

**Messung der Hepcidinkonzentration im Nabelschnur-
plasma von Neu- und Frühgeborenen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Herbst, Johanna

2015

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1.Berichterstatter:

Professor Dr. A. Franz

2.Berichterstatter:

Professor Dr. E. Schleicher

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	II
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung.....	1
1.1. Hintergrund und Ziel der Studie	1
1.2. Der Eisenhaushalt.....	1
1.3. Eisenhaushalt bei Früh- und Reifgeborenen.....	4
1.3.1. Blutbildung.....	4
1.3.2. Neonatale Eisenaufnahme	5
1.3.3. Einflussfaktoren auf die fetalen Eisenspeicher	5
1.3.4. Folgen eines Ungleichgewichts im Eisenhaushalt	6
1.3.5. Frühgeborenenanämie und Prävention	7
1.4. Hepcidin	8
1.4.1. Struktur und Stoffwechsel von Hepcidin	8
1.4.2. Wirkung von Hepcidin auf den Eisenhaushalt	9
1.4.3. Regulation von Hepcidin.....	10
1.4.4. Fetales Hepcidin reguliert den plazentaren Eisentransfer	11
1.4.5. Hepcidin bei Früh- und Reifgeborenen.....	12
2. Methoden.....	13
2.1. Studiengenehmigung durch die Ethikkommission.....	13
2.2. Studienfinanzierung.....	13
2.3. Studiendesign	13
2.4. Studienpopulation	13

2.5. Einschlusskriterien	14
2.6. Ausschlusskriterien	14
2.7. Fallzahl / Poweranalyse	15
2.8. Rekrutierung.....	15
2.9. Datenerfassung der Studienteilnehmer	15
2.10. Studienablauf und Untersuchungsmethoden	17
2.10.1. Studienbedingte Untersuchungen	17
2.10.2. Studienbedingte Untersuchungen von Blut	17
2.11. Statistische Auswertung	19
2.11.1. Univariate Auswertung.....	19
2.11.2. Multivariate Auswertung.....	20
3. Ergebnisse.....	22
3.1. Univariate Auswertung	22
3.2. Multivariate Auswertung	30
4. Diskussion	32
5. Zusammenfassung	40
6. Literaturverzeichnis.....	41
7. Erklärung zum Eigenanteil.....	46
8. Veröffentlichungen.....	47
Danksagung	48

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die Eisenaufnahme in einem duodenalen Enterozyt	3
Abb. 2: Übersicht über Eisenaufnahme und -Abgabe verschiedener Zellen	4
Abb. 3: Regulation von Hepcidin	11
Abb. 4: Probenverarbeitung.....	19
Abb. 5: Verteilung der gemessenen Hepcidinkonzentration im Nabelschnurplasma in Abhängigkeit vom Gestationsalter	23
Abb. 6: Hepcidin in Abhängigkeit vom Gestationsalter.....	24
Abb. 7: Verteilung der Hepcidinkonzentration im Nabelschnurplasma in Abhängigkeit von Ferritin im Nabelschnurplasma.	25
Abb. 8: Hepcidin in Abhängigkeit von Ferritin.....	26
Abb. 9: Hepcidin in Abhängigkeit vom Geburtsgewicht (Z-Score).....	27
Abb. 10: Hepcidin in Abhängigkeit vom Entbindungsmodus	28

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Variablen-Übersicht.....	22
Tab. 2: Gestationsaltersspezifische Referenzwerte von Hepcidin.....	24
Tab. 3: Ergebnis der multivariaten Auswertung mittels multipler logistischer Regression	31

Abkürzungsverzeichnis

AIS	Amnioninfektionssyndrom
AS	Aminosäure
CRP	C-reaktives Protein
DMT-1	divalent metal transporter 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EPO	Erythropoetin
Fe	Eisen
FG	Frühgeborene
Fpn	Ferroportin
HbF	fetales Hämoglobin
HbA	adultes Hämoglobin
Hep _(CB)	Hepcidinkonzentration im Nabelschnurblut
IL-6	Interleukin 6
MCH	mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt
MCHC	mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen
NA-pH	Nabelarterien-pH-Wert
NG	Neugeborene
RG	Reifgeborene
SDS	Standard Deviation Score
SSW	Schwangerschaftswoche
UpM	Umdrehungen pro Minute
VBS	vorzeitiger Blasensprung

1. Einleitung

1.1. Hintergrund und Ziel der Studie

Das 2001 entdeckte Peptidhormon Hepcidin spielt durch die Bereitstellung von Eisen eine wichtige Rolle in der Regulation des Eisenhaushalts. Mittels einer nicht-invasiven Bestimmung im Urin könnte dieser Parameter langfristig eine Überwachung des Eisenstatus bei Frühgeborenen und somit eine individualisierte Eisensupplementierung zur Prävention der Frühgeborenenanämie ermöglichen. Aktuell gibt es in der Literatur jedoch noch keine Daten zu Hepcidin im Nabelschnurblut bei Neu- und Frühgeborenen verschiedenen Gestationsalters. Das Ziel dieser Studie ist es daher zunächst herauszufinden, ob Frühgeborene bereits Hepcidin produzieren und gestationsaltersspezifische Referenzwerte zu etablieren. Zusätzlich sollen Faktoren identifiziert werden, die die Hepcidinkonzentration im Nabelschnurblut ($Hep_{(CB)}$) von Früh- und Reifgeborenen potentiell beeinflussen. Das besondere Augenmerk liegt hierbei auf Faktoren, die den Versorgungszustand des Fetus bereits intrauterin wie auch peripartal beeinflussen können.

1.2. Der Eisenhaushalt

Eisen ist ein wichtiger Bestandteil von Sauerstoff-transportierenden Proteinen wie Hämoglobin und Myoglobin sowie von zahlreichen Redox-Enzymen (zusammengefasst von [1]). Der Körper eines durchschnittlichen Erwachsenen beinhaltet ca. 2-4 g Eisen (zusammengefasst von [1]). Das im Knochenmark für die Erythrozyten-Vorläuferzellen und in anderen Geweben benötigte Eisen wird hauptsächlich aus alternden Erythrozyten wiederverwendet (ca. 20-25 mg) (zusammengefasst von [1, 2]). Nur ca. 1-2 mg pro Tag müssen aus der Nahrung neu aufgenommen werden, um den täglichen Bedarf an Eisen zu decken (zusammengefasst von [1, 2]). Die Eisenaufnahme findet hauptsächlich durch Enterozyten im proximalen Duodenum statt [3]. Sie muss genau reguliert werden um das Eisengleichgewicht aufrecht zu erhalten, da Menschen überschüssiges Eisen nur durch Blutung oder über Abschilferung von Mukosa- und Hautzellen ausscheiden können (zusammengefasst von [1, 4]). Wenn diese Regulationsmechanismen nicht funktionieren (z.B. durch einen genetischen De-

fekt) oder Eisen bzw. Erythrozyten parenteral zugeführt werden, wird das überschüssige Eisen im Gewebe abgelagert und fördert so die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies, welche zu Gewebeschäden und Organversagen führen können (zusammengefasst von [1, 2]). Fehlt dem Körper Eisen, meist verursacht durch einen erhöhten Verlust (z.B. durch gastrointestinale Blutungen), einen vermehrten Verbrauch (z.B. in Wachstumsphasen) oder eine ungenügende Aufnahme über die Nahrung, führt dies im Verlauf zