,53 ± 3,21			38,59 ± 2,41			41,54 ± 3,31												Forestier et al, 1986				
	37,3 ± 4,32				38,59 ± 3,94				40,88 ± 4,4				43,55 ± 7,2								Forestier et al, 1991				
	34,6 ± 2,4		33,5 ± 4,9				35,8 ± 4,5				38,3 ± 5,7				41,3 ± 4,9				Boulot et al, 1993						
MCV in fl	133,92 ± 8,83		130,06 ± 6,17			126,16 ± 6,23			118,17 ± 5,75												Forestier et al, 1986				
	131,11 ± 10,97				125,1 ± 7,84				118,5 ± 7,96				114,38 ± 9,34								Forestier et al, 1991				
	127 ± 20		120 ± 11				112 ± 9,1				108 ± 7,8				109 ± 9,8				Boulot et al, 1993						

Tabelle 2: Referenzwerte hämatologischer Parameter

Anhand der ermittelten Werte beschreiben die Autoren lineare Anstiege für Erythrozytenzahl, Hämoglobin und Hämatokrit sowie einen linearen Abfall des MCV (siehe Tab. 3). Die Anstiegssteilheit der jeweiligen Geraden differieren marginal, was ehestens mit den unterschiedlichen Kollektivgrößen und den unterschiedlichen Gestationsaltern erklärlich ist.

Parameter	Funktion	Probandenzahl	Studie
Erythrozyten in 10^{12} /liter	$Y = 1,03(\pm 0,03) + 0,09 (\pm 0,01)X$	163	Forestier et al, 1986
	$Y = 1,45 + 0,069X$	45	Takagi et al, 1989
	$Y = 1,1 + 0,1X$	541	Boulot et al, 1993
Hb in g/dl	$Y = 7,7(\pm 1) + 0,2(\pm 0,0,04)X$	163	Forestier et al, 1986
	$Y = 8,49 + 0,1578X$	45	Takagi et al, 1989
	$Y = 7,5 + 0,2X$	541	Boulot et al, 1993
Hkt in %	$Y = 25,6(\pm 4) + 0,57(\pm 0,0,1,6)X$	163	Forestier et al, 1986
	$Y = 26,7853 + 0,4528X$	45	Takagi et al, 1989
	$y = 22,9 + 0,5X$	541	Boulot et al, 1993
MCV in fl	$Y = 164,2(\pm 7) - 1,61(\pm 0,3)X$	163	Forestier et al, 1986
	$Y = 187,2661 - 4,0251X + 0,0516X^2$	45	Takagi et al, 1989
	$Y = 47,9 - 0,4X$	541	Boulot et al, 1993

$X = \text{SSW}$

Tabelle 3: Entwicklung der hämatologischen Parameter in der Fetalzeit

Abschließend betrachtet kommt es im letzten Schwangerschaftsdrittel zu einem linearen Anstieg der Erythrozytenzahl, des Hämoglobins und des Hämatokrits. Das

fetoplazentare Blutvolumen nimmt in Form einer Exponentialfunktion zu und verfünffacht sich von der 20. bis zur 30. SSW (Nicolaides et al.,1987). Kombiniert mit der Erythrozytenregeneration muß es im Schwangerschaftsverlauf zu einer Verfielfachung der erythropoetischen Zellen kommen, die Thomas et al. 1962 für das zweite Trimenon abschätzend mit einer Verdreißigfachung angibt, da von der 12. bis zur 25. SSW die Anzahl von Erythrozyten/ μ l verdoppelt wird, während gleichzeitig das Fetalgewicht versiebzehnfacht wird.

1.6 Erythropoetin in der Fetalzeit

Erythropoetin ist ab dem zweiten Trimenon das entscheidende Regulativ der Erythropoese. In vitro wurde an fetalen, humanen, determinierten hämato-poetischen Stammzellen (BFU-E und CFU-E) der 12-19 (22) SSW gezeigt, dass Proliferation und Differenzierung ohne Erythropoetin in Analogie zum adulten Organismus nicht möglich ist (Linch et al., 1982; Hassan et al., 1979). Der bisher früheste Nachweis von Serumerythropoetin gelang Ireland et al., 1992 aus einer Nabelschnurblutprobe eines 16 SSW alten Fetus.

1983 hat Thomas et al. einen kontinuierlichen Anstieg des Erythropoetins von der 19 bis zur 42.SSW bei 43 Feten auf durchschnittlich 40mIU/ml beschrieben. Forestier et al. konnten diesen Anstieg bei 163 Feten nicht nachvollziehen und fanden relativ konstante fetale Serumerythropoetinwerte zwischen 0 bis 12 mIU/ml unabhängig vom Gestationsalter ($1,6 \pm 2,5$ mIU/ml, $r=0,062$, $p>0,2$)

1992 fanden Ireland et al., bei 90 Feten nach Cordozentese einen durchschnittlichen Anstieg des Serumerythropoetins von der 16. bis zur 40. SSW von vier auf 13 mIU/ml.

Moya et al. 1993 untersuchten das Verhalten des Serumerythropoetins bei fetaleler, isoimmunhämolytischer Anämie im Vergleich zu gleichaltrigen gesunden Feten. In ihrer Kontrollgruppe von der 17. bis 38. SSW konnten sie einen signifikanten, schwangerschaftsaltersabhängigen Anstieg zeigen. (GA=23,1±6,7SSW, EPO=12,5±3,1mIU/ml, n=13 vs. GA=39,1±0,6SSW, EPO=23,3±9,6mIU/ml, n=20; $r=0,8$, $p<0,001$).

Im Rahmen von unterschiedlichen Erkrankungen wie z.B. Down Syndrom, Plazentainsuffizienz, maternalem Diabetes mellitus waren deutlich höhere Plasmaerythropoetinkonzentrationen nachgewiesen worden. Insbesondere die isoimmunhämolytische, fetale Anämie zeigte deutlich gesteigerte Serumerythropoetinkonzentrationen zwischen 97 bis 106 mIU/ml bei Thomas et al., 1983, Moya et al., 1993 fand sogar Werte von zu Beginn der intrauterinen Transfusionstherapie zwischen 104 und 786 mIU/ml.

1.7 Alloimmunthrombozytopenie

1.7.1 Definition

Die fetale Alloimmunthrombozytopenie (FAITP), Erstbeschreibung durch Moulinier et al. (1958) ist eine schwerwiegende hämatologisch-immunologische Störung des ungeborenen Kindes, die auf einer Inkompatibilität humaner Plättchenantigene (HPA) zwischen Mutter und Fetus beruht. Hierbei ruft eine Alloantikörperbildung der Mutter gegen ein fetales vom Vater vererbtes Plättchenantigen im kindlichen Organismus einen beschleunigten Thrombozytenabbau mit resultierender, meist ausgeprägter Thrombozytopenie hervor. Zu einer Immunisierung der Mutter kann es durch diaplazentaren Übertritt fetaler Thrombozyten bereits in der ersten Schwangerschaft und vor der 18. SSW kommen (Bussel et al. 1997). Bei dieser Erkrankung spielen, wie auch beim analogen Bild des Morbus haemolyticus neonatorum, nur Antikörper der Klasse IgG eine Rolle, weil allein sie diaplazentar auf den Fetus übertragen werden. Die Tabelle 4 zeigt aufgeschlüsselt nach neuer und alter Nomenklatur die wichtigsten thrombozytenspezifischen Alloantigene.

System neu	System alt (Synonyme)	Antigene	Phänotypfrequenz
HPA-1*	Zw	1a Zw ^a Pl ^{A1}	98,1
		1b Zw ^b Pl ^{A2}	31,6
HPA-2	Ko	2a Ko ^b	>99,9
		2b Ko ^a Sib ^a	16,7
HPA-3	Bak (Lek)	3a Bak ^a Lek ^a	87,6
		3b Bak ^b	63,8
HPA-4*	Yuk (Pen)	4a Pen ^a Yuk ^b	>99,9
		4b Pen ^b Yuk ^a	0
HPA-5	Br (Zav) (Hc ^a)	5a Br ^b Zav ^b	98,9
		5b Br ^a Zav ^a Hc ^a	17,6

HPA-1 nur bei Weißen polymorph, HPA-4 nur bei Asiaten polymorph
 HPA = Humanes Plättchenantigen

Tabelle 4: Phänotypenfrequenzen und Nomenklatur thrombozytenspezifischer

1.7.2 Ätiologie

Die Ätiologie der Alloimmunthrombozytopenie scheint verglichen mit der Autoimmunthrombozytopenie vergleichsweise einfach. Alloantikörper entstehen bei Inokulation eines Fremd-Antigens in einem dieses Antigen als „fremd“ erkennenden Organismus. Dies ist bei Transfusion antigener Zelloberflächen z.B. Thrombozyten- oder Erythrozytenkonzentraten oder bei Inkompatibilität zwischen maternalen und fetalen Zellen der Fall. Als Beispiel einer feto-maternalen Inkompatibilität kann daher die fetale Alloimmunthrombozytopenie (FAITP) angesehen werden.

1.7.3 Pathogenese

Die Ursache der fetalen *Alloimmunthrombozytopenie* (FAITP) ist die Bildung von Alloantikörpern der Schwangeren gegen ein vom Vater vererbtes plättchenspezifisches Antigen auf den fetalen Thrombozyten. Somit stellt die FAITP eine Inkompatibilität zwischen Mutter und Fetus dar. Es handelt sich dabei um Alloantikörper des Typs IgG, welche die Placenta passieren, dann an die fetalen Thrombozyten binden und so zu deren beschleunigtem Abbau führen. Die Destruktion der Plättchen erfolgt durch Fc-Receptor vermittelte Phagozytose im retikuloendothelialen System. Eine intravasale Lyse durch Komplementaktivierung wird durch thrombozytäre Antikörper bei FAITP nicht hervorgerufen.

Der erste beschriebene thrombozytäre Antikörper, der eine FAITP ausgelöst haben soll, war gegen das Alloantigen Duzo gerichtet (Moulinier, 1958). Er reagierte mit den Thrombozyten von ca. 22% aller untersuchten Individuen. Da später jedoch kein Serum mehr für weitere Untersuchungen zur Verfügung stand, wurde diese Antikörperspezifität nie bestätigt und muß heute als nicht gesichert angesehen werden. Van Loghem et al. beschrieben 1959 anti-Zw^a (Pl^{A1}, HPA-1a), das Shulman et al. (1964) als Ursache für die FAITP nachwies. Die Bedeutung von Anti-Ko^a (HPA-2b) für die mögliche Verursachung einer FAITP (Grenet et al. 1965) war lange Zeit umstritten, da es sich bei den bisher beschriebenen Antikörpern fast stets um agglutinierende IgM Antikörper handelte. Inzwischen konnte aber ein Anti-Ko^a der IgG-Klasse bei der Mutter eines Kindes mit einer FAITP identifiziert werden (Bizzaro & Dianese, 1988). Ein weiterer wichtiger thrombozytärer Alloantikörper, Anti-Bak^a

(HPA-3a), wurde von dem Borne et al. (1980) im Serum der Mutter eines Kindes mit einer FAITP gefunden. Friedman & Aster (1985) identifizierten einen thrombozytären Alloantikörper, Anti-Pen^a (HPA-4a), der sich später als identisch mit dem von Shibata et al. (1986a) entdeckten Anti Yuk^b (HPA-4a) erwies. Shibata et al. (1986a,b) konnten zeigen, daß auch das Yuk (HPA-4)-Alloantigensystem zwei Allele (siehe Kapitel 1.4.1) umfaßt.

Auf eine Besonderheit bei der Immunisierung von Schwangeren gegen das HPA-1a-Antigen wiesen erstmalig Reznikoff-Etievant et al. (1981) hin: Der Prozentsatz HLA-B8-positiver immunisierter Mütter ist höher als der entsprechende Prozentsatz in einer Kontrollgruppe. Später stellte sich heraus, daß ein noch stärkerer Zusammenhang zwischen HLA-DR3 und Immunisierung besteht (Reznikoff-Etievant et al. 1983; Mueller-Eckhardt et al. 1985). De Waal et al. (1986) fanden darüber hinaus eine Assoziation mit dem supertypischen Merkmal DRw52, das in dem von ihnen untersuchten Material DR3 und DRw6 einschloß. Diese Befunde wurden von anderen jedoch nicht bestätigt (Mueller-Eckhardt et al. 1987; Reznikoff-Etievant, 1988). Die genannten Befunde sprechen dafür, daß der Haplotyp HLA-B8, DR3 ein immunologischer Marker für die Immunantwort auf das PI^{A1} (HPA-1a)-Antigen ist. Er charakterisiert diejenige Teilmenge aller PI^{A1} (HPA-1a)-negativen Schwangeren, bei denen ein erhöhtes Risiko der Immunisierung gegen PI^{A1} (HPA-1a) besteht.

Ein besonderes Problem bei der serologischen Untersuchung von fetalen Alloimmunthrombozytopenien besteht darin, daß Seren von Schwangeren in einem hohen Prozentsatz (ca. 25-30%) HLA-Antikörper enthalten. Sie erschweren oft den Nachweis plättchenspezifischer Antikörper. Es wurde immer wieder vermutet, daß auch HLA-Antikörper allein eine FAITP auslösen können, wenn sie eine besonders hohe Avidität besitzen. In einer größeren Studie untersuchten Sharon & Amar (1981) 1507 Seren auf das Vorhandensein von HLA-Antikörpern. Bei 33% aller Mütter konnten HLA-Antikörper nachgewiesen werden, jedoch wies keines der Neugeborenen eine Thrombozytopenie auf. Dennoch ist die Frage nach der pathogenetischen Bedeutung von HLA-Antikörpern immer noch umstritten (Shulman & Jordan, 1987). Man muß aber annehmen, daß in vielen Fällen, in denen HLA-Antikörper als Ursache für eine FAITP angeschuldigt wurden, plättchenspezifische Antikörper aus technischen Gründen dem Nachweis entgingen.

1.7.4 Diagnose

Die Diagnose einer fetalen Alloimmunthrombozytopenie kann gestellt werden, wenn folgende Kriterien präpartal erfüllt sind:

- Normales mütterliches Blutbild
- Nachweis maternalen thrombozytärer Antikörpern gegen fetale thrombozytären Antigene
- Nachweis einer fetalen Thrombozytopenie
- Nachweis der paternalen korrespondierenden thrombozytären Antigene
- Nachweis der fetalen korrespondierenden thrombozytären Antigene

1.7.5 Inzidenz

Die Häufigkeit einer HPA 1a-vermittelten FAIT beträgt 1 zu 350 bis 1 zu 1000 Schwangerschaften (Williamson et al., 1998)

1.7.6 Therapie

Das pränatale Management der fetalen Alloimmunthrombozytopenie setzt an zwei Punkten an: 1. maternale Immunsuppression, dadurch Reduktion der maternalen Antikörperbildung durch wöchentliche, intravenösen Gabe hochdosierter Gamma-Immunglobuline und/oder Kortekosteroide (Bussel et al., 1996) und 2. der Minderung des fetalen Blutungsrisikos durch regelmäßige intrauterine Thrombozytentransfusionen (IUTT, siehe auch Kapitel 2.2). Auch eine Kombination aus beiden Ansätzen kann gewählt werden. Allerdings konnte bisher nicht gezeigt werden, welches Therapieregime erste Wahl ist (Giers et al., 1996). Der schnellste und sicherste Erfolg bei Kindern mit Blutungszeichen oder sehr niedrigen Thrombozytenzahlen ist die Transfusion kompatibler, antigen-negativer Thrombozyten. Werden hierzu mütterliche Thrombozytenkonzentrate verwendet, muss das Antikörperhaltige Plasma ersetzt und das Blutprodukt zur Vermeidung einer GvH-Erkrankung mittels Gammabestrahlung behandelt werden(Salama, 2003).

1.8 Zielsetzung

Vor dem Hintergrund der bisher vorliegenden und in Kapitel 1.3 dargelegten Erkenntnisse zur Physiologie der humanen fetalen Erythropoese durch das Hormon Erythropoetin werden die Verläufe der Blutbildparameter als Regelgröße und die Veränderung der Stellgröße des oben gezeigten Regelkreises betrachtet. Da sich die Gewinnung fetaler Proben mittels Cordozentese bei normal verlaufender Schwangerschaft zum Studium der fetalen Erythropoese beim Menschen aus ethischen Gründen streng verbietet, wurden in dieser Untersuchung ausschließlich Proben von Feten untersucht, die aus diagnostischen oder therapeutischen Gründen wegen der Diagnose oder des Verdachtes einer fetalen Alloimmunthrombozytopenie ohnehin einer Cordozentese zugeführt werden mußten. Theoretisch und in der Literatur ergibt sich kein Anhalt für eine Beeinträchtigung der Erythropoese bei dieser Diagnose, so dass die betroffenen Feten besonders geeignet scheinen, die humane fetale Erythropoese zu untersuchen.

Nach diversen Untersuchungen fetaler Blutbilder in den achtziger und neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts und nur vereinzelt widersprüchlichen Berichten über die Regulation der fetalen Erythropoese und den Stellenwert des Erythropoetins soll diese Arbeit den Verlauf und die Veränderung des Erythropoetins zu unterschiedlichen Gestationsaltern und damit auch Reifungsgraden darstellen. Da die Grunderkrankung der Feten wie oben dargestellt sehr selten ist, ist das retrospektiv betrachtete Kollektiv sehr klein.

2. Patienten und Methoden

2.1 Patienten

Beobachtet wurden insgesamt acht Schwangerschaftsverläufe von Mehrfachgravida, bei denen in einer der vorangegangenen Schwangerschaften die Diagnose einer fetalen Alloimmunthrombozytopenie auf dem Boden einer mütterlichen Immunisierung gegen Thrombozytenmerkmal HPA-1a gestellt worden war.

Die Indikation zur Cordozentese bzw. zur wiederholten intrauterinen Thrombozytentransfusion (IUTT) galt als gegeben, wenn

- die fetale Thrombozytenzahl $< 50000/\mu\text{l}$ war oder
- eine intrakranielle Blutung des Fetus sonografisch gesichert wurde oder
- in vorangegangenen Schwangerschaften IUTT's notwendig waren.

2.2 Technik der intrauterinen Punktion/Transfusion

Die intrauterinen Eingriffe wurden in Kooperation mit der Universitätsfrauenklinik Köln, Abteilung für Pränatalmedizin und gynäkologische Sonographie, Leiter: Dr. med. R. Bald, in der Zeit von August 1998 bis Juni 1999 und Oktober 2003 bis November 2004 durchgeführt.

Die Punktionen erfolgten abweichend in einer von Daffos et al (1983, 1984 und 1985) beschriebenen Cordozentesetechnik. In Abweichung von Daffos wurden dünnere, d.h. 22-Gauge-Spinalnadeln (Durchmesser 0,7 mm) verwandt. Darüber hinaus wurde die technisch anspruchsvollere, paraplazentare Punktionstechnik der freien Nabelschnur gegenüber der von Daffos et al (1983) beschriebenen Technik des transplazentaren retrograden Zuganges durch die Nabelschnurinsertion bei Vorderwandplazenten bevorzugt, sofern dies aufgrund der anatomischen und klinischen Situation möglich war.(siehe Abb. 6)

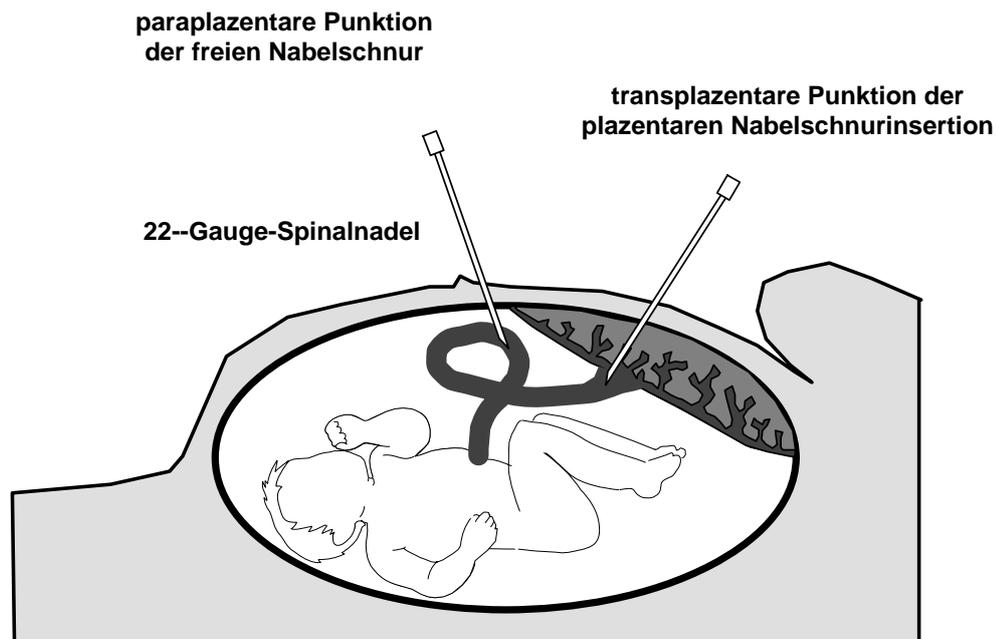


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Cordozentesetechnik: paraplazentare Punktion der freien Nabelschnur, tranplazentare Punktion der placentaren Nabelschnurinsertion (n. J. Hoch, Dissertation Universität Bonn, 1994)

Mit Beginn wurde eine erste Ultraschallgesteuerte (Toshiba Sonolayer SAL 90 oder Acuson 128, mit 3,5 MHz Schallkopf) Cordozentese unter sterilen Kautelen transkutan durchgeführt. Die Methode war dabei die gleiche, wie schon oben beschrieben.

2.3 Bestimmung des Fetalgewichtes

Die *Fetalgewichtsermittlung* erfolgte sonographisch durch Bestimmung des Biparietaldurchmessers (BIP) und des Abdomen-Transversaldurchmessers (ATD). Die Gewichtsschätzung erfolgte dann durch Ablesen der gemessenen Werte in einem nach Schwangerschaftsalter gegliederten Nomogramm nach Hansmann (Hansmann et al. 1985), (Tab. 5).

GEWICHTSSCHAETZUNG FUER DIE 30. WOCHENMITTE (WOCHENMITTE=30/4=207. TAG P.N.)

BIP+ THQ	66x	68x	70:	72:	74.	76.	78	80	82	84.	86.	88:	90:	92x	94x	BIP+ THQ
40x	211x	212x	222x	240x	267x	301x	343x	381x	446x	505x	570x	638x	711x	786x	863x	40x
42x	261x	262x	271x	290x	317x	351x	393x	441x	496x	555x	620x	688x	760x	836x	913x	42x
44x	312x	313x	323x	341x	368x	403x	444x	493x	547x	607x	671x	740x	812x	887x	965x	44x
46x	365x	366x	376x	394x	421x	456x	498x	546x	600x	660x	724x	793x	865x	940x	1018x	46x
48x	420x	421x	430x	449x	476x	510x	552x	600x	655x	714x	779x	847x	919x	995x	1072x	48x
50x	476x	477x	486x	505x	532x	566x	608x	656x	711x	770x	835x	903x	975x	1051x	1128x	50x
52:	533x	534x	544x	562x	589x	623x	665x	713x	768x	827x	892x	960x	1033x	1108x	1185x	52:
54:	591x	592x	602:	620:	647x	682x	724x	772x	826x	886x	950x	1019x	1091x	1166x	1244x	54:
56:	651x	652x	662:	680:	707:	741x	783x	831x	886x	945x	1010x	1078x	1151x	1226x	1303x	56:
58:	711x	713x	722:	741:	767:	802:	844x	892x	946x	1006x	1070x	1139x	1211x	1286x	1364x	58:
60:	773x	774x	784:	802:	829:	864:	905:	954:	1008x	1068x	1132x	1201x	1273x	1348x	1426x	60:
62:	836x	837x	846:	865:	892:	926:	968:	1016:	1071:	1130x	1195x	1263x	1335x	1411x	1488x	62:
64:	899x	900x	910:	928:	955:	990:	1031:	1080:	1134:	1194:	1258x	1327x	1399x	1474x	1552x	64:
66:	963x	964x	974:	992:	1019:	1054:	1095:	1144:	1198:	1258:	1322:	1391:	1463x	1538x	1616x	66:
68:	1028x	1029x	1039:	1057:	1084:	1119:	1160:	1209:	1263:	1322:	1387:	1455:	1528:	1603x	1681x	68:
70:	1093x	1095x	1104:	1123:	1149:	1184:	1226:	1274:	1328:	1388:	1452:	1521:	1593:	1668x	1746x	70:
72:	1159x	1160x	1170:	1188:	1215:	1250:	1292:	1340:	1394:	1454:	1518:	1587:	1659:	1734x	1812x	72:
74:	1225x	1227x	1236:	1255:	1282:	1316:	1356:	1406:	1460:	1520:	1584:	1653:	1725:	1801x	1878x	74:
76:	1292x	1293x	1303:	1321:	1348:	1383:	1424:	1473:	1527:	1587:	1651:	1720:	1792:	1867x	1945x	76:
78:	1359x	1360x	1370:	1388:	1415:	1450:	1491:	1540:	1594:	1654:	1718:	1787:	1859:	1934x	2012x	78:
80:	1426x	1427x	1437:	1455:	1482:	1517:	1559:	1607:	1661:	1721:	1785:	1854:	1926:	2001x	2079x	80:
82:	1493x	1495x	1504:	1523x	1550x	1584:	1626:	1674:	1728:	1788:	1852:	1921:	1993:	2068x	2146x	82:
84:	1561x	1562x	1571x	1590x	1617x	1651x	1693:	1741:	1796:	1855:	1920:	1988:	2060:	2136x	2213x	84:
86:	1629x	1629x	1639x	1657x	1684x	1718x	1760:	1809:	1863:	1922:	1987:	2055:	2128:	2203x	2281x	86:
88:	1695x	1696x	1705x	1724x	1751x	1786x	1827x	1876x	1930:	1989:	2054:	2122:	2195:	2270x	2348x	88:
90:	1762x	1763x	1773x	1791x	1818x	1852x	1894x	1943x	1997:	2056:	2121:	2189:	2262x	2337x	2415x	90:
92:	1828x	1830x	1839x	1858x	1884x	1919x	1961x	2009x	2063x	2123:	2187:	2256x	2328x	2403x	2481x	92:
94:	1895x	1896x	1905x	1924x	1951x	1985x	2027x	2075x	2128x	2189:	2254x	2322x	2394x	2470x	2547x	94:
96:	1960x	1962x	1971x	1990x	2016x	2051x	2093x	2141x	2195x	2255x	2319x	2388x	2460x	2535x	2613x	96:
98:	2025x	2027x	2036x	2055x	2082x	2116x	2158x	2206x	2260x	2320x	2384x	2453x	2525x	2601x	2678x	98:
100x	2090x	2091x	2101x	2119x	2146x	2181x	2223x	2271x	2325x	2385x	2449x	2518x	2590x	2665x	2743x	100x

ZEICHENERKLAERUNG .\:\x = MINDESTENS EIN ULTRASCHALLPARAMETER AUSSERHALB DER 1.\2.\3. STANDARDABWEICHUNG

ULTRASCHALLPARAMETER DER 30. WOCHEN

NORMBEREICHE PERZENTILE	-3STDx	-2STD:	-1STD.	AN 50.00x	1STD.	2STD:	3STDx
	0.13x	2.26x	15.87x		84.13x	97.72x	99.87x
BIPARIETALER DURCHMESSER=BIP (MPD)	60.0x	72.0:	76.0.	80.0	84.0.	88.0:	92.0x
THORAXQUERDURCHMESSER=THQ (MPD)	51.0x	50.0:	65.0.	72.0	79.0.	85.0:	93.0x
KOPF-THORAX-INDEX=BIP/THQ	0.9097x	0.9819:	1.0541.	1.1262	1.1884.	1.2706:	1.3428x
FETALES GEWICHT=GEW (GRAMM)	480x	770:	1060.	1350	1640.	1930:	2220x

Tabelle 5: Nomogramm nach Hansmann, hier z.B. für die 30. SSW

2.4 Bestimmung des Gestationsalters

Das Gestationsalter wurde ausgehend von der letzten Periode rechnerisch ermittelt und sonografisch bestätigt oder korrigiert.

2.5 Patientenproben

Vor Beginn der intrauterinen Thrombozytentransfusion wurde dem Feten eine Blutprobe von 1-2ml Blut entnommen. Diese war mit EDTA (1mg/ml Blut), einer gerinnungshemmenden Substanz versetzt und diente primär der Bestimmung des Blutbildes. So ist – das geringfügige fetale Blutvolumen berücksichtigend – nur überschüssiges Probenmaterial zu Untersuchungszwecken verwendet worden. Dementsprechend waren pro Fetus jeweils nur drei und nicht von jeder durchgeführten IUTT Plasmaproben zur Erythropoetinbestimmung verfügbar.

Das Blutbild wurde maschinell (AcT 8[®], Beckman Coulter, Fullerton, CA) bestimmt. Zum Nachweis des fetalen Ursprungs des gewonnenen Blutes erfolgte der Test nach Kleihauer-Betke. Der fetale Blutbildbefund umfasste die Parameter:

- Erythrozytenzahl ($\times 10^{12}/L$)
- Hämoglobin (g/dl)
- Hämatokrit (%)
- MCV (fl)
- Leukozyten ($\times 10^9/L$)
- Thrombozyten ($\times 10^9/L$)

Der Probenrest wurde zentrifugiert, das Plasma abgehebert, aliquotiert und bis zur Erythropoetinmessung bei -40°C ununterbrochen eingefroren gelagert.

2.6 Der Enzymimmunoassay

Der quantitative Nachweis des Erythropoetins erfolgte durch Einsatz eines kommerziell vertriebenen ELISA-Testkits (Quantikine® IVD®; R&D Systems, Minneapolis). Das Testprinzip basiert auf der Doppel-Antikörper-Sandwich-Methode. Dabei bindet das zu bestimmende Erythropoetin im ersten Reaktionsschritt an einen in der Mikrotiterplatte immobilisierten monoklonalen EPO-spezifischen Mausantikörper. In einem weiteren Schritt bindet der zweite Antikörper, ein polyklonaler EPO-spezifischer aus Kaninchen gebunden an Merrettichoxidase am zuvor immobilisierten Erythropoetin. (Abbildung 7)

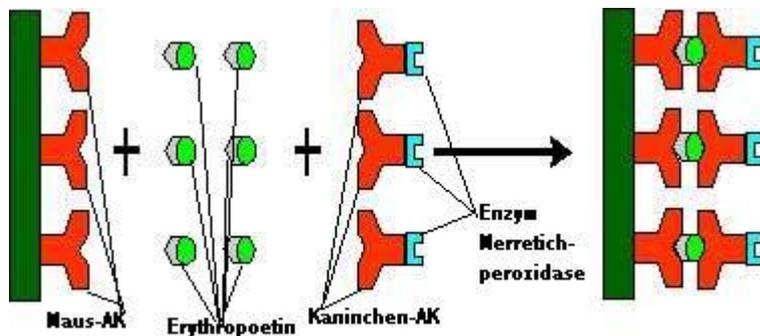


Abbildung 7: Reaktionsschritte eins und zwei des Sandwich- ELISA

Danach erfolgt die Zugabe zweier Chromogene (0,4g/l TMB und 0,02% gepuffertes Wasserstoffperoxid). Diese Chromogene werden durch die Antikörper-konjugierte Merrettichperoxidase unter Bildung eines blauen Farbkomplexes oxidiert. Diese Reaktion durch Zugabe von Säure (2 N Schwefelsäure) gestoppt und es erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. (Abb. 8)

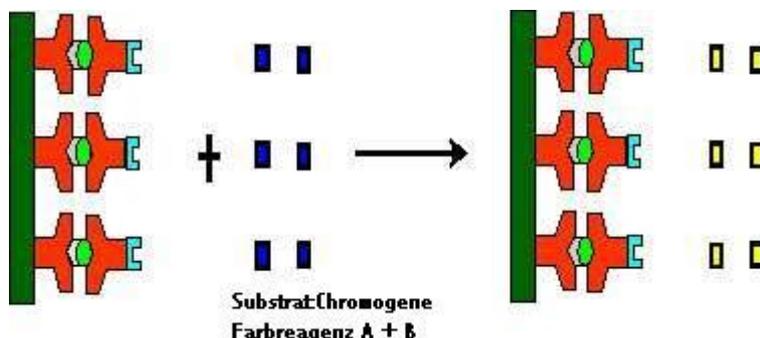


Abbildung 8: Reaktionsschritte drei und vier des Sandwich- ELISA

Die Intensität der Absorbenz des Farbkomplexes ist photometrisch bei 450nm (Korrekturwellenlänge 570nm), dem Lambert-Beer'schen Gesetz folgend, direkt proportional zur Menge an Erythropoetin in der Probe.

Mittels im Testkit enthaltener Erythropoetinstandardslösungen unterschiedlicher Konzentrationen von 0,0 mIU/ml; 2,5 mIU/ml; 5,0 mIU/ml; 20 mIU/ml; 50 mIU/ml; 100 mIU/ml und 200 mIU/ml wird die Standardkurve erstellt. Bei den verwendeten Standardlösungen handelt es sich um rekombinantes humanes Erythropoetin, die gegen die „Second International Reference Preparation of Erythropoetin, human, urinary for Bioassay“(Annable et al.,1972) kalibriert sind. Nun können die Erythropoetinkonzentrationen der Proben durch Vergleich Ihrer optischen Dichte mit denen der Standardkurve ermittelt werden.

2.7 Protokoll des ELISA-Tests

Es wurde ein vollständiges Testkit Quantikine[®] IVD[®] der Firma R&D Systems,Minneapolis verwendet. Die Arbeitsanleitung gibt zwei Protokolle vor, erstens ein „Benchtop-Protokoll“ oder zweitens ein „Schüttler-Protokoll“. Diese unterscheiden sich lediglich in den vorgeschriebenen Inkubationszeiten und durch Verwendung eines horizontalen Rotationsmischers im Rahmen des Schüttler-Protokolls verkürzen sich die Inkubationszeiten auf die Hälfte. Es wurde das Benchtop-Protokoll durchgeführt.

Zunächst wurden alle Reagenzien und die Proben auf Raumtemperatur(22°C) erwärmt. Die Messung der fetalen Blutproben konnten wegen des sehr geringen Probenvolumens von 100-120µl nur in einer Einfachbestimmung durchgeführt werden. Die Standardlösungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Dementsprechend wurde ein Pipetierprotokoll angelegt.

Es erfolgte der Ansatz der Waschpufferlösung, wobei 40 ml des Waschpufferkonzentrates in 960 ml Aqua destillata verdünnt wurden.

Zunächst wurde in jede Kavität 100µ EPO Assay-Verdünnungspuffer pipettiert.

Anschließend wurden je 100µl Standardlösung oder 100 µl Patientenplasma in das Well pipettiert, nun reagierte das in der jeweiligen Probe enthaltene Erythropoetin mit dem am Boden der Kavität immobilisierten EPO-spezifischen, monoklonalen Mausantikörper.

Dieser Ansatz inkubierte bei Raumtemperatur für zwei Stunden.

Anschließend wurde der Inhalt der Wells mit einer Pipette (200µl Eppendorfpipette) abgesaugt und die Restflüssigkeit ausgeklopft, wobei die ursprüngliche Pipettierreihenfolge beibehalten wurde, um Einflüsse unterschiedlicher Inkubationszeiten auszuschließen.

Danach wurde in jede Vertiefung 200µl EPO-Konjugat, bestehend aus polyklonalem Kaninchenantikörper spezifisch gegen humanes Erythropoetin, gebunden an Merrettichperoxidase pipettiert und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurde der Inhalt der Vertiefung abgesaugt und jede Vertiefung mit 400µl Waschpuffer gewaschen. Insgesamt wurde vier Waschvorgänge wie beschrieben durchgeführt. Hierfür wurde die Einzelfunktion des ELISA-Automaten BEP III (Dade Behring Marburg, Marburg) verwendet.

Nun erfolgte der Ansatz der Substratlösung, bestehend aus 6ml des Farbreagenz A (0,4g/l Tetramethylbenzidin) und 6 ml des Farbreagenz B (0,02% gepuffertes Wasserstoffperoxid). Diese Farbreagenz ist nur für 15 Minuten stabil und muss innerhalb dieser Zeit verwendet werden.

Dementsprechend wurde unmittelbar nach Ansetzen der Substratlösung 200µl derselben in jedes Well pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationsphase war in den Wells eine unterschiedlich ausgeprägte Blaufärbung zu beobachten.

Nach 20 Minuten Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 100µl Stopplösung (2N Schwefelsäure) in jede Well. Sofort war der Farbumschlag von blau nach gelb zu beobachten.(Abb. 9)



Abbildung 9: Mikrotiterplatte am Ende der Messung

Unmittelbar nach dem letzten Pipettierschritt wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450nm und einer Korrekturwellenlänge von 650nm mit dem BEP III bestimmt. Das Gerät generiert nach Abschluss der Extinktionsmessung einen Plattenreport, mit Angabe der gemessenen Extinktionen.(Abb 10)

Dade Behring Marburg GmbH
Postfach 11 49
D-35001 Marburg

09.12.2004 14:42:04 Uhr

Plattenreport: Rohwerte

Platten-ID:	0006	Riegel:	1 - 6
BES Version:	V3.1.2	Validierung:	-
Analyzer:	420324	Einheit:	-
Testname:	Photometrieren	Valid.bereich	
Cut Off:	-		
Cut Off Formel:	-		
Wiederh.bereich:	-		
Niveau Korrektur	-		
Wellenlängen M/R:	450 nm / 650 nm		
Testkit Nr.:	-		
Platte definiert am:	09.12.2004 14:12 Uhr		

!	Napfauffälligkeit	*	Ergebnis negativ
#	Keine Berechnung möglich	.	Ergebnis positiv
∞	Ergebnis zweifelhaft	?	Ergebnis in Wiederh.Ber.

Pos	ProbenID	Wert	Flag	Pos	ProbenID	Wert	Flag	Pos	ProbenID	Wert	Flag
A1	---	0.043		A2	---	0.039		A3	---	0.156	
B1	---	0.078		B2	---	0.076		B3	---	0.163	
C1	---	0.107		C2	---	0.101		C3	---	0.136	
D1	---	0.326		D2	---	0.326		D3	---	0.251	
E1	---	0.688		E2	---	0.777		E3	---	1.527	
F1	---	1.313		F2	---	0.712		F3	---	0.423	
G1	---	2.027		G2	---	2.210		G3	---	0.302	
H1	---	0.108		H2	---	0.098		H3	---	0.053	
A4	---	0.175		A5	---	0.118		A6	---	0.084	
B4	---	0.165		B5	---	0.071		B6	---	0.167	
C4	---	0.134		C5	---	0.185		C6	---	0.083	
D4	---	0.332		D5	---	0.076		D6	---	0.022	
E4	---	2.076		E5	---	0.120		E6	---	0.019	
F4	---	0.458		F5	---	0.124		F6	---	0.007	
G4	---	0.086		G5	---	0.161		G6	---	0.005	
H4	---	0.099		H5	---	0.079		H6	---	0.003	

Plate Flags:
Einzelfunktionsplatte

Abbildung 10: Plattenreport

2.8 Datenverarbeitung und statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden zunächst mit dem Computerprogramm Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, USA) erfasst. Die statistischen Berechnungen, Analysen und Tests wurden mit dem Computerprogramm Statistical Package for Analysis and Social Science für Windows, Version 12.0 (Lead Technologies, Inc., Chicago, ILL, USA) durchgeführt. Beide Programme dienen auch der Erstellung von Grafiken und Tabellen. Im Rahmen der Datenauswertung wurden ermittelt, berechnet und durchgeführt:

2.8.1 Deskriptive Statistik

Es werden in einer einzelnen Tabelle univariate Auswertungsstatistiken für verschiedene Variablen angezeigt und standardisierte Werte errechnet. Die Werte lauten: n = Fallzahl, Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum. Die Variablen werden in der Reihenfolge, in der sie ausgewählt wurden, angeordnet.

2.8.2 Korrelationen

Mit Korrelationen werden die Beziehungen zwischen Variablen oder deren Rängen gemessen. Bivariate Korrelationen errechnen den Korrelationskoeffizienten nach Spearman-Rho mit dem jeweiligen Signifikanzniveau.

2.8.3 partielle Korrelationen

Partielle Korrelationskoeffizienten beschreiben die Beziehungen zwischen zwei Variablen, wobei die Effekte von einer oder mehr Variablen überprüft werden. Korrelationen sind Maße für lineare Zusammenhänge. Zwei Variablen können fehlerlos miteinander verbunden sein.

2.8.4 Statistische Testverfahren

Der Mann-Whitney-U-Test ist der am häufigsten verwendete Test bei zwei unabhängigen Stichproben. Er ist äquivalent zum Wilcoxon Rangsummentest und dem Kruskal-Wallis-Test für zwei Gruppen. Mit dem Mann-Whitney-U-Test wird überprüft, ob zwei beprobte Grundgesamtheiten die gleiche Lage besitzen. Die Beobachtungen aus beiden Gruppen werden kombiniert und in eine gemeinsame Reihenfolge gebracht, wobei im Falle von Rangbindung der durchschnittliche Rang vergeben wird. Die Anzahl der Bindungen sollte im Verhältnis zur Gesamtzahl der Beobachtungen klein sein. Wenn Grundgesamtheiten in der Lage identisch sind, sollten die Ränge zufällig zwischen den beiden Gruppen gemischt werden. Es wird berechnet, wie oft ein Wert aus Gruppe 2 einem Wert aus Gruppe 1 vorangeht. Die Mann-Whitney-U-Statistik ist die kleinere dieser beiden Zahlen. Die gleichfalls angezeigte Wilcoxon-Rangsummen-W-Statistik ist die Rangsumme der kleineren Stichprobe.

2.8.5 Erläuterung

Ein signifikanter Unterschied wurde für eine Irrtumswahrscheinlichkeit mit $p < 0,05$ festgelegt. Bei einer Signifikanzschranke von $p < 0,05$ wurde dieser Wert zu Informationszwecken in der Diskussion in Klammern eingefügt. In einigen der folgenden Diagramme und Tabellen wurde „p“ für das Signifikanzniveau und „r“ für den Korrelationskoeffizienten verwendet.

3. Ergebnisse

In dieser Untersuchung wurden acht Einlingsschwangerschaften zu drei unterschiedlichen Gestationsaltern (22-34 SSW) des zweiten und dritten Schwangerschaftstrimenons retrospektiv betrachtet. Bei allen acht Müttern war anamnestisch das Vorliegen eines irregulären, antithrombozytären Antikörpers der Spezifität Anti-HPA-1a aus vorangegangenen Schwangerschaften bekannt. Dementsprechend war die Indikation zur Cordozentese und in Abhängigkeit des fetalen Blutbildes zur intrauterinen Thrombozytentransfusion gegeben.

Im untersuchten Kollektiv trat bei Fetus 1 im Verlauf der 6.IUTT eine fetale Bradykardie auf, so dass diese Schwangerschaft unter dem Eindruck einer Blutung in der 27. SSW aus fetaler Indikation mit einer Notsectio beendet werden musste. Die übrigen sieben Schwangerschaften in deren Verlauf in meist wöchentlichem Intervall intrauterine Thrombozytentransfusionen und eine IUTT unmittelbar vor der geplanten primären Sectio caesarea durchgeführt wurden, konnten längstens bis zum 258. Schwangerschaftstag (246-258 SST) aufrecht erhalten werden. Insgesamt verliefen diese Schwangerschaften unauffällig, insbesondere Blutungskomplikationen traten nicht auf. Die postpartal erhobenen APGAR-Indices zeigten mit Werten >7 nach 10 Minuten keinen Anhalt für Depressionszustände oder Entwicklungsverzögerungen. Von Fetus 7 waren keine Geburtsbezogenen Daten zu ermitteln.

3.1 Auswertung des Enzym-Immunoassay

Zur Bestimmung der fetalen Erythropoetinkonzentrationen wurde eine linear ansteigende Funktion (Abb. 11) aus den Extinktionen (Tab. 6) der bekannten Standardkonzentrationen 0,0 mIU/ml; 2,5 mIU/ml; 5,0 mIU/ml; 20 mIU/ml; 50 mIU/ml; 100 mIU/ml und 200 mIU/ml ermittelt. Die gefundenen Extinktionen (optical density) stellen die x-Werte der linearen Funktion dar, anhand derer man den y-Wert der fetalen Proben durch Multiplikation mit dem Regressionskoeffizienten berechnet.

EPO Konzentration	1.Extinktion	2.Extinktion	Mittelwert=(Extinktion1 + Extinktion2)/2	Extinktion=Mittelwert Extinktion - Mittelwert Extinktion(Standard 0,0)
Standard 0,0	0,043	0,039	0,041	0
Standard 2,5	0,078	0,076	0,077	0,036
Standard 5,0	0,107	0,101	0,104	0,063
Standard 20,0	0,326	0,326	0,326	0,285
Standard 50,0	0,688	0,777	0,7325	0,6915
Standard 100,0	1,313		1,313	1,272
Standard 200,0	2,027	2,21	2,1185	2,0775

Tabelle 6: Extinktionsmesswerte der Standardkurve

3.2 EPO Standardkurve

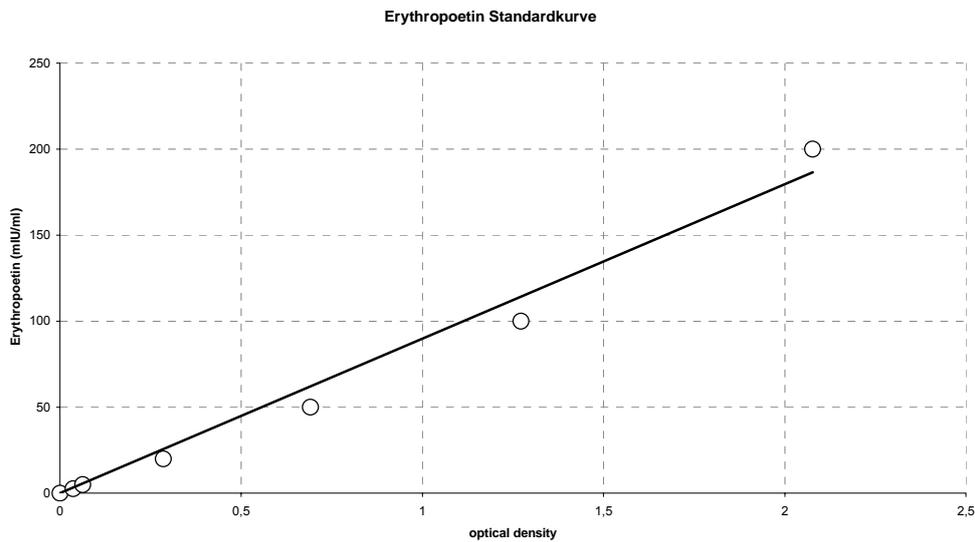


Abbildung 11: Standardkurve

Die Funktion der Standardkurve, der Korrelationskoeffizient und das Bestimmtheitsmaß lautet:

$$y = 89,769x; \text{ Korrelationskoeffizient} = 0,99285268; r^2 = 0,9828$$

3.3 Verläufe der erhobenen Parameter

Alle Werte sind Tabelle 21 des Anhangs zu entnehmen. Zunächst werden die erhobenen Daten grafisch dargestellt und mit Normwerten der Literatur verglichen. Dabei wird das sonografisch ermittelte fetale Gewicht mit dem erreichten Geburtsgewicht von 41718 Geburten zwischen der 26. bis 42. SSW verglichen (Wilcox et al., 1993). (Abbildung 12)

Die hämatologischen Parameter Erythrozyten (Abb. 13), Hämoglobin (Hb) (Abb. 14), Hämatokrit (Hkt) (Abb. 15) und mittleres korpuskuläres Volumen (MCV) (Abb. 16) werden mit den Werten von 2860 Blutproben aus der 18. SSW bis zum Ende der Schwangerschaft (Forestier et al., 1991, vgl. auch Tabelle 2,) verglichen. Dabei wurde der Mittelwert ± 2 Standardabweichungen als Normbereich angenommen.

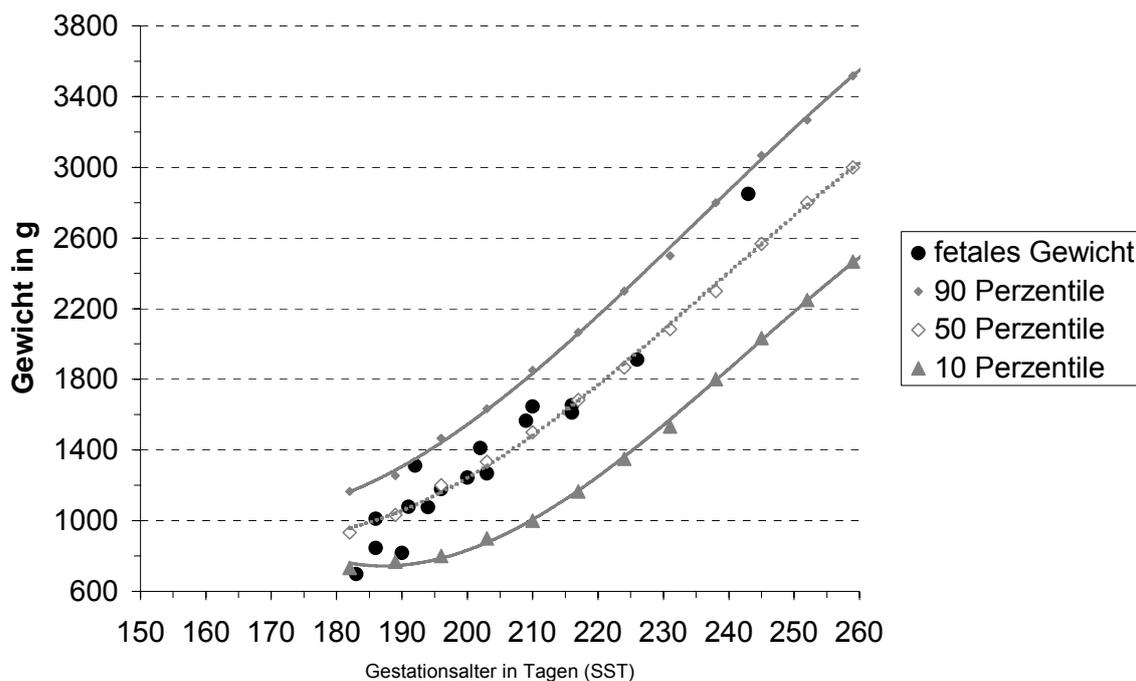


Abbildung 12: sonografisch ermitteltes, fetales Gewicht im Vergleich zur Literatur (Wilcox et al, 1993)

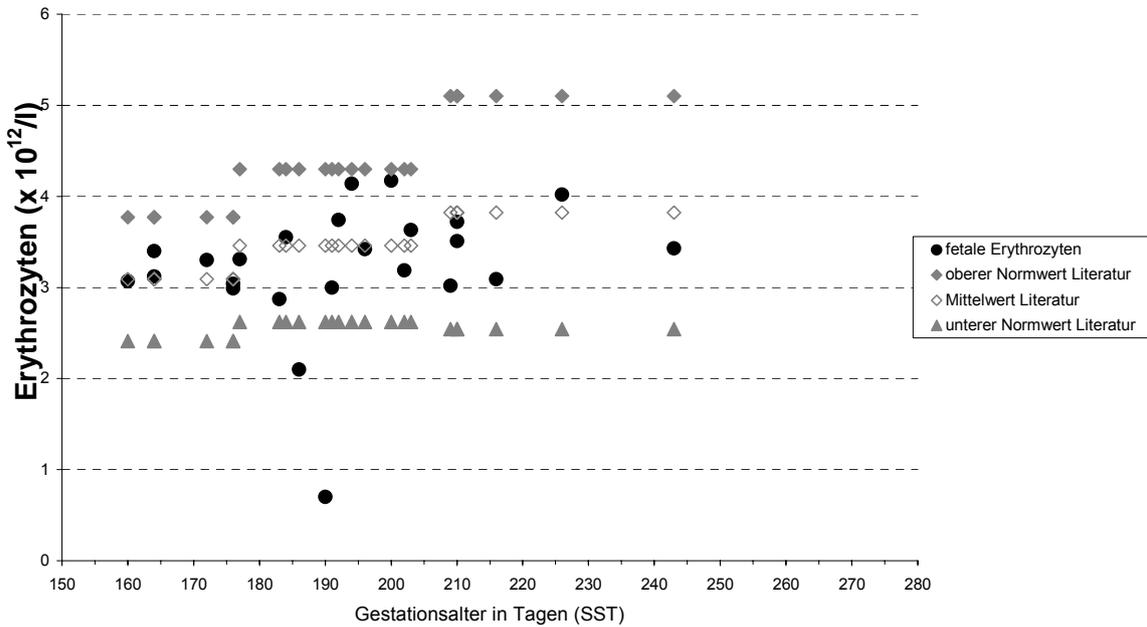


Abbildung 13; fetale Erythrozytenwerte im Vergleich zur Literatur (Forestier et al,1991)

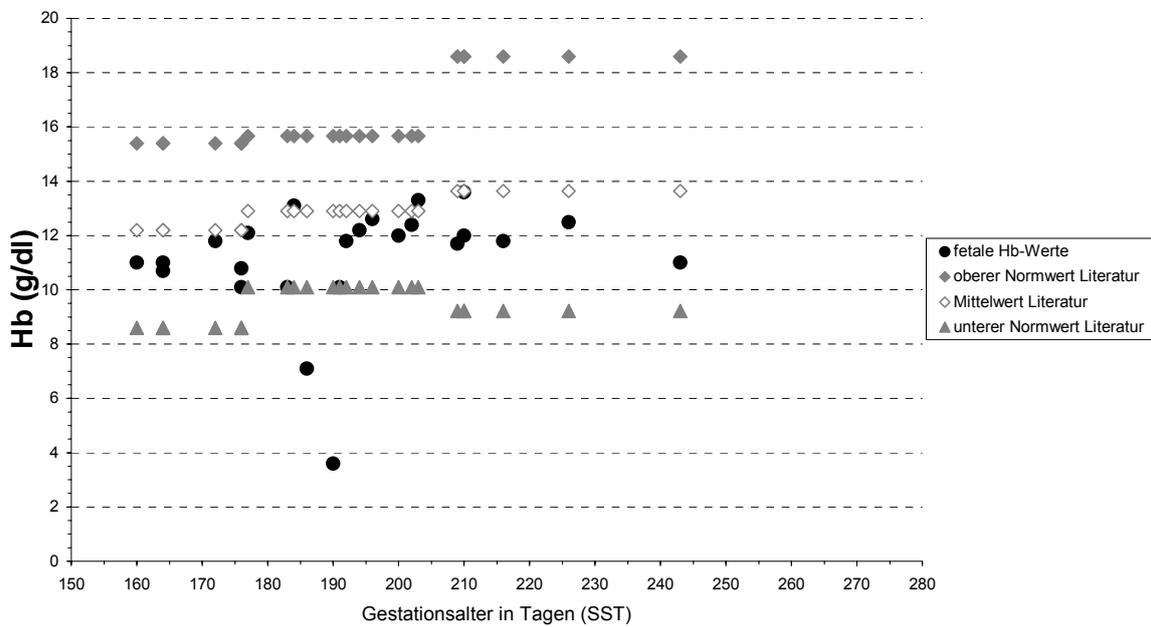


Abbildung 14: fetale Hb-Werte im Vergleich zur Literatur (Forestier et al, 1991)

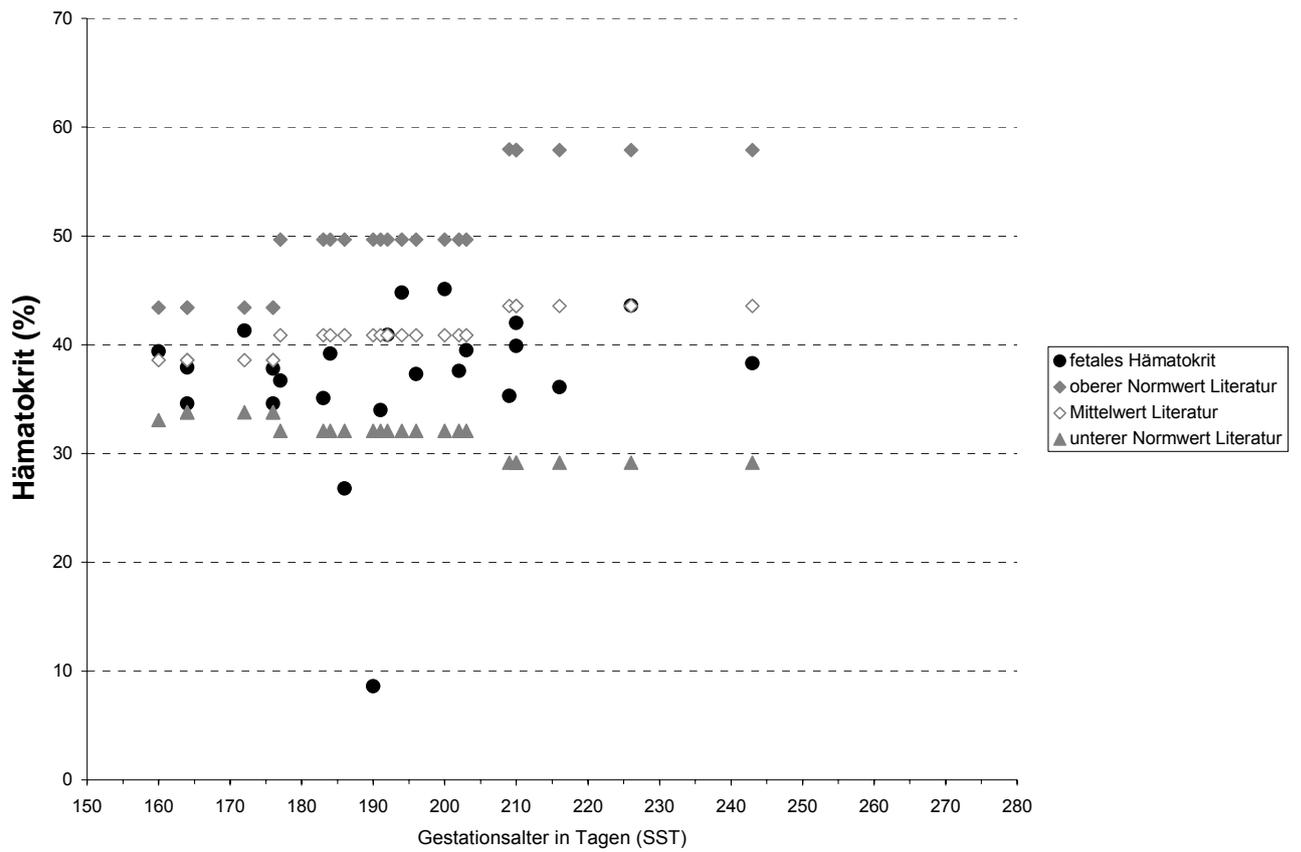


Abbildung15: fetale Hkt-Werte im Vergleich zur Literatur (Forestier et al,1991)

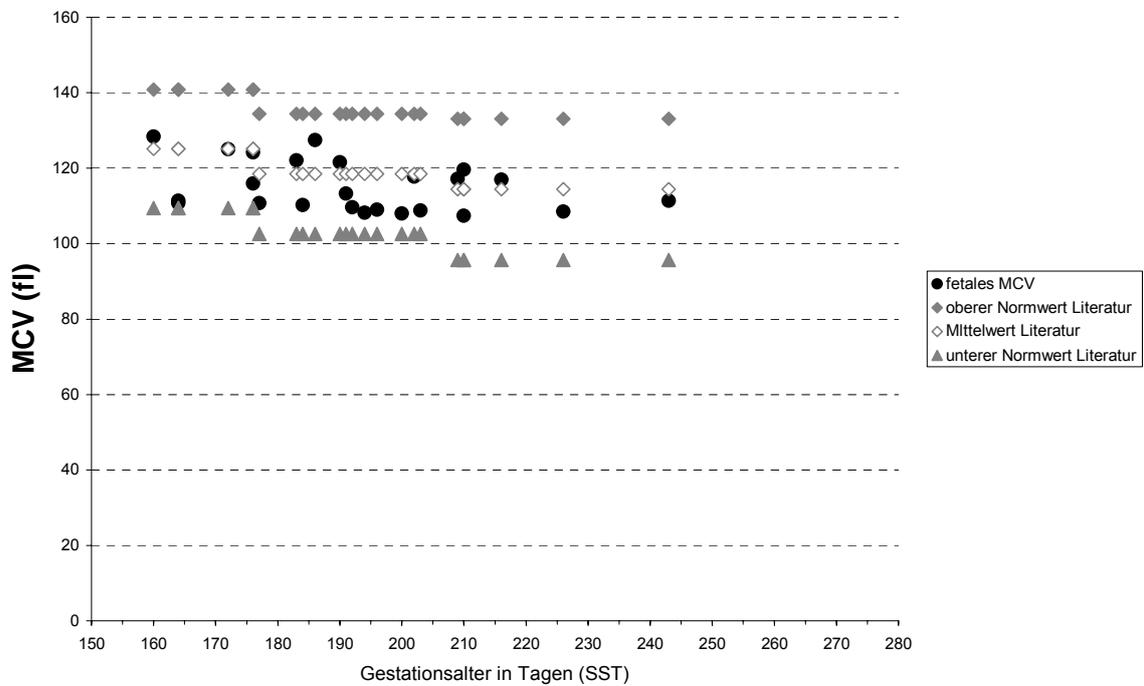


Abbildung 16: fetales MCV im Vergleich zur Literatur (Forestier et al, 1991)

3.4 Verläufe der erhobenen Parameter der Feten

Neben der zusammenfassenden Darstellung der erhobenen Parameter im vorangegangenen Kapitel werden in den Abbildungen 17 bis 24 die Verläufe der erhobenen Parameter des jeweiligen Fetus in einer Abbildung zusammengefasst dargestellt. Darin sind die hämatologischen Messwerte Erythrozyten ($\times 10^{12}/l$), Hämoglobin (g/dl), Hämatokrit (%), MCV (fl), das sonografisch ermittelte Gewicht (g) und die Serumerythropoetinkonzentration (mIU/ml) gegen das Gestationsalter der jeweiligen fetalen Blutentnahme aufgetragen. Die entsprechenden Zahlenwerte sind den Tabellen 21 und 22 im Anhang aufgeführt.

3.4.1 Fetus 1

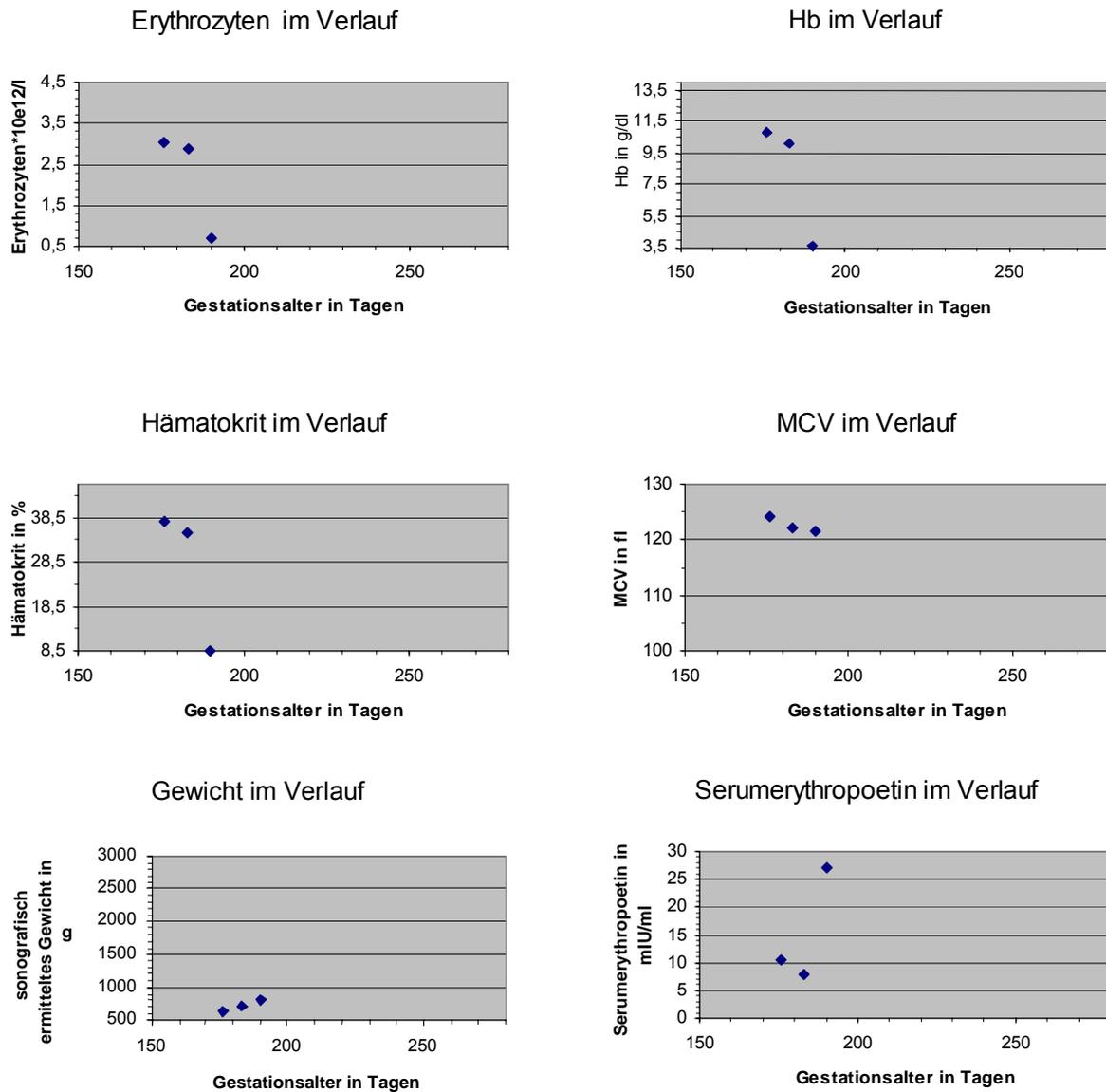


Abbildung 17: gemessene Parameter von Fetus 1 im Verlauf

Aufgrund des klinischen Verlaufes dieser Gravidität mit stattgehabter Blutungskomplikation ergeben sich Ausreisserwerte, so dass diese Werte bei den statistischen Berechnungen und Auswertungen nicht berücksichtigt werden.

3.4.2 Fetus 2

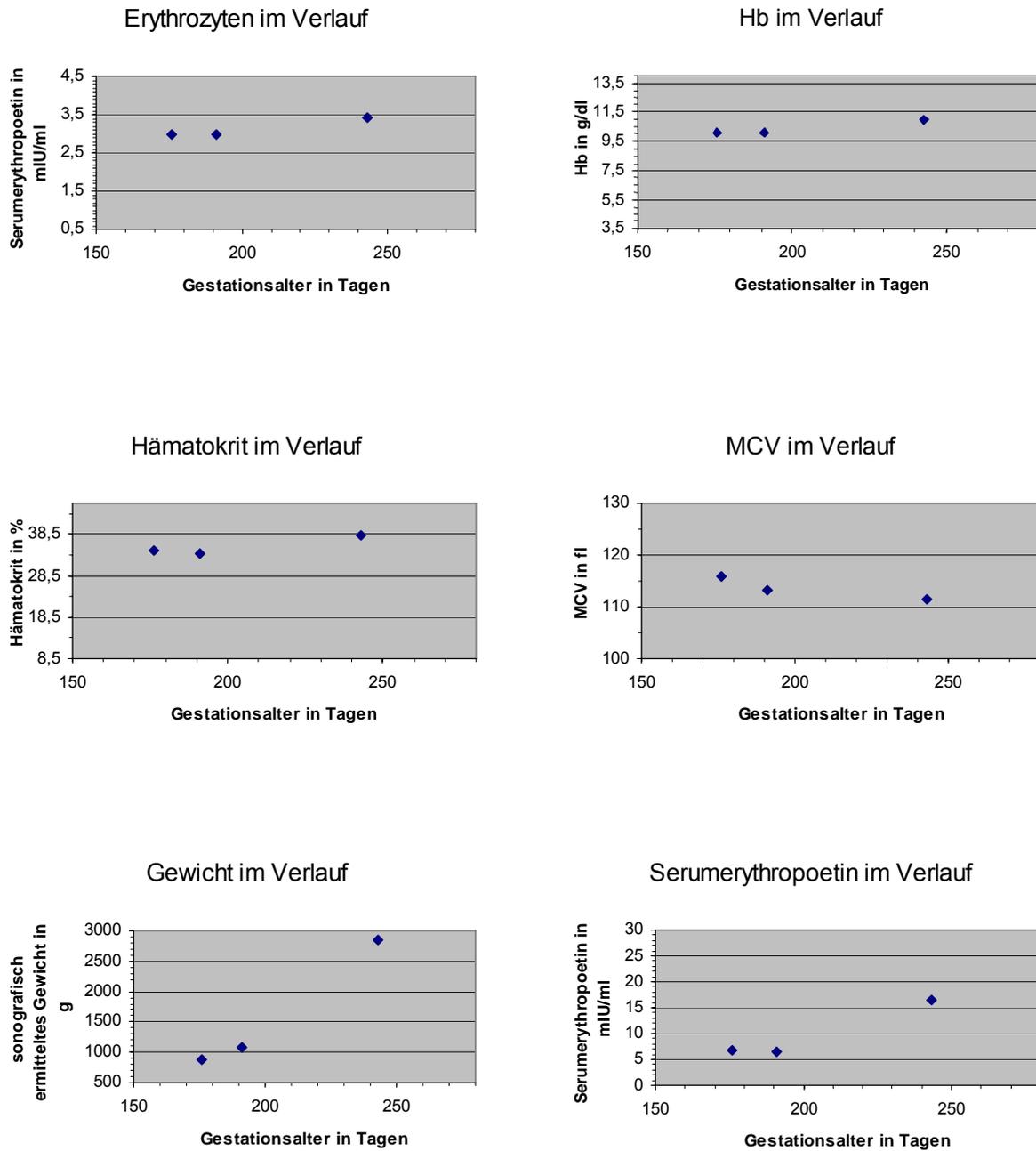


Abbildung 18: gemessene Parameter von Fetus 2 im Verlauf

3.4.3 Fetus 3

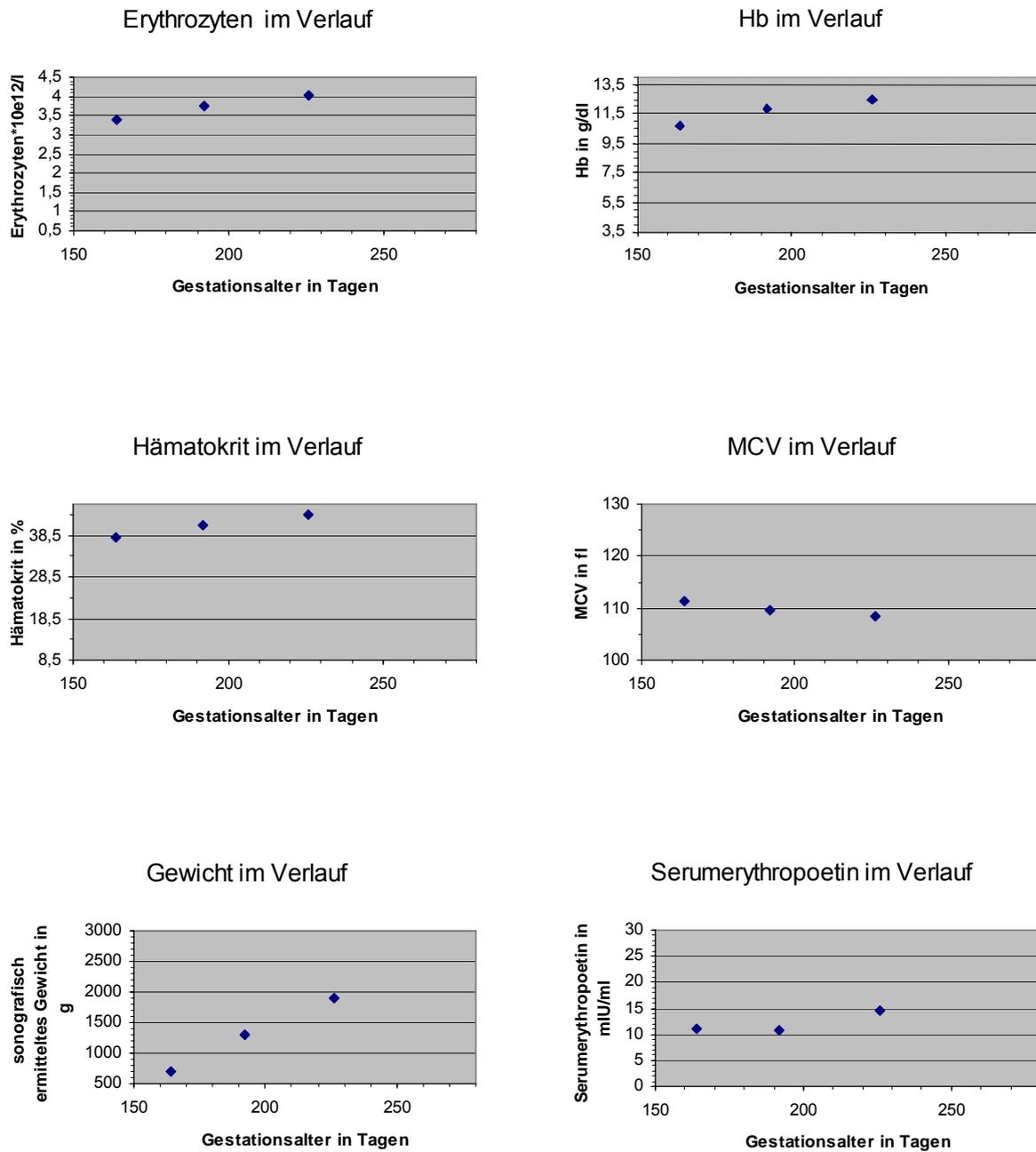


Abbildung 19: . gemessene Parameter von Fetus 3 im Verlauf

3.4.4 Fetus 4

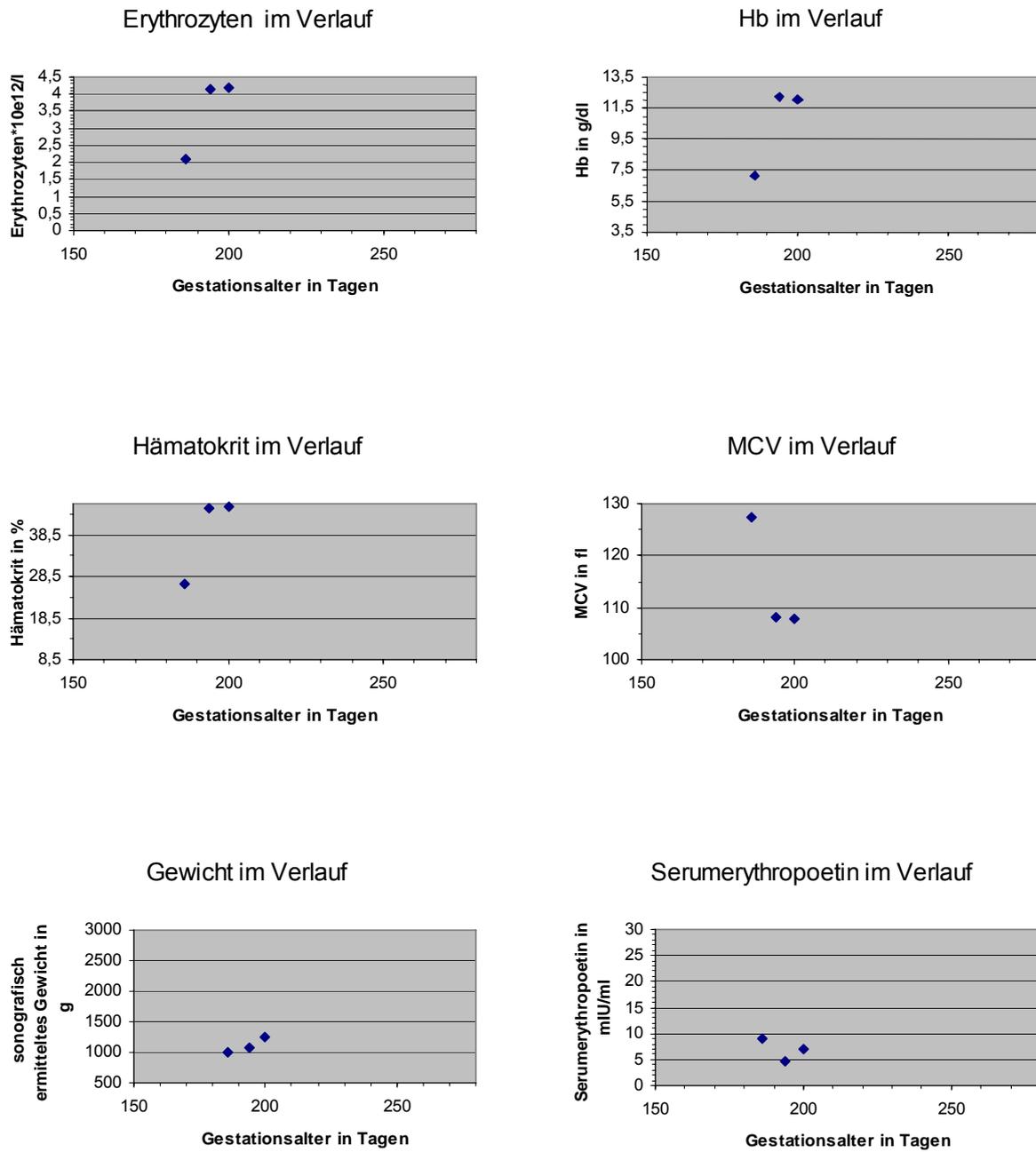


Abbildung 20: gemessene Parameter von Fetus 4 im Verlauf

3.4.5 Fetus 5

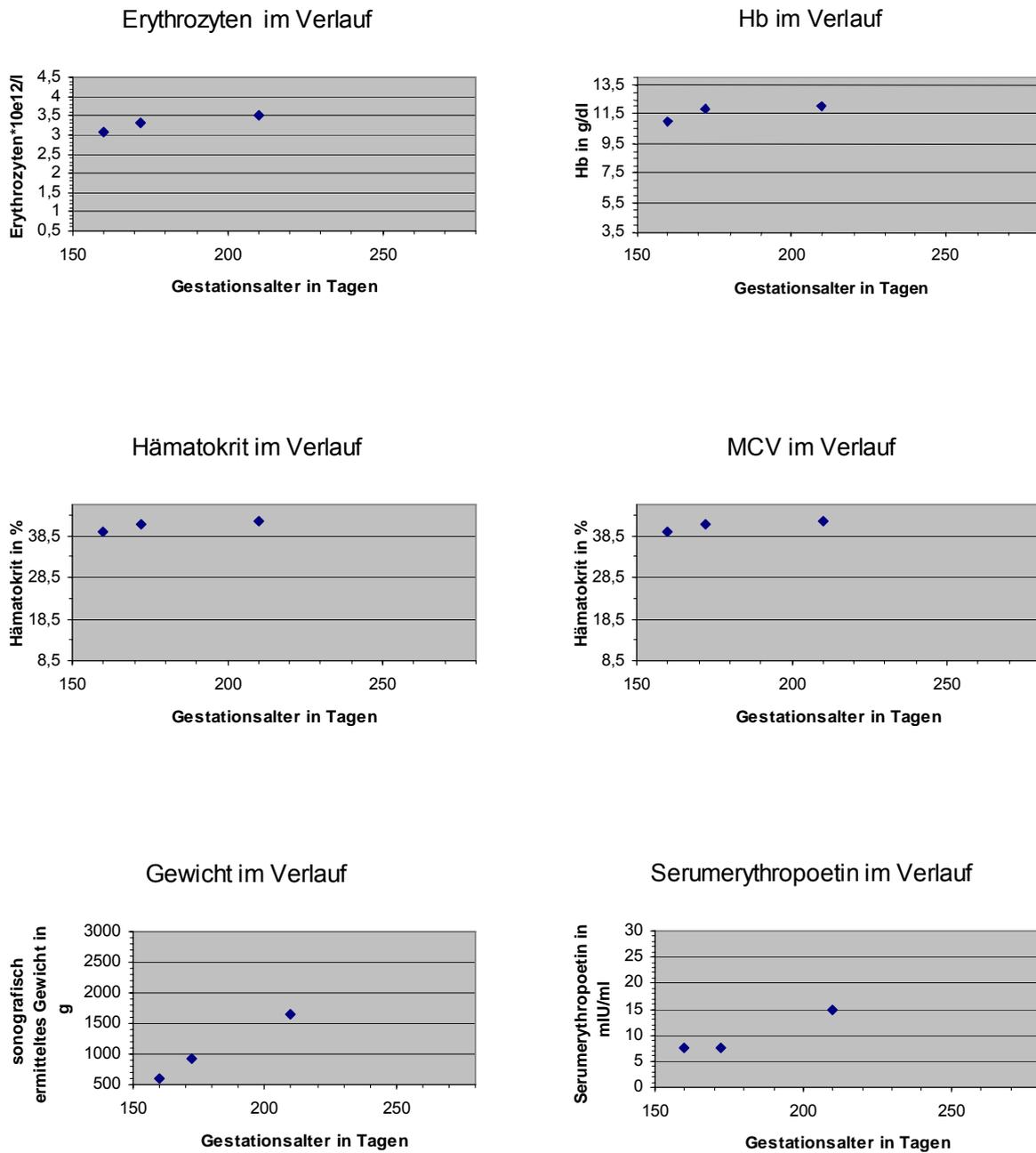


Abbildung 21: gemessene Parameter von Fetus 5 im Verlauf

3.4.6 Fetus 6

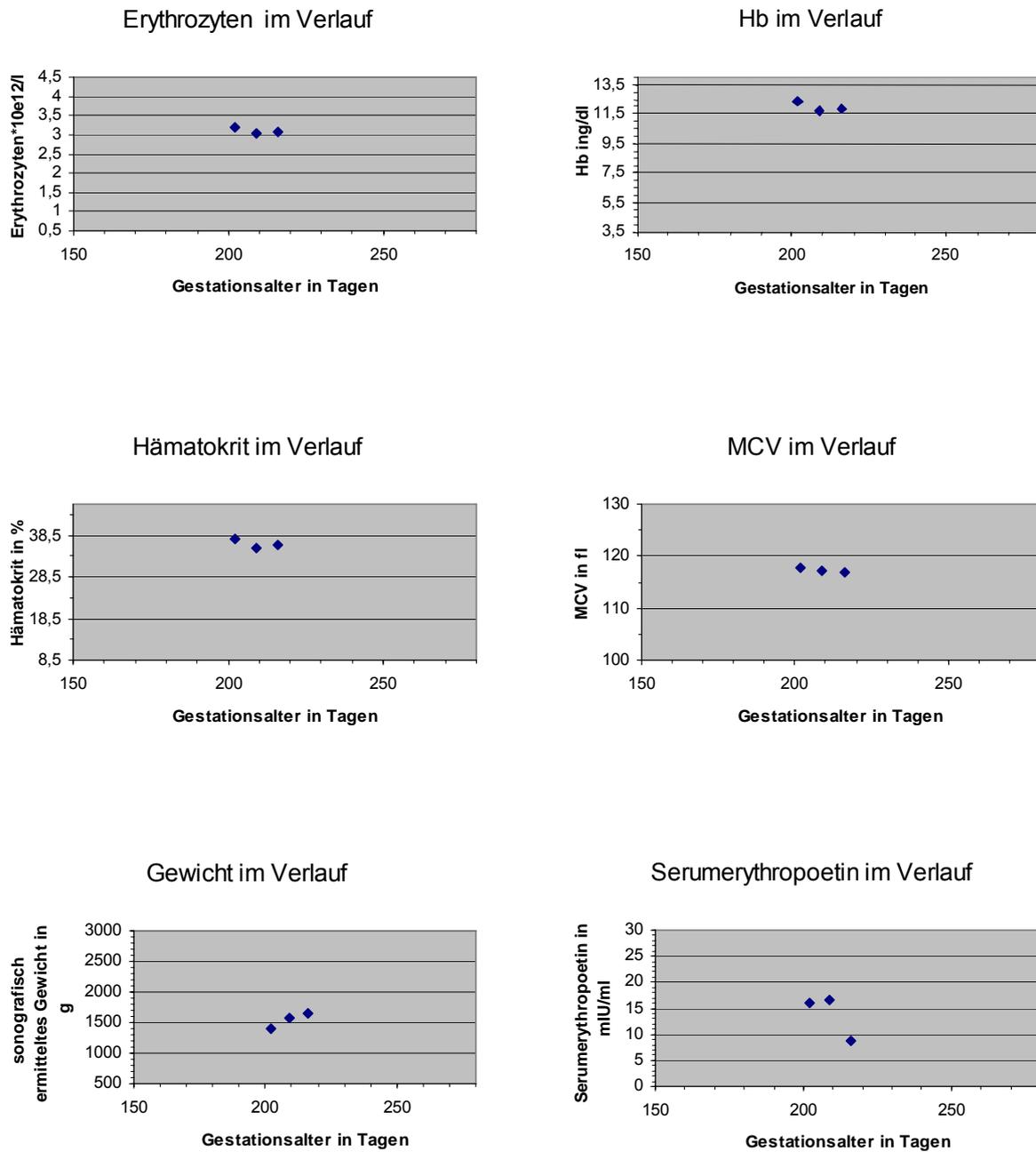


Abbildung 22: gemessene Parameter von Fetus 6 im Verlauf

3.4.7 Fetus 7

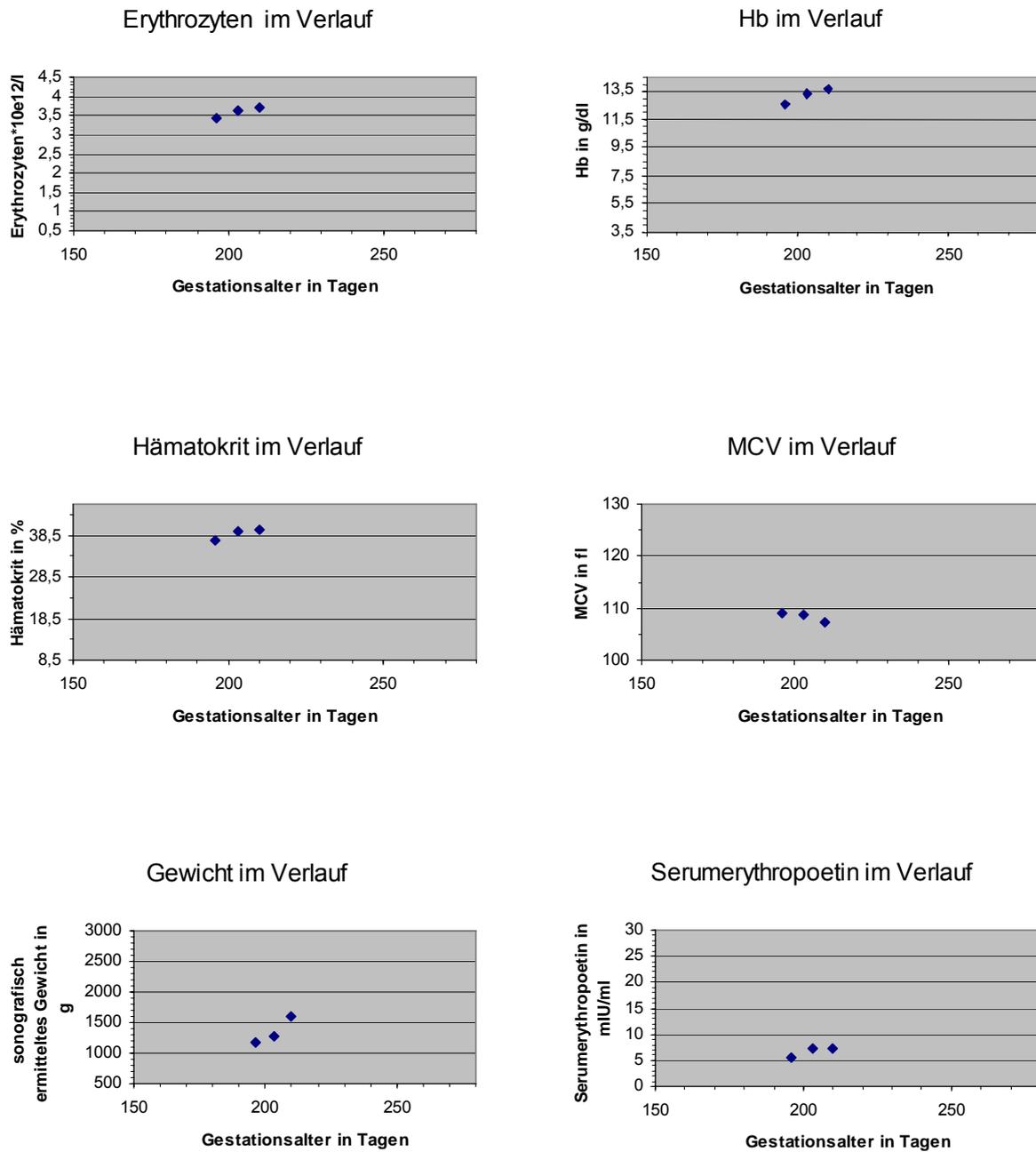


Abbildung 23: gemessene Parameter von Fetus 7 im Verlauf

3.4.8 Fetus 8

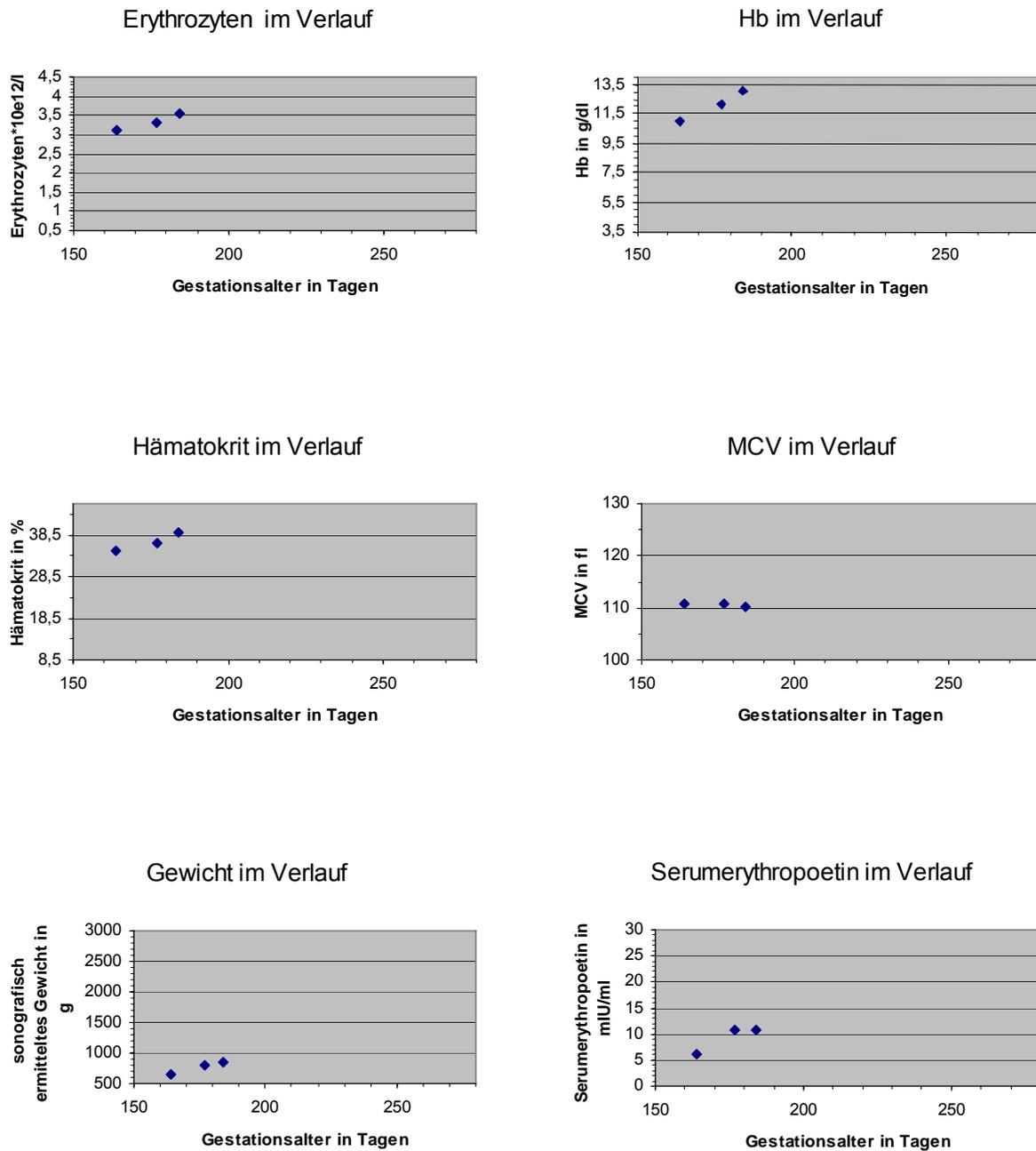


Abbildung 24: gemessene Parameter von Fetus 8 im Verlauf

3.5 Statistische Berechnungen und Ergebnisse

Nach Berechnung aller nichtparametrischen Korrelationen nach Spearman-Rho (Tab. 7) werden die Beziehungen Erythropoetin-Schwangerschaftstag, Schwangerschaftstag-Gewicht und Erythropoetin-Gewicht genauer betrachtet.

Korrelationen

			Ery	Hb	HKT	MCV	SST	Epo	Gewicht
Spearman-Rho	Ery	Korrelationskoeffizient Sig. (1-seitig) N	1,00 0 23	,796(**) ,000 23	,824(**) ,000 23	-,758(**) ,000 23	,195 ,186 23	-,160 ,233 23	,203 ,176 23
	Hb	Korrelationskoeffizient Sig. (1-seitig) N	,796(**) ,000 23	1,000 23	,652(**) ,000 23	-,608(**) ,001 23	,349 ,051 23	-,150 ,247 23	,308 ,077 23
	HKT	Korrelationskoeffizient Sig. (1-seitig) N	,824(**) ,000 23	,652(**) ,000 23	1,000 23	-,341 ,056 23	,121 ,291 23	-,074 ,369 23	,152 ,244 23
	MCV	Korrelationskoeffizient Sig. (1-seitig) N	-,758(**) ,000 23	-,608(**) ,001 23	-,341 ,056 23	1,000 24	-,326 ,060 24	,367(*) ,043 23	-,286 ,087 24
	Tag	Korrelationskoeffizient Sig. (1-seitig) N	,195 ,186 23	,349 ,051 23	,121 ,291 23	-,326 ,060 24	1,000 24	,318 ,070 23	,943(**) ,000 24
	Epo	Korrelationskoeffizient Sig. (1-seitig) N	-,160 ,233 23	-,150 ,247 23	-,074 ,369 23	,367(*) ,043 23	,318 ,070 23	1,000 23	,344 ,054 23
	Gewicht	Korrelationskoeffizient Sig. (1-seitig) N	,203 ,176 23	,308 ,077 23	,152 ,244 23	-,286 ,087 24	,943(**) ,000 24	,344 ,054 23	1,000 24
** Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (einseitig).									
* Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (einseitig).									

Tabelle 7: Korrelationen der erhobenen Parameter

3.5.1 Erythropoetin-Schwangerschaftstag

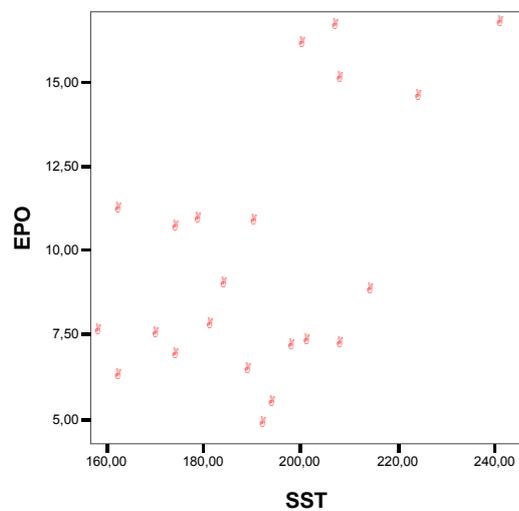


Abbildung 25: Streudiagramm der Erythropoetinkonzentration zu unterschiedlichen G.A

Abbildung 25 zeigt die Erythropoetinkonzentrationen aufgetragen gegen das Gestationsalter. Es wird das Schwangerschaftsalter in zweites und drittes Trimenon gruppiert, die Trennlinie ist der 187. Schwangerschaftstag. Die Gruppengrößen sind in Tab. 8 dargestellt, die Tabellen 9 und 10 zeigen die charakteristischen Merkmale hinsichtlich der Serumerythropoetinkonzentration.

Häufigkeiten		
	Trimenon	N
EPO	≤187	10
	> 188	13
	Gesamt	23

Tabelle 8: Häufigkeitsverteilung der Altergruppen

Trimenon 2 (≤187 SST)

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
sEpo 2.Trimenon	10	6,18	11,13	8,7940	1,88804
Gültige Werte (Listenweise)	10				

Tabelle 9: Deskriptive Statistik der Gruppe bis 187 SST

Trimenon 3 (>187 SST)

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
sEPO 3. Trimenon Gültige Werte (Listenweise)	13 13	4,76	16,61	10,4692	4,59355

Tabelle 10: Deskriptive Statistik der Gruppe über 187 SST

Mann-Whitney-U-Test für Gestationsalterssortierte Gruppen

Rangsummen, mittlere Ränge dieses statistischen Tests finden sich in Tabelle 11, die statistischen Ergebnisse sind in Tab. 12 dargestellt.

	2 und 3 Trimenon	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
sEPO	≤ 187	10	11,60	116,00
	> 187	13	12,31	160,00
	Gesamt	23		

Tabelle 11: Ränge der Altersgruppen

	sEPO
Mann-Whitney-U	61,000
Wilcoxon-W	116,000
Z	-,248
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,804
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,832(a)

a Nicht für Bindungen korrigiert.
b Gruppenvariable: 2. und 3. Trimenon

Tabelle 12: Statistische Ergebnisse des Altersgruppenvergleiches

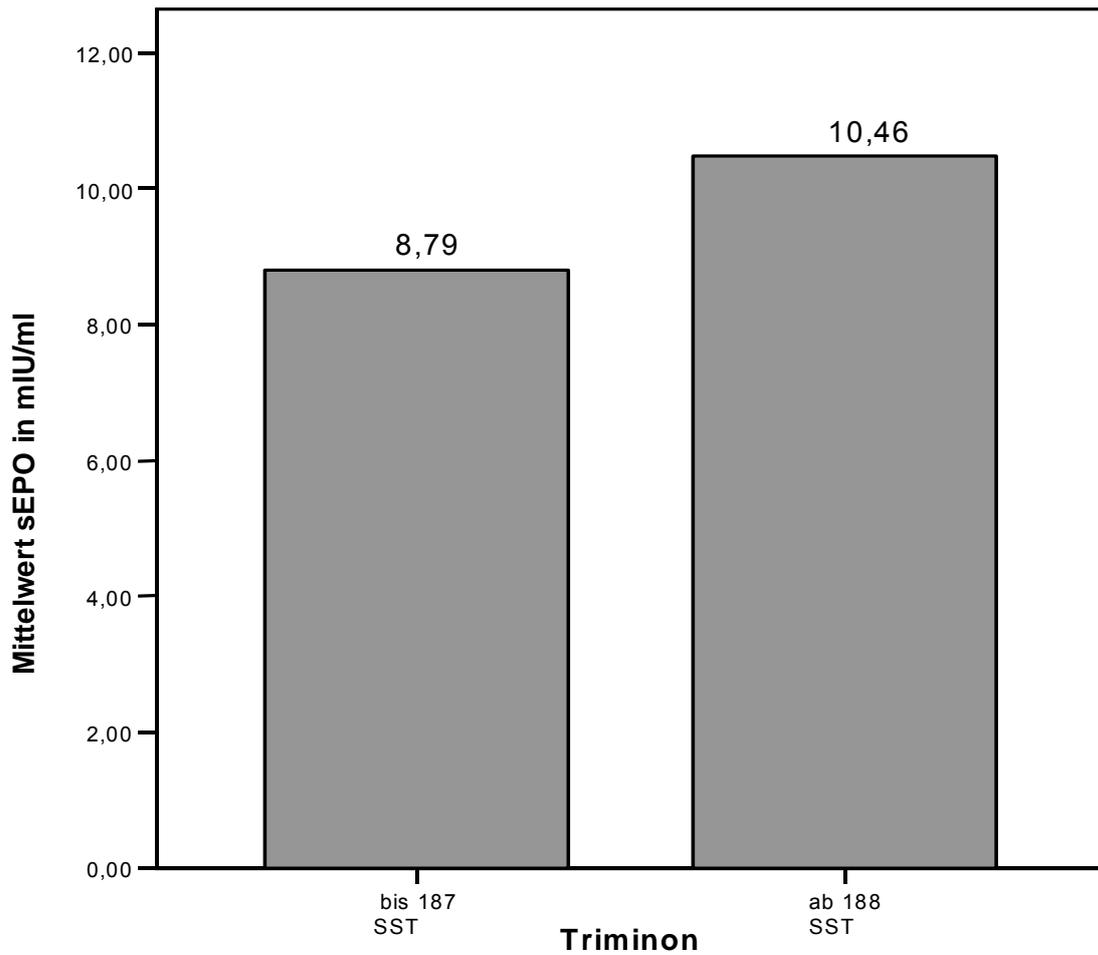


Abbildung 26: Blockdiagramm der Altersklassen Trimenon 2 und Trimenon 3

Es findet sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Altersklassen Trimenon 2 (≤ 187 SST) und Trimenon 3 (>187 SST), $8,79 \pm 1,89$ mIU/ml, $n=10$ vs. $10,47 \pm 4,59$ mIU/ml, $n=13$, $p=0,83$. (MW \pm SD)(vergl.Tab.12, Abb. 26)

3.5.2 Schwangerschaftstag-Gewicht

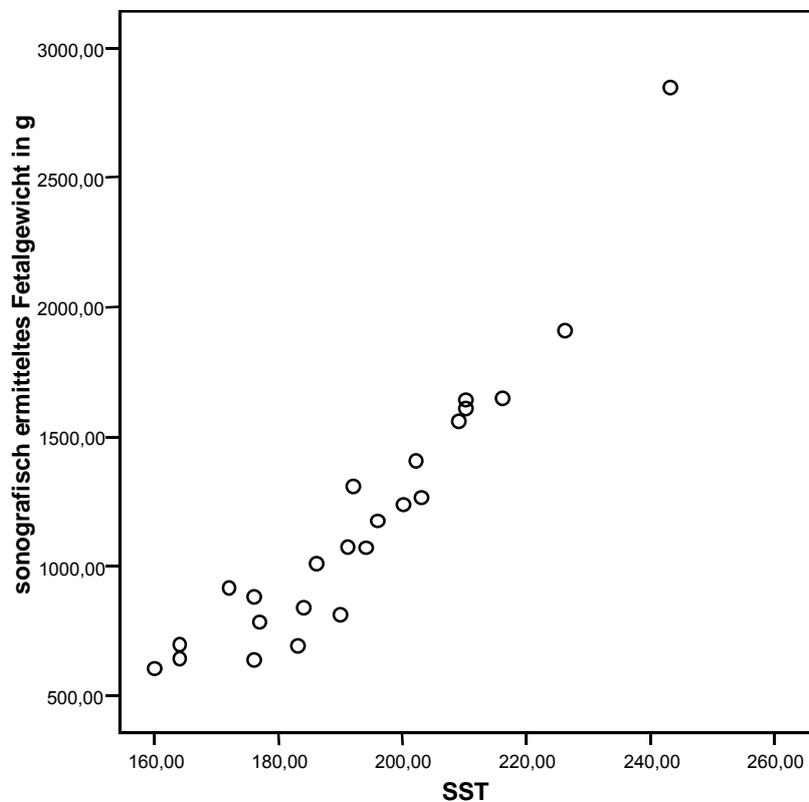


Abbildung 27: Streudiagramm des Fetalgewichtes zu unterschiedlichem G.A.(SST)

			Gewicht	Tag
Spearman-Rho	Fetalgewicht	Korrelationskoeffizient	1,000	,943(**)
		Sig. (2-seitig)	.	,000
		N	24	24
	G.A. (SST)	Korrelationskoeffizient	,943(**)	1,000
		Sig. (2-seitig)	,000	.
		N	24	24

** Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

Tabelle 13: Korrelation von Gestationsalter und Fetalgewicht

Dass das Schwangerschaftssalter mit dem fetalen Gewicht hochsignifikant korreliert, wird nur vollständigshalber in Abbildung 27 und Tabelle 13 gezeigt.

3.5.3 Erythropoetin-Gewicht

			G.A. SST	Gewicht
Spearman-Rho	sEPO	Korrelationskoeffizient	,318	,344
		Sig. (1-seitig)	,070	,054
		N	23	23

Tabelle 14: Korrelation von Serumerythropoetin, Gestationsalter und Fetalgewicht

Es ergeben sich keine signifikante Korrelation zwischen Erythropoetin-Gestationsalter und Erythropoetin-Gewicht.(Tab. 14)

Mit einer Signifikanz von 0,054 ist allerdings eine deutliche Tendenz zum Signifikanzniveau von 0,05 zu erkennen, Da Gewicht und Schwangerschaftstag hochsignifikant miteinander korrelieren, wird die Beziehung EPO-Gewicht mittels partieller Korrelation auf Störfaktoren überprüft, dabei wird der Einfluß des Gestationsalters (SST) kontrolliert.

Kontrollvariablen			sEPO	Gewicht
SST	sEPO	Korrelation	1,000	,346
		Signifikanz (einseitig)	.	,057
		Freiheitsgrade	0	20
	Fetalgewicht	Korrelation	,346	1,000
		Signifikanz (einseitig)	,057	.
		Freiheitsgrade	20	0

Tabelle 15: partielle Korrelation von Serumerythropoetin und Fetalgewicht

Die bereits schon oben erwähnte Tendenz zum Signifikanzniveau von 0,05 der Beziehung EPO-Gewicht wird mit $p=0,057$ (Tab. 15) bestätigt. Es ist davon auszugehen, dass die kleine Stichprobe ($n=23$) nur eine Tendenz aufzeigen kann, wohingegen eine größere Stichprobe eine signifikante Korrelation zeigen würde. Im Folgenden wird diese Beziehung zunächst grafisch dargestellt.

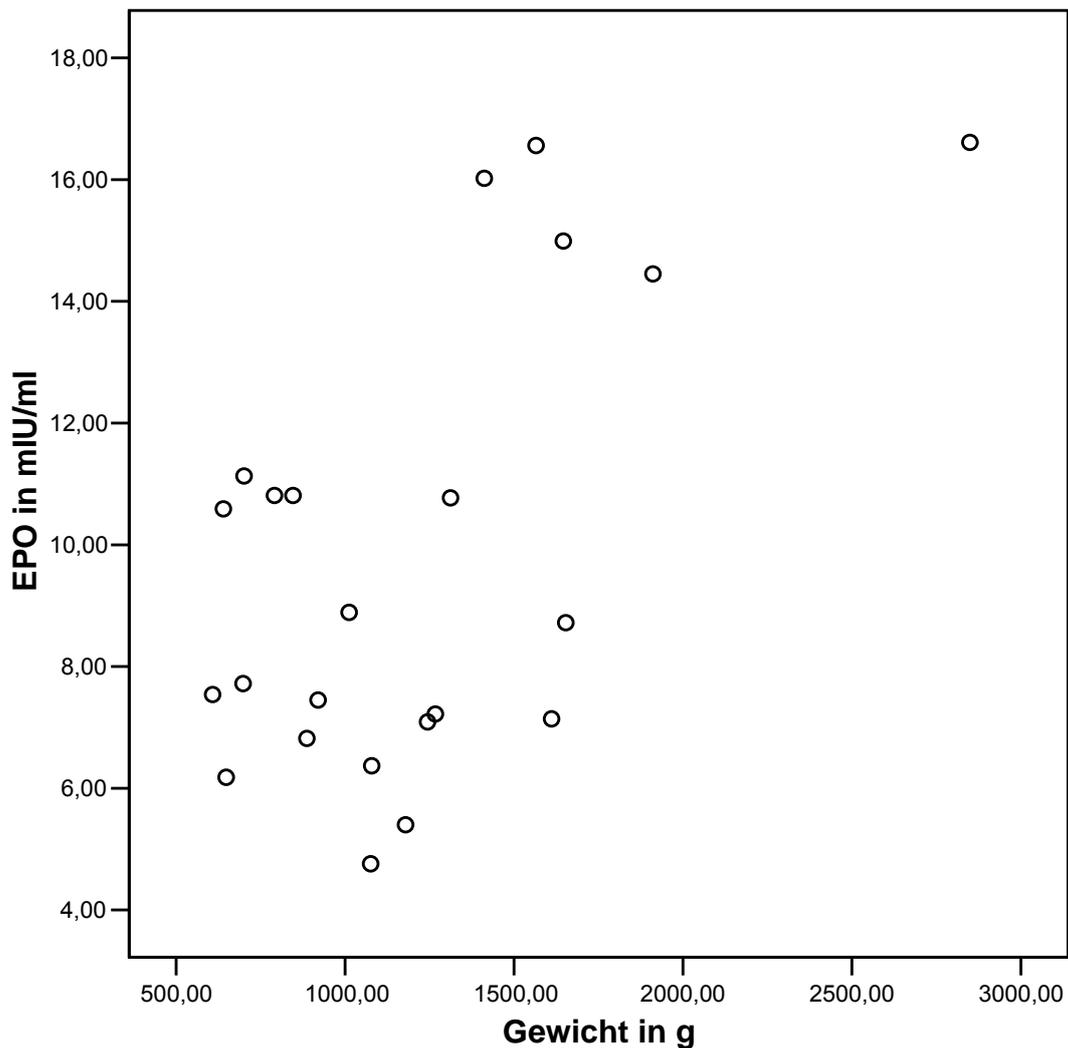


Abbildung 28: Streudiagramm der Erythropoetinkonzentration bei unterschiedlichen Fetalgewichten.

Das Streudiagramm (Abb. 28) der Beziehung EPO-Gewicht läßt deutlich eine Trennung von zwei Gruppen erkennen. Es zeigt sich, dass Erythropoetinspiegel > 12,0 mIU ab einem fetalen Gewicht von ca. 1400 Gramm aufzutreten scheinen. Hieraus folgend wurde die untersuchter Stichprobe in zwei Gewichtsklassen aufgeteilt und verglichen. Die Gruppengrößen sind in Tab. 16 dargestellt, die Tabellen 17 und 18 zeigen die charakteristischen Merkmale hinsichtlich der Serumerythropoetinkonzentration.

Rangsummen, mittlere Ränge dieses statistischen Tests finden sich in Tabelle 19, die statistischen Ergebnisse sind in Tab. 20 dargestellt.

Mann-Whitney-U-Test für Gewichtsklassen

	Gewichtsklasse	N
EPO	≤ 1400 g	16
	>1400 g	7
	Gesamt	23

Tabelle 16: Häufigkeitsverteilung der Gewichtsklassen

Gruppe 1 mit einem sonografisch ermittelten Gewicht ≤ 1400 g

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
EPO	16	4,76	11,13	8,0969	2,1176
Gültige Werte (Listenweise)	16				

Tabelle17: Deskriptive Statistik der Gewichtsklasse bis 1400 g

Die Tabelle 17 dieser Gruppe zeigt, dass bei 68% der Erythropoetinwerte zwischen 5,98 und 10,21 mIU/ml liegen.

Gruppe 2 mit einem sonografisch ermittelten Gewicht >1400 g

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
EPO	7	7,14	16,61	13,4986	3,9117
Gültige Werte (Listenweise)	7				

Tabelle 18: Deskriptive Statistik der Gewichtsklasse über 1400 g

Die Tabelle 18 dieser Gruppe zeigt, dass bei 68% der Erythropoetinwerte zwischen 9,59 und 17,41 mIU/ml liegen.

Statistischer Gruppenvergleich mittels Mann-Whitney-Test

	Gewichtsklasse	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
EPO	≤ 1400 g	16	9,50	152,00
	> 1400 g	7	17,71	124,00
	Gesamt	23		

Tabelle 19: Ränge des Gewichtsklassenvergleiches

	EPO
Mann-Whitney-U	16,000
Wilcoxon-W	152,000
Z	-2,673
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,008
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,006(a)

a Nicht für Bindungen korrigiert.
b Gruppenvariable: Gewichtsklasse

Tabelle 20: Statistische Ergebnisse des Gewichtsklassenvergleiches

Der Tabelle 20. ist ein sehr signifikantes Ergebnis für den gewichtsbezogene Gruppenvergleich zu entnehmen.

Die statistische Auswertung der betrachteten Beziehungen zeigt, dass bei einem kritischen fetalen Gewicht von 1400 Gramm die Serumerythropoetinkonzentration signifikant ansteigt.

≤ 1400 g, $8,097 \pm 2,118$ mIU/ml, $n=16$ vs. >1400 g, $13,499 \pm 3,912$ mIU/ml, $n=7$, $p=0,006$
(MW \pm SD, $p < 0,05$)

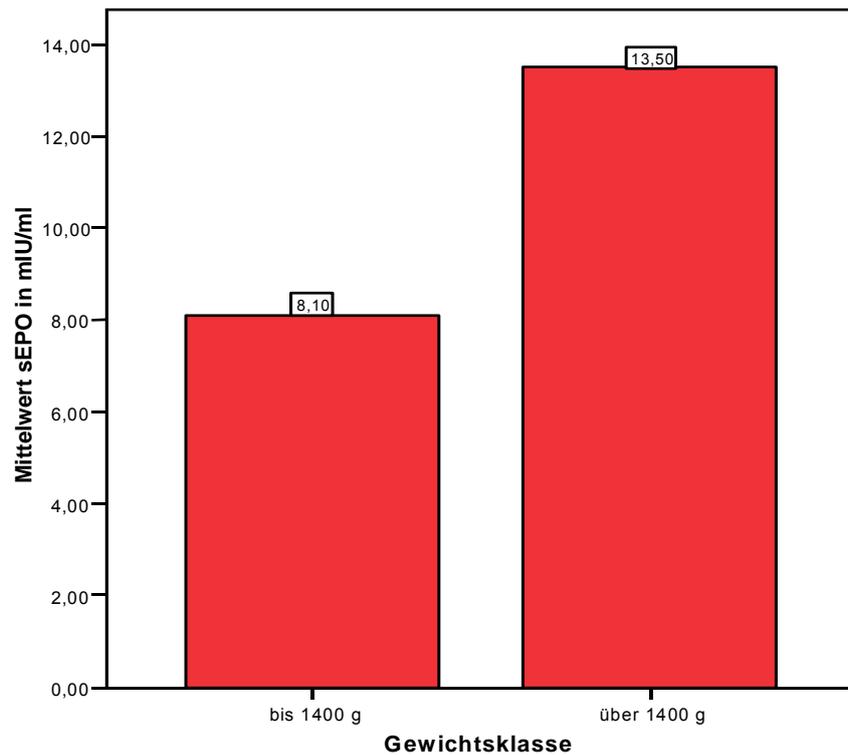


Abbildung 29: Blockdiagramm der Gewichtsklassen ≤ 1400 g und >1400 g

4. Diskussion

Während der fetalen als auch neonatalen Entwicklungs- und Wachstumsphase durchläuft die Erythropoese im wesentlichen genetisch festgelegte und sich ablösende und überlappende Phasen. Dies zeigt sich in zu unterschiedlichem Gestationsalter vorherrschenden Erythrozytensyntheseorten, der sich verändernden Erythrozytenmorphologie und in den unterschiedlichen Hämoglobinen.

Takagi et al., 1989, Forestier et al., 1986 und 1991, Boulot et al., 1993 beschreiben für die rote Reihe der Hämatopoese kontinuierliche, lineare und nur marginal unterschiedliche Anstiege für die Erythrozytenzahl, das Hämoglobin, den Hämatokrit, sowie einen Abfall des MCV. In den drei erwähnten Studien wurden die Proben gesunder Feten ebenfalls mittels Ultraschall gesteuerter Cordozentese von der 18. SSW bis zur 38. SSW (entsprechend 190. bis 266. SST) gewonnen, zusätzlich wurden die umbilikalen Blutbilder nach Geburt verwertet. In der vorliegenden Arbeit wurden die Blutbilder vom 160. SST (Fetus 5) bis zum 243. SST (Fetus 2) gemessen, allerdings litten die beobachteten Feten sämtlich an einer fetalen Alloimmunthrombozytopenie. Trotz dieser hämatologisch, immunologischen Grunderkrankung finden sich auch in diesem Kollektiv die in den drei Studien beschriebenen Anstiege für Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit und den Abfall des MCV. Allerdings unterscheiden sie sich sämtlich in der Steigung der Linearität (vergleiche Tabelle 3, Kapitel 1 mit den in den Abbildung 30 bis 33 gezeigten Steigungen, des Anhangs) deutlich. Da sich in der Literatur keine hämatologischen Vergleichswerte bei dieser Erkrankung, bei der die fetale Blutungsgefahr wegen der Thrombozytopenie klinisch führend ist, finden, kann man den Grund hierfür ehestens im unterschiedlichen Beobachtungszeitraum sehen, zumal sich die Werte für Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit und MCV im Vergleich zu den von Forestier et al., 1991 untersuchten Feten sämtlich im Normbereich befinden, wie den Abbildungen 13 bis 16. zu entnehmen ist. Hieraus ist zu schliessen, dass die Erythropoese bei Feten mit FAITP nicht beeinträchtigt ist.

Das Glycoprotein und Hormon Erythropoetin scheint auch beim Menschen eine entscheidende Rolle für eine angemessene Erythropoese während der Embryonal- und Fetalzeit zu haben. Erythropoetin ist im adulten humanen Organismus der zentrale Regulator der bedarfsgerechten Adaptation der Erythropoese, der Schlüsselreiz zur Erythropoetinsynthese ist hier die renale Gewebshypoxie. Das

sezernierte Erythropoetin wirkt im roten Knochenmark linienspezifisch auf erythroide Progenitorzellen (Erslev, 1953, Jelkmann et al., 1994). Im Tierversuch mit Knock-out Mäusen für das Erythropoetingen oder das Erythropoetinrezeptorgen konnten Wu et al., 1995 klar zeigen, dass diese Mäuse an einer aplastischen Anämie in utero verstarben. BFU-E- und CFU-E-Zellen exprimieren eine hohe Anzahl Erythropoetinrezeptoren und sind für Reifung, Differenzierung und zur Prophylaxe vor vorzeitiger Apoptose auf Erythropoetin angewiesen. Zudem ist die Sensitivität dieser Vorläuferzellen für Erythropoetin bei Mäusen in der Embryonal- und frühen Fetalzeit höher als bei älteren Feten oder Erwachsenen (Zimmermann et al., 1996). Dies ist möglicherweise die Begründung dafür, dass in den drei bedeutendsten Studien, die sich mit dem Verlauf der Serumerythropoetinkonzentrationen beim menschlichen Fetus beschäftigten, mit zunehmenden Gestationsalter ein signifikanter Serumerythropoetinanstieg gezeigt wurde (Moya et al., 1993, Ireland et al., 1992 und Thomas et al., 1983), dabei waren die EPO-konzentrationen im frühen zweiten Trimenon eher niedrig zwischen 4 bis 10 mIU/ml und zeigten einen Anstieg bis zur Geburt um das bis zur vierfache, auf bis zu 40 mIU/ml. Dementsprechend können fetale Serumerythropoetinkonzentrationen <40 mIU/ml als normal angenommen werden. Die vorliegende Arbeit zeigt ebenfalls steigende Erythropoetinkonzentrationen mit zunehmenden Gestationsalter, allerdings war die Korrelation nicht signifikant ($r=0,318$, $p=0,7$). Im Gegensatz zu den drei erwähnten Studien wurde in der vorliegenden Arbeit neben dem Gestationsalter erstmals auch das sonografisch ermittelte Fetalgewicht als mögliche Einflußgröße betrachtet. Zwar ergab sich auch hier keine signifikante Korrelation ($r=0,344$, $p=0,054$, $n=23$), dennoch ist eine klare Tendenz erkennbar, die bei einer grösseren Stichprobe sicherlich deutlicher ausgefallen wäre. Die eingehendere Betrachtung zeigt, dass Serumerythropoetinkonzentrationen >12 mIU/ml ab einem Gewicht von >1400 Gramm nachweisbar waren. Folglich fand sich im Gruppenvergleich Fetalgewicht \leq 1400 Gramm ($8,10\text{mIU/ml} \pm 2,12$, $n=16$) und >1400 Gramm ($13,5\text{mIU/ml} \pm 3,91$, $n=7$) mit $p=0,006$ ein signifikanter Anstieg. Hieraus wird geschlossen, dass bei einem kritischen Gewicht von über 1400 Gramm die Erythropoetinsynthese hochreguliert wird. Regulationsmechanismus des Erythropoetins während der Fetalzeit ist u.a. wie beim Erwachsenen die Gewebshypoxie. So konnten bereits 1992 Thilaganathan et al., Moya et al., 1993, Fahnenstich et al., 1996 und Hebgen et al., 1997 zeigen, dass humane Feten mit anämischer Hypoxie infolge hämolytischer Anämie bei Rhesus-

Isoimmunisierung sehr hohe Serumerythropoetinkonzentrationen mit bis zu 800 mIU/ml aufweisen. In Einklang mit dem soeben Gesagtem ist der Erythropoetinanstieg von Fetus 1 mit einer Hämoglobin wirksamen Blutung ehestens Ausdruck der anämische Hypoxie. So könnte der Anstieg des Plasmaerythropoetins mit zunehmendem Fetalgewicht als Ausdruck des Wachstums und zunehmender Zellmasse auf eine parallel hierzu steigende Sauerstoffschuld des fetalen Organismus hindeuten. Gleichzeitig tritt die medulläre Erythropoese am Übergang vom zweiten zum dritten Trimenon zunehmend in den Vordergrund und löst die hepatolienale Erythropoese ab (vgl. Abb 1.4., Kapitel 1) (Hinrichsen et al., 1990). Während des zweiten und dritten Trimenons ist im Gegensatz zum erwachsenen Menschen die Leber Hauptsyntheseort des Erythropoetins (Zanjani et al., 1981, Eckardt et al., 1992 und Dame et al., 1998). Während des zweiten Trimenons sind Erythropoetin-synthese und Erythropoese koexistent, so dass vermutet werden kann, dass Erythropoetin zu diesem Zeitpunkt parakrin wirksam ist und somit nur in geringer Konzentration im Plasma nachweisbar ist und mit zunehmender medullärer Erythropoese auch steigenden endokrinen Charakter annimmt und auf dem Weg vom hepatischen Syntheseort zum Rezeptor im Knochenmark im Plasma in höheren Konzentrationen nachweisbar wird. Eine weitere Erklärung für gewichtsabhängige steigende Plasmaerythropoetinkonzentrationen ist der molekularbiologische Nachweis von Erythropoetinrezeptor- mRNA und der immunhistochemische Nachweis von Erythropoetinrezeptoren in und auf nicht-hämatopoetischen Geweben, wie Endothelzellen, Myocardiocyten, Makrophagen, Retina-, Nebennieren-, Milz-Dünndarm-, Leber-, Nieren-, Lungen- und Gehirnzellen (Juul et al., 1998). Im Gegensatz zu der ursprünglichen Annahme, dass Erythropoetin auch in der Fetalzeit lediglich spezifisch, proliferativ auf die Hämatopoese wie im erwachsenen Organismus wirkt, konnte diese Untersuchung aufgrund der weiten Verbreitung von Erythropoetinrezeptoren im fetalen Organismus eindrücklich zeigen, dass dieses Hormon in der intrauterinen Wachstums- und Entwicklungsphase multiple Funktionen neben der Erythropoese wahrnimmt. In diesem Sinne sind auch die Arbeiten von Anagnostou et al., 1990, Ohneda et al., 1993, und Wald et al., 1996 zusehen, die in vitro und im Tierversuch den mitogenen Effekt von Erythropoetin auf die oben erwähnten Zelltypen nachweisen konnten. Weiterhin konnten sekundäre Effekte für mit rekombinanten Erythropoetin stimulierten Zellen aufgezeigt werden. So fanden beispielsweise Carlini et al., 1995 und Nagai et al., 1995 einen Calcium-abhängigen

Anstieg der Endothelin-I-Synthese und Ausschüttung von Endothelzellen, die mit rekombinanten Erythropoetin stimuliert wurden. Eine weitere, wichtige Wirkung von Erythropoetin auf Endothelzellen ist die Angiogenese (Carlini et al., 1995b). Cerebrale, kapilläre Endothelzellen exprimieren einen membrangebundenen Erythropoetinrezeptor und Yamaji et al. spekuliert dahingehend, dass Erythropoetin unter hypoxischen Bedingungen die de novo Genese von cerebralen Kapillaren bedingt, was gleichbedeutend damit ist, dass Erythropoetin eine neurotrophische und neuroprotektive Funktion in der Fetalzeit besitzt.

Zusammenfassend zeigt die weite Verbreitung von Erythropoetin und seinem Rezeptor im fetalen Organismus, dass die Wirkung von Erythropoetin nicht nur die Erythropoese beeinflusst, sondern wahrscheinlich darüberhinaus vielfältige Aufgaben in Geweben nahezu aller Körperregionen wahrnimmt und somit eher als allgemeiner Wachstums- oder Differentierungsfaktor zu dieser Lebensphase wirkt. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass Erythropoetin mit zunehmenden Fetalgewicht im beobachteten Zeitraum vom 160. bis zum 243. Schwangerschaftstag quantitativ zunimmt und gut in das sich aktuell verändernde Verständnis der Wirkung von Erythropoetin eingefügt werden kann. Die Frage ob der Plasmaerythropoetinanstieg die Antwort auf eine Gewebshypoxie ist oder aber Erythropoetin genetisch programmartig im Sinne einer "Biologischen Uhr" hochreguliert wird, bleibt offen, so dass weitere Untersuchungen notwendig sein werden, um auch die nicht-hämatopoetische Rolle des Erythropoetins während der Fetalzeit vollständig zu verstehen.

5. Zusammenfassung

Während der Embryonal- und Fetalzeit kann davon ausgegangen werden, dass im Zusammenhang mit dem Wachstum und damit der zunehmenden Zellmasse der steigende Sauerstoffbedarf durch adäquate Erythropoese und Angiogenese gedeckt werden muss. Während die Regulation der Erythropoese des adulten, humanen Organismus als gut bekannt gilt., ist im Gegensatz hierzu die Regulation der fetalen Erythropoese während der Schwangerschaft durch Erythropoetin einem Verständniswandel unterworfen. Die vorliegende Arbeit betrachtet retrospektiv die durch Cordozentese gewonnenen fetalen Parameter Erythrozyten, Hämoglobin (Hb), Hämatokrit (Hkt), mittlere korpuskuläres Volumen (MCV), das sonografisch ermittelte Fetalgewicht in Bezug auf das Gestationsalter von acht Feten zu je drei Untersuchungszeitpunkten, und es wurden die Serumerythropoetinkonzentrationen mit einem kommerziellen ELISA-Test (R&D Systems) bestimmt. Die Cordozentesen waren wegen einer bekannten fetalen Alloimmunthrombozytopenie sämtlich indiziert, zum Monitoring der fetalen Thrombozytenzahl oder bei kritischen Thrombozytenzahlen zur IUTT und wurden zwischen dem 160. bis zum 243 SST durchgeführt. Es zeigen sich Anstiege für die Erythrozytenzahl, das Hb, des Hkt sowie ein Abfall des MCV mit zunehmenden Gestationsalter. Sämtliche Parameter waren im Vergleich zur Literatur normwertig, woraus geschlossen wird, dass die Erythropoese bei Feten mit fetaler Alloimmunthrombozytopenie (FAITP) von der Pathologie dieser Erkrankung nicht betroffen ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Erythropoetin mit zunehmenden Gestationsalter zwischen dem zweiten von $8,8 \pm 1,9$ mIU/ml auf $10,5 \pm 4,6$ mIU/ml im dritten Trimenon ansteigt ($r=0,311$, $p=0,83$). Dabei korreliert das Gewicht mehr mit der sEPO-Konzentration als das Gestationsalter ($r=0,344$, $p=0,054$, $n=23$). Dementsprechend konnte ein kritisches Gewicht von 1400 Gramm ermittelt werden, ab dem das sEPO signifikant ansteigt ($8,10 \pm 2,12$ mIU/ml, $n=16$ vs. $13,5 \pm 3,91$ mIU/ml, $n=7$, $p=0,006$). Man kann daher vermuten, dass hinsichtlich der Erythropoese mit zunehmender Zellmasse und steigendem Sauerstoffbedarf der Anstieg der Plasmaerythropoetinkonzentration die physiologische Antwort auch in der Fetalzeit auf die wachstumsbedingte Gewebshypoxie ist.

6. Literatur

Aufricht C, Ties M,, Salzer-Muhar U, Wimmer M, Herckner K, Haschke F : Erythropoietin, erythropoiesis and iron status in children after major surgical stress, Eur J Pediatr, 1995, 154, 458-61

Bachmann S, Le Hir M, Eckardt KU: Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin, 1991, 3 (suppl 3), 9-19

Bauer C: Erythropoietin-from gene structure to therapeutic application, J.Perinat.Med, 1995, 23, 77-81

Bauer C: Physiologic Determinants of Erythropoietin Production, Seminars in Hematology, 1991, 28, 9-13

Bauer C, Kurtz A, Eckhardt KU, Tannahill L: Regulation der Erythropoietin-Bildung, Nephron, 1989, 51, 3-10

Beguín Y, Lipscei G, Oris R, Thoumsin H, Fillet G: Serum immunoreactive erythropoietin during pregnancy and early postpartum, Br. J Haematol, 1990, 76, 545-549

Berkowitz RL, Chitkara U, Wilkins IA, Lynch L, Plosker H, Bernstein HH : Intravascular monitoring and management of erythroblastosis fetalis, Am J Obstet Gynecol, 1988, 158, 783-795

Berkowitz RL, Chitkara U, Goldberg JD, Wilkins I, Chervenak FA, Lynch L: Intrauterine intravascular transfusions for severe red blood cell isoimmunization: Ultrasound-guided percutaneous approach, Am J Obstet Gynecol, 1986, 155, 574-581

Bizzaro N, Dianese G: Neonatal alloimmune amegakaryocytosis, *Vox Sang.* 1988;54(2):112-4, 1988, 54, 112-114

Boulot P, Cattaneo A, Taib J, Peray P, Lefort G, Hedon B, Laffargue F, Viala JL: Hematological Values of Fetal Blood Obtained by Means of Cordocentesis, *Fetal Diagn Ther*, 1993, 8, 309-316

Broudy VC, Lin N, Brice M, Nakamoto B, Papayannopoulou T: Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells, *Blood*, 1991, 77, 2583-90

Bussel JB, Berkowitz RL, Lynch L, Lesser ML, Paidas MJ, Huang CL, McFarland JG: Antenatal Management of alloimmunethrombocytopenia with intravenous gamma-globulin: a randomized trial of the addition of low dose steroid to intravenous gamma-globulin, *Am J Obstet Gynecol*, 1996, 174, 1414-1423

Bussel JB, Zabusky MR, Berkowitz RL, McFarland JG: Fetal alloimmune thrombocytopenia, *N Eng J Med*, 1997, 337, 22-26

Carlini RG, Gupta A, Liapis H, Rothstein M: Endothelin-I release by erythropoietin involves calcium signaling in endothelial cells, *J Cardiovasc Pharmacol*, 1995, 26, 889-892

Carlini RG, Reyes AA, Rothstein M: Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis in vitro, *Kidney Int*, 1995b, 47, 740-745

Cheetham JC, Smith DM, Aoki KH, Stevenson JL, Hoeffel TJ, Syed RS, Ergrie J, Harvey TS: NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation, *Seminars in Hematology*, 1991, 3 (suppl 3), 2-8

Cotes PM: Physiological studies of Erythropoietin in Plasma in *Erythropoietin*, Wolfgang Jelkmann, Andreas J. Gross(Eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1989, 57-79

Dame C, Juul SE: The switch from fetal to adult erythropoiesis, Clinics in perinatology, 2000, 27, 507-526

Dame C, Fahnenstich H, Freitag P Hofmann D, Abdul-Nour T, Bartmann P, Fandrey J: Erythropoietin mRNA Expression in human fetal and neonatal Tissue, Blood, 1998, 92, 3218-3225

D'Andrea AD, Zon LI: Erythropoietin receptor:Subunit structure and activation, J Clin Invest, 1990, 86, 681-7

Dordal MS, Wang FF, Goldwasser E: The role of carbohydrate in erythropoietin action, Proc Soc Exp Biol Med, 2003, 1-14

Dudenhausen JW, Schneider HPG: Frauenheilkunde und Geburtshilfe, de Gruyter Berlin New York, 1994, 2.Auflage

Eckardt KU, Ratcliff PJ, Tan CC, Bauer V, Kurtz A: Age-dependent expression of the erythropoietin gene in rat liver and kidneys, J Clin Invest, 1992, 89, 753-60

Eggena P, Willsey P, Jamgotchia N, Truckenbrod L, Hu MS, Barrett JD, Eggena MP, Clegg K, Nakhoul F, Lee DBN: Influence of recombinant human erythropoietin on blood pressure and tissue renin-angiotensin systems, Blood, 1991, 77, 2360-2363

Erslev AJ: Humoral regulation of red cell production, Acta Paediatr, 2002, 438, 17-26

Erslev AJ: Erythropoietin, N Eng J Med, 1990, 324, 1339-1344

Erslev AJ: Erythropoietin Titers in Health and Disease, Seminars in Hematology, 1991, 28, 2-8

Fahnenstich H, Dame C, Allera´A, Kowalewski S: Biochemical monitoring of fetal distress with serum-immunoreactive erythropoietin, J Perinat Med, 1996, 24, 85-91

Fisher JW: Erythropoietin: physiologic and pharmacologic aspects, Proc Soc Exp Biol Med, 1997, 216, 358-369

Fisher JW: Erythropoietin: Physiology and Pharmacology Update, Proc Soc Exp Biol Med, 2003, , 1-14

Forestier F, Daffos F, Catherine N, Renard M, Andreux JP: Developmental Hematopoiesis in Normal Human Fetal Blood, Blood, 1991, 77, 2360-2363

Forestier F, Daffos F, Galakteros F, Bardakjian J, Rainaut M, Beuzard Y: Hematological Values of 163 Normal Fetuses between 18 and 30 weeks of Gestation, Pediatric Research, 1986, 20, 342-6

Giers G, Hoch J, Bauer H, Bald R, Kiefel V, Kroll H, Hansmann M, Hanfland P, Mueller-Eckhardt C, Scharf RE: Therapy with intravenous immunoglobuline G (ivIgG) during pregnancy for fetal alloimmune (HpA-1a(Zwa)) thrombocytopenic purpura, Prenat Diagn., 1996, 16, 495-502

Goldwasser E, Beru N, Smith D: Erythropoietin: The Primary Regulator of Red Cell Formation, in Handbook of Experimental Pharmacology, Bd 95, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1990, 95, 747-765

Grannum PAT, Copel JA, Moya FR, Scioscia AL, Robert JA, Winn HN, Coster BC, Burdine CB, Hobbins JC: The reversal of hydrps fetalis by intravascular intrauterine transfusion in severe isoimmune fetal anemia, Am J Obstet Gynecol, 1988, 158, 914-919

Grenet P, Badual J: Diagosis of neonatal Thrombopenia, Resp.Physiol., 1986, 63, 257-266

Groopman JE, Molina JM, Scadden DT: Hematopoietic growth factors. Biology and clinical applications, Dtsch med Wschr, 1991, 116, 230-234

Guang LW, Semenza GL: Characterization of Hypoxia-inducible Factor 1 and Regulation of DANN Binding Activity by Hypoxia, J Biol Chem, 1993, 268, 21513-21518

Guang LW, Semenza GL: Purification and Characterization of Hypoxia-inducible Factor 1, J Biol Chem, 1995, 270, 1230-1237

Hågå P, Cotes PM, Till JA, Minty BD, Shinebourne EA: Serum immunoreactive erythropoietin in children with cyanotic and acyanotic congenital heart disease, Blood, 1987, 70, 822-826

Halvorsen S, Bechensteen AG: Physiology of erythropoetin during mammalian development, Acta Paediatr, 2002, 438, 17-26

Hansmann M, Hackelöer BJ, Staudach A: Ultraschalldiagnostik in Geburtshilfe und Gynäkologie, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo, 2000, 41, 350-6

Hebgen A, Schiffer-N'Gambolo D, Bald R, Hansmann M, Bode U: Fetale Plasma-Erythropoetinkonzentrationen unter intrauteriner Transfusionstherapie bei isoimmunhämolytischer, Ultraschall in Med, 1997, 18, 162-165

Hinrichsen KV (Hrsg.): Humanembryologie, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo, 1990, 1.Auflage

Hoch J: Zur pränatal transfusionspflichtigen fetalen Erythroblastose infolge fetomaternalen Blutgruppeninkompatibilität, Dissertation Universität Bonn, 1993

Huawei Q, Belanger A, Yoon HWP, Bunn HF: Homodimerization Restores Biological Activity to an Inactive Erythropoietin Mutant, Nephron, 1989, 51 (suppl 1), 20-25

Huch R, Huch A: Maternal and fetal Erythropoietin: Physiological Aspects and Clinical Significance, Annals of Medicine, 1993, 25, 289-293

Imai N, Kawamura A, Higuchi M, Oh-eda M, Orita T, Kawaguchi T, Ochi N: Physicochemical and biological comparison of recombinant human erythropoietin with human urinary erythropoietin, *J Clin Invest*, 1986, 78, 51-60

Ireland R, Abbas A, Thilaganathan B, Melbye O, Snijders R, Layton M, Nicolaides KH: Fetal and maternal erythropoietin levels in normal pregnancy, *Fetal Diagn Ther*, 1992, 7, 21-25

Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Sali A, Asara JM, Lane WS, Kaelin Jr. WG: HIF α Targeted for VHL-Mediated Destruction by Proline Hydroxylation: Implications for O₂ Sensing, *Science*, 2001, 292, 464-467

Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, Seehra J, Jones SS, Hewick R, Fritsch EF: Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin., *Nature*, 1985, 313, 806-810

Jacobs-Helber SM, Penta K, Sun Z, Lawson A, Sawyer ST: Distinct Signaling from Stem Cell Factor and Erythropoietin in HCD57 Cells, *J Biol Chem*, 1996, 272, 6850-6853

Jelkmann W: Erythropoietin Research, 80 years after the initial studies by Carnot and Deflandre, *Resp.Physiol.*, 1986, 63, 257-266

Jelkmann W: Molecular Biology of Erythropoietin, *Int Med*, 2004, 43, 649-659

Jelkmann W, Wolff M: Bestimmung der Erythropoietin-Aktivität im Serum, *Dtsch med Wschr*, 1991, 116, 230-234

Jelkmann W: Biology of erythropoietin, *Clin Investig*, 1994, 72, 3-10

Jelkmann W, Wiedemann G: Serum erythropoietin level: Relationships to blood haemoglobinconcentration and erythrocytic activity of bone marrow, *Kli Wochenschr*, 1990, 68, 403-7

Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL, : Transactivation and Inhibitory Domains of Hypoxia-inducible Factor 1 alpha, J Biol Chem, 1997, 31, 19253-19260

Juul SE, Anderson DK, Li Y, Christensen RD: Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human nervous system, Pediatric Res, 1993, 43, 40-49

Juul SE, Yachnis AT, Christensen RD: Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetus, Early human Development, 1998, 52, 235-249

Kling PJ, Schmidt RL,, Roberts RA, Widness JA: Serum erythropoietin levels during infancy: Associations with erythropoiesis, J Perinat Med, 1995, 23, 71-76

Konishi Y, Chui DH, Hirose H, Kunishita T, Tabira T: Trophic effect of erythropoietin and otherhematopoetic factors on central cholinerg neurons in vitro and in vivo, Brain Res, 1993, 609, 29-35

Lacombe C, Mayeux P: The molecular biology of erythropoietin, Nephrol Dial Transplant, 1999, 14, 22-28

Lai PH, Everett R, Wang FF, Arakawa T, Goldwasser E: Structural characterization of human erythropoietin, J Biol Chem, 1986, 261, 3116-3121

Lappin TRJ, Maxwell AP: Chemistry and assays of Erythropoitin in Eerythropoietin, Wolfgang Jelkmann, Andreas J. Gross(Eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1989, , 7-18

Maggakis-Kelemen C, Bork M, Kayser P, Biselli M, Artmann GM: Biological and mechanical quality of red blood cells cultured from human umbilical cord blood stem cells, Med Biol Eng Comput, 2003, 41, 350-356

Marti HH: Erythropoietin and the hypoxic brain, J Exp Biol, 2004, 207, 3233-3242

Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R: A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes, *J Biol Chem*, 1994, 269, 19488-19493

Maxwell PH, Ferguson DJ, Nicholls LG, Johnson MH, Ratcliffe PJ: The interstitial response to renal injury: fibroblast-like cells show phenotypic changes and have reduced potential for erythropoietin gene expression, *Blood*, 2003, 101, 492-497

Maxwell PH, Osmond MK, Pugh CW, Heryet A, Nicholls LG, Tan CC, Doe BG, Ferguson DJ, Johnson MH, Ratcliffe PJ: Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice, *Proc Natl Acad Sci*, 1997, 94, 1806-1810

McMullin MF, Percy MJ: Erythropoietin Receptor and Hematological Disease, *Am J Hematol*, 1999, 60, 55-60

Meyer F: Vom nativen zum rekombinanten Humanerythropoietin, *Nephron*, 1989, 51, 20-25

Meyer MP, Sharma E, Carsons M: Recombinant Erythropoietin and blood transfusion in selected preterm infants, *Science*, 2001, 292, 449-451

Migliaccio G, Migliaccio AR, Petti S, Mavilio F, Russo G, Lazzaro D, Testa U, Maranucci M, Peschle C: Human Embryonic Hemopoiesis, *J. Clin Invest*, 1986, 78, 51-60

Millard DD, Gidding SS, Socol ML, MacGregor SN, Dooley SL, Ney JA, Stockman III JA: Effects of intravascular, intrauterine transfusion on prenatal and postnatal hemolysis and erythropoiesis in severe fetal isoimmunisation, *J Pediatr*, 1990, 117, 447-454

Miyake T, Kung CKH, Goldwasser E,: Purification of Human Erythropoietin, *J Biol Chem*, 1977, 252, 5558-5564

Moya FR, Grannum P, Widness JA, Clemons GK, Copel JA, Hobbins JC: Erythropoietin in Human Fetuses With Immune Hemolytic Anemia and Hydrops Fetalis, *Obstet Gynecol*, 1993, 82, 353-358

Muller JY, Reznikoff-Etievant MF, Patereau C, Julien F: Neonatal thrombopenia caused by antiPLA1 and HLA-DR3 antigen alloimmunization, *J Biol Chem*, 1997, 272, 6850-3

Müller-Eckhardt C (Hrsg): *Transfusionsmedizin*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1996, 2. Auflage

Nagai TAYN, Kohjiro NS, Nabeshima K, Kanamori N, Takayama K, Kinugasa E, Koshikawa S: Effects of rHEPO on cellular proliferation and endothelin-I production in cultured endothelial cells, *Nephrol Dial Transplant*, 1995, 10, 1814-1819

Ohls RK: Erythropoietin and hypoxia inducible factor-1 expression in the mid-trimester human fetus, *Acta Paediatr*, 2002, 438, 27-30

Pagel H, Jelkmann W, Weiss C: Tissue Hypoxia and the Production of Erythropoietin in Erythropoietin, Wolfgang Jelkmann, Andreas J. Gross(Eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1989, 36-47

Papayannopoulou T, Kurachi S, Nakamoto B, Zanjani ED, Stamatoyannopoulos G: Hemoglobin switching in culture: Evidence for a humoral factor that induces switching in adult and neonatal but not fetal erythroid cells, *Proc. Natl Acad Sci*, 1982, 79, 6579-6583

Plzak LF, Fried W, Jakobson LO, Bethard WF: Demonstration of stimulation of erythropoiesis by plasma from anemic rats using Fe⁵⁹, *Annurev cellbio*, 1999, 15, 551-578

Ramsay MM, James DK, Steer PJ, Weiner CP, Gonik B: *Normal Values in Pregnancy*, WB Saunders, London, Edinburgh, New York, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto, 2000, 2. Edition

Recny MA, Scoble HA, Kim Y: Structural characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin. Identification of des-arginine 166 erythropoietin, J Biol Chem, 1987, 262, 17156-17163

Reissmann KR: Studies on the mechanism of erythropoietic stimulation in parabiotic rats during hypoxia, Engl J Med, 1989, 321(21):, 1449-1459

Remy I., Wilson IA., Michnick SW: Erythropoietin Receptor Activation by a Ligand-Induced Conformation Change, Science, 1999, 283, 990-993

Rhyner K, Egli F, Niemöller M, Wieczorek A, Grminger P, Vetter W: Serumerythropoietinwerte bei verschiedenen Krankheitszuständen, Nephron, 1989, 51 Suppl.1, 39-46

Richter C, Huch A, Huch R: Erythropiesis in the postpartum period, J Perinat Med, 1995, 23, 51-59

Rohen, Lütjen-Decrall: Funktionelle Embryologie, Schattauer, 2004, 2. Auflage,

Salama A: Alloimmune Thrombocytopenias, J Pediatr Hematol Oncol, 2003, 25, 39-41

Sawada K, Krantz SB, Dai CH: Purification of human blood burst forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptor, J Cell Physiol., 1990, 142, 219-230

Schneider H., Malek A: Lack of permeability of the human placenta for erythropoietin, J Perinat Med, 1995, 23, 71-76

Schneider H, Naiem A, Malek A, Hänggi W: Ätiologische Klassifikation der Frühgeburt und ihre Bedeutung für die Prävention, Geburtsh. U. Frauenheilk., 1994, 54, 12 19

Semenza GL: HIF-1, O₂ and the 3 PHDs: How Animal Cells Signal Hypoxia to the Nucleus, *Nephron*, 1989, 51 (suppl 1), 3 10

Semenza GL: Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1, *J Histochem Cytochem*. 1993 Mar;41(3):335-341

Shulman NR, Marder VJ., Weinrach RS: Comprision of immunologic and idiopathic thrombocytopenia, *Kidney Int*. 1993 Nov; 44(5):1149-1162

Singbartl G: Adverse events of erythropoietin in long-term and in acute /short-term treatment, *Clin Investig*, 1994, 72, 36-43

Storring PL, Tiplady RJ, Gaines Das RE, Lamikanra A, Refferty B, Lee J: Epoetin alfa and Beta differ in their Erythropoietin isoform composition and biological properties, *N Engl J Med*. 1997 Jul 3;337(1):22-6

Strunk T, Härtel C, Schultz C: Does erythropoietin protect the preterm brain?, *Trans Assoc Am Physicians*. 1964;77:65-78

Thilaganathan B, Salvesen DR, Abbas A, Ireland RM, Nicolaidis KH: Fetal plasma erythropoietin concentration in red cell isoimmunized pregnancies, *Am J Obstet Gynecol*, 1992, 167, 1292-1297

Thomas DB, Yoffrey JM: Human Foetal Haemopoiesis The Composition of Foetal Blood, *Br J Haemat*, 1962, 8, 290-295

Thomas L (Hrsg.): *Labor und Diagnose*, TH Books ,Frankfurt/Main, 5.Auflage, 1998

Thomas RM, Canning CE, Cotes PM, Linch DC, Rodeck CH, Rossiter CE, Huehns ER: Erythropoietin and cord blood haemoglobin in the regulation of human fetal erythropoiesis, *Br J Obstet Gyn*, 1983, 90, 795-800

Wald MR, Borda ES, Sterin-Borda L: Mitogenic effect of erythropoietin on neonatal rat cardiomyocytes; signal transducing pathways, *J Cell Physiol.*, 1996, 167, 461-468

Williamson LM, Hackett G, Rennie J, Palmer CR, Maciver C, Hadfield R, Hughes D, Jobson S, Ouwehand WH: The natural history of fetomaternal alloimmunization to the platelet-specific antigen HPA-1a (PIA1, Zwa) as determined by antenatal screening, *Blood*, 1998, 92, 2280-2287

Wodja U, Leigh KR, Njoroge JM, Jackson KA, Natarajan B, Stitely M, Miller JL: Fetal hemoglobin modulation during human erythropoiesis: stem cell factor has "late" effects related to the expression pattern of CD 117, *Blood*, 2003, 101, 492-497

Wu H, Klingmüller U, Acurio A, Hsiao JG, Lodish HJ: Functional interaction of erythropoietin and stem cell factor receptors is essential for erythroid colony formation, *Proc Natl Acad Sci*, 1997, 94, 1806-1810

Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF: Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor, *Cell*, 1995, 83, 59-67

Yasuda Y, Nagao M, Okano M, Masuda S, Sasaki R, Konishi H, Tanimura T: Localisation of erythropoietin and erythropoietin-receptor in postimplantation mouse embryos, *Dev Growth Differ*, 1993, 35, 711-722

Zanjani ED, Ascensao JL, McGlave PB: Studies on the Liver to Kidney Switch of Erythropoietin Production, *J Clin Invest*, 1981, 67, 1183-1188

Zanjani ED, Pixley JS, Slotnick N, MacKintosh FR, Ekhterae D, Clemons G: Erythropoietin does not cross the placenta into the fetus, *Pathobiology*, 1993, 61, 211-5

Zhu H, Bunn HF: How Do Cells Sense Oxygen?, *Science*, 2001, 292, 449-451

Zimmermann F, Rich IN: The sensitivity of in vitro erythropoietic progenitor cells to different erythropoietin reagents during development and the role of cell death in culture, *Exp Hematol*, 1996, 24, 330-339

7. Anhang

	Fetus	Initiale nMat	GebdateMa	BGMa	ThromboAKMa	GravMa	ParaMa
1	1	S.K.	08.10.1970	B rh n	Anti-HPA-1a	2	2
2	2	T.A.	14.11.1966	O rh n	Anti-HPA-1a	5	4
3	3	D.H.	03.09.1967	A Rh p	Anti-HPA-1a	5	4
4	4	R.A.	03.10.1964	AB rh	Anti-HPA-1a	4	2
5	5	B.R.	09.07.1970	O rh n	Anti-HPA-1a	3	3
6	6	B.E.	30.10.1967	O Rh	Anti-HPA-1a	5	2
7	7	A.H.	05.10.1979	A Rh p	Anti-HPA-1a	2	1
8	8	S.W.	31.10.1973	O Rh	Anti-HPA-1a	2	1

	AlterMa1.IUT T	GebModus	Gebdatekind	Paraam SST	nIUTT	GenderKi nd
1	29	sectio caesarea	21.08.1998	190	6	weiblich
2	31	sectio caesarea	26.10.1998	250	11	männlich
3	31	sectio caesarea	03.03.1999	246	9	männlich
4	34	sectio caesarea	21.07.1999	249	9	männlich
5	28	sectio caesarea	03.03.1999	243	12	männlich
6	35	sectio caesarea	26.11.2003	258	99	weiblich
7	24	99	.	99	99	99
8	30	sectio caesarea	24.01.2005	251	99	männlich

	birthweight	BGKi nd	APGAR 0	APGAR 5	APGAR10	ZP1date	ZP1SS T	ZP1weigh t
1	920	B rh	7	8	8	05.08.98	176	640
2	2860	O rh	9	10	10	05.08.98	176	887
3	2590	A Rh	9	9	9	10.12.98	164	701
4	2630	AB r	5	8	8	19.05.99	186	1012
5	2440	A Rh	8	9	9	10.12.98	160	608
6	2650	99	8	9	10	01.10.03	202	1412
7	99	99	99	99	99	29.04.04	196	1179
8	2440	99	8	9	9	29.10.04	164	648

Tabelle 21: Erfasste Rohdaten

	ZP1Ery	ZP1Hb	ZP1Hkt	ZP1MCV	ZP1PLT	ZP1PLTpost	ZP1Extinktion
1	3,04	10,8	37,8	124,2	59	214,00	,118
2	2,99	10,1	34,6	115,9	4	132,00	,076
3	3,40	10,7	37,9	111,4	107	238,00	,124
4	2,10	7,1	26,8	127,5	5	226,00	,099
5	3,07	11,0	39,4	128,4	11	362,00	,084
6	3,19	12,4	37,6	117,8	12	244,00	,184
7	3,42	12,6	37,3	109,0	24	328,00	,062
8	3,12	11,0	34,6	110,7	90	419,00	,071

	ZP1EPO	ZP2date	ZP2SST	ZP2weight	ZP2Ery	ZP2Hb	ZP2Hkt
1	10,59	14.08.98	183	698	2,87	10,1	35,1
2	6,82	12.08.98	191	1079	3,00	10,1	34,0
3	11,13	08.01.99	192	1312	3,74	11,8	40,9
4	8,89	27.05.99	194	1076	4,14	12,2	44,8
5	7,54	22.12.98	172	920	3,30	11,8	41,3
6	16,02	08.10.03	209	1565	3,02	11,7	35,3
7	5,40	06.05.04	203	1267	3,63	13,3	39,5
8	6,18	11.11.04	177	791	3,31	12,1	36,7

	ZP2MCV	ZP2PLT prae	ZP2PLTpos t	ZP2Extinktion	ZP2EPO	ZP3date	ZP3SST
1	122,10	29	99,00	,086	7,72	21.08.98	190
2	113,30	32	179,00	,071	6,37	18.10.98	243
3	109,60	25	102,00	,120	10,77	10.02.99	226
4	108,20	14	99,00	,053	4,76	02.06.99	200
5	125,00	20	159,00	,083	7,45	29.01.99	210
6	117,20	10	298,00	,501	16,56	15.10.03	216
7	108,80	29	293,00	,083	7,22	13.05.04	210
8	110,70	48	392,00	,124	10,81	18.11.04	184

	ZP3weigh t	ZP3Ery	ZP3Hb	ZP3Hkt	ZP3MCV	ZP3PLT prae	ZP3Extinktion	ZP3EPO
1	817	,70	3,6	8,6	121,6	19	,302	27,11
2	2849	3,43	11,0	38,3	111,4	4	1,850	16,61
3	1911	4,02	12,5	43,6	108,5	38	,161	14,45
4	1244	4,17	12,0	45,1	108,0	33	,079	7,09
5	1646	3,51	12,0	42,0	119,6	5	,167	14,99
6	1653	3,09	11,8	36,1	117,0	17	,100	8,72
7	1611	3,72	13,6	39,9	107,4	23	,820	7,14
8	846	3,55	13,1	39,2	110,2	37	,124	10,81

Tabelle 22: erfasste Rohdaten (Fortsetzung)

	Name	T	S	D	Variablenlabel	Wertelabels
1	Fetus	N	5	0	Datensatz	Kein
2	InitialenMat	S	7	0	Initialen Mutter	Kein
3	GebdateMa	D	1	0	Geburtsdatum Mutter	Kein
4	BGMa	N	3	0	BG Mutter	{0, O rh negativ}...
5	ThromboAKM	N	1	0	Thrombo-AK Mutter	{1, Anti-HPA-1a}...
6	GravMa	N	5	0	Anzahl Schwangerschaften	Kein
7	ParaMa	N	5	0	AnzahlGeburten	Kein
8	AlterMa1.IUTT	N	5	0	Alter Mutter zur 1.IUTT	Kein
9	GebModus	N	8	0	Geburtsmodus	{1, sectio caesarea}...
10	Gebdatekind	D	1	0	Geburtstag Kind	Kein
11	ParaamSST	N	7	0	Geburt am Schwangerscha	Kein
12	nIUTT	N	8	0	Anzahl stattgehabter IUTT	Kein
13	GenderKind	N	7	0	Kindsgeschlecht	{0, weiblich}...
14	birthweight	N	7	0	Geburtsgewicht	Kein
15	BGKind	N	3	0	BG Kind	{0, O rh negativ}...
16	APGAR0	N	7	0	APGAR 0'	Kein
17	APGAR5	N	7	0	APGAR 5'	Kein
18	APGAR10	N	7	0	APGAR 10'	Kein
19	ZP1date	D	1	0	Datum der 1. Probe	Kein
20	ZP1SST	N	7	0	Schwangerschaftstag	Kein
21	ZP1weight	N	7	0	1sonografisch ermitteltes G	Kein
22	ZP1Ery	N	8	2	Erythrozytenx10e12/l	Kein
23	ZP1Hb	N	7	1	Hb in g/dl	Kein
24	ZP1Hkt	N	7	1	Hkt in %	Kein
25	ZP1MCV	N	7	1	MCV in fl	Kein
26	ZP1PLT	N	7	0	1Thrombozytenzahl/nl vor I	Kein
27	ZP1PLTpost	N	8	2	1Thrombozyten/nl nach IU	Kein
28	ZP1Extinktion	N	7	3		Kein
29	ZP1EPO	N	7	2	1EPO in mIU/ml	Kein
30	ZP2date	D	1	0	Datum der 2. Probe	Kein
31	ZP2SST	N	7	0	Schwangerschaftstag	Kein
32	ZP2weight	N	7	0	2sonografisch ermitteltes G	Kein
33	ZP2Ery	N	8	2	Erythrozytenx10e12/l	Kein
34	ZP2Hb	N	7	1	Hb in g/dl	Kein
35	ZP2Hkt	N	7	1	Hkt in %	Kein
36	ZP2MCV	N	8	2	MCV in fl	Kein
37	ZP2PLTprae	N	7	0	2Thrombozytenzahl/nl vor I	Kein
38	ZP2PLTpost	N	8	2	Thrombozyten/nl nach IUT	Kein
39	ZP2Extinktion	N	7	3		Kein
40	ZP2EPO	N	7	2	2EPO in mIU/ml	Kein
41	ZP3date	D	1	0	Datum der 3. Probe	Kein
42	ZP3SST	N	7	0	Schwangerschaftstag	Kein
43	ZP3weight	N	7	0	3sonografisch ermitteltes G	Kein

Tabelle 23: Bezeichnung der Variablen

	Name	TSD	Variablenlabel	Wertelabels
44	ZP3Ery	N 8 2	Erythrozytenx10e12/l	Kein
45	ZP3Hb	N 7 1	Hb in g/dl	Kein
46	ZP3Hkt	N 7 1	Hkt in %	Kein
47	ZP3MCV	N 7 1	MCV in fl	Kein
48	ZP3PLTprae	N 7 0 3	Thrombozytenzahl/nl vor I	Kein
49	ZP3Extinktion	N 8 3		Kein
50	ZP3EPO	N 7 2	3EPO in mIU/ml	Kein

Tabelle 24: Bezeichnung der Variablen (Fortsetzung)

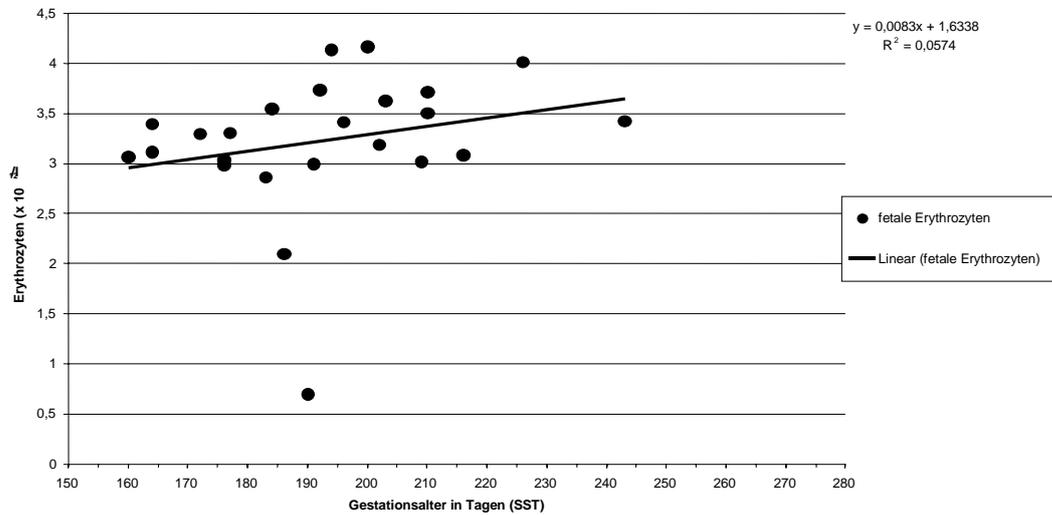


Abbildung 30: Linearer Anstieg der Erythrozytenzahl

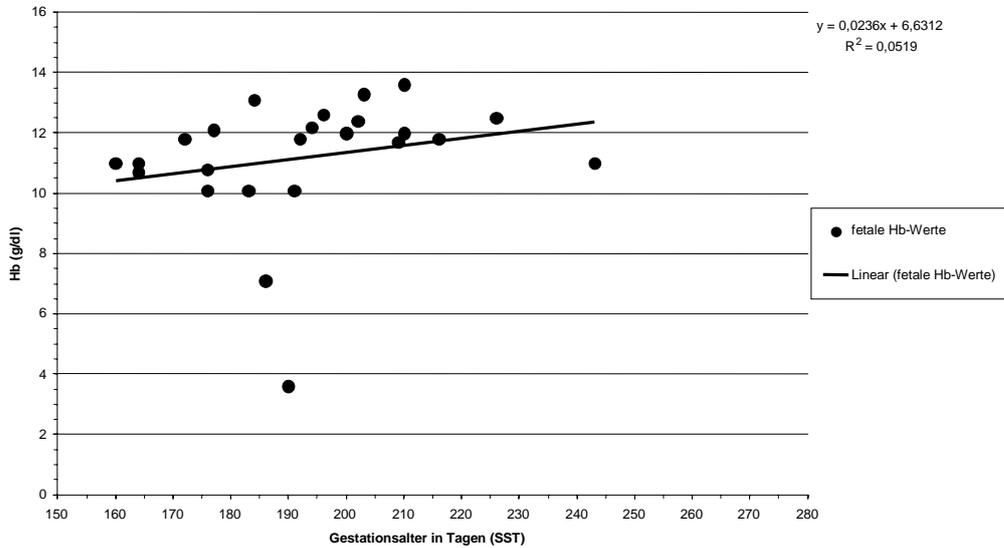


Abbildung 31: Linearer Anstieg des Hämoglobins

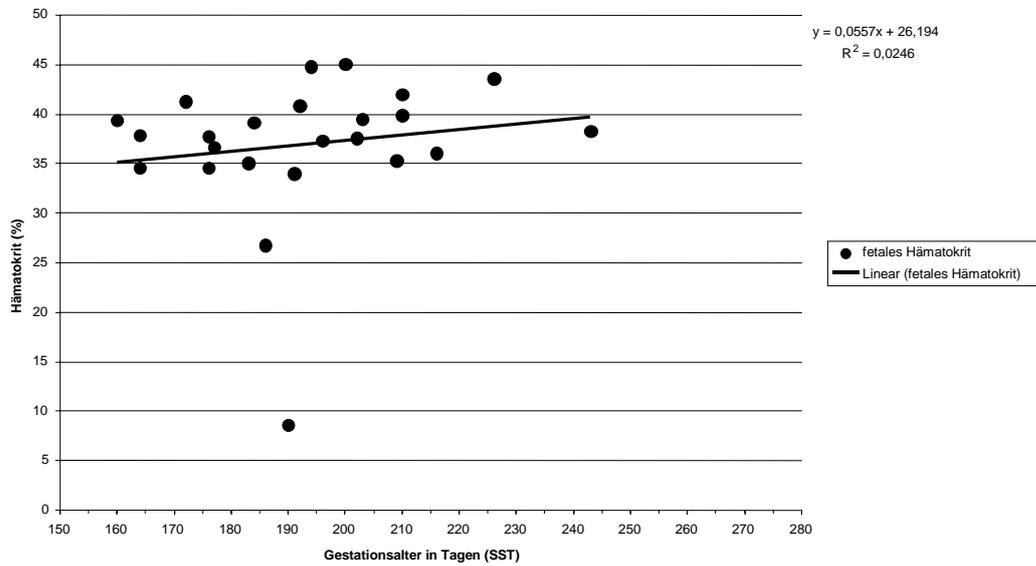


Abbildung 32: Linearer Anstieg des Hämatokrits

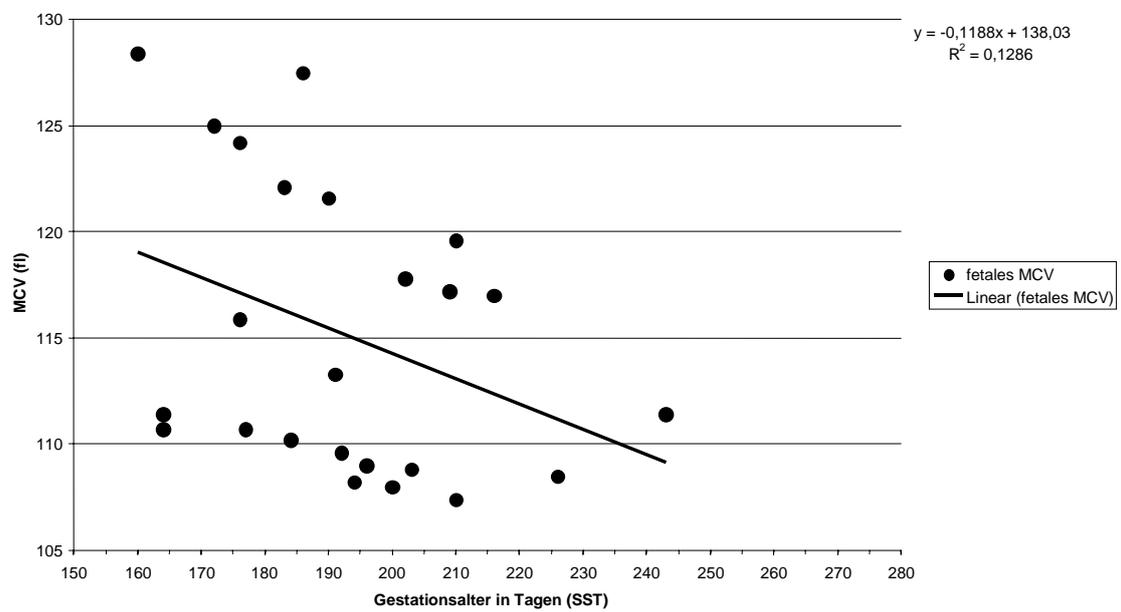


Abbildung 33: Linearer Abfall des MCV

Lebenslauf

Christoph Schmülling

Kampwiese 22
58239 Schwerte

Persönliche Daten

Geburtsdatum	12. November 1964
Geburtsort	Soest
Konfession	röm.-katholisch
Familienstand	verheiratet
Kinder	1 Tochter

Schulbildung / Berufsausbildung

08.1971 bis 06.1972	Besuch der Abtei-Grundschule in Liesborn
07.1972 bis 06.1975	Besuch der Marien-Grundschule in Senden
07.1975 bis 05.1985	Besuch des Gymnasium Johanneum in Ostbevern, Abitur
10.1987 bis 11.1994	Studium der Humanmedizin an der Ruhr-Universität in Bochum
25.08.2005	Abschluß der Weiterbildung zum Facharzt für Transfusionsmedizin

Praktische Ausbildung und Tätigkeiten

	Studentische Hilfskraft
09.1988 bis 05.1991	auf verschiedenen internistischen Stationen der Augusta-Krankenanstalt in Bochum
10.1991 bis 11.1994	auf der interdisziplinären Intensivstation des Martin-Luther-Krankenhauses in Bochum-Wattenscheid

Berufstätigkeit

09.1985 bis 12.1986	Zivildienst im Rettungsdienst und Krankentransport des Landkreises Osnabrück
01.1987 bis 10.1987	Anstellung als Rettungssanitäter im Rettungsdienst und Krankentransport der Stadt Tübingen
12.1994 bis 05.1996	Anstellung als Arzt im Praktikum in der internistischen Abteilung des Martin-Luther-Krankenhauses in Bochum-Wattenscheid
06.1996 bis 4.1997	Anstellung als Arzt in der anästhesiologischen Abteilung des Martin-Luther-Krankenhauses in Bochum-Wattenscheid
05.1997 bis 6.1999	Anstellung als Arzt in der anästhesiologischen Abteilung des Marienkrankenhauses in Schwerte
08.1999 bis 08.2001	Anstellung als Arzt am Institut für Transfusionsmedizin des Klinikums Dortmund
08.2001 bis 06.2003	Anstellung als Arzt am Institut für Transfusionsmedizin Hagen des DRK-Blutspendedienstes West
07.2003 bis 12.2005	Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Düsseldorf

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Allen bedanken, die mich bei meinem Promotionvorhaben begleitet und bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt

Herrn **Privatdozent Dr. Dr. G. Giers** für die Überlassung des Themas, seine stete Diskussionsbereitschaft und sein unerschütterliches Vertrauen in mein freies und eigenständiges, wissenschaftliches Arbeiten,

Herrn **Dr. med. F. Wenzel** nicht nur für seine umfangreiche Betreuung des experimentellen Teils der Arbeit sondern auch für zahlreiche, kritische und fruchtbare Diskussionen, sowie seine Hilfestellung und Supervision,

Herrn **Dr. med. R. Bald** für seine Bereitschaft der Patientendatenüberlassung, die keine Wünsche offen liess,

Herrn **Dr. med H. Kroll** für die freundliche Überlassung der wertvollen, seltenen, fetalen Plasmaproben für diese Untersuchung

Frau **Dipl. Psych. Silke Surma** für ihre kompetente Hilfe und Beratung hinsichtlich der statistischen Datenauswertung und

Herrn **Erich Schipp** für das kritische Korrekturlesen.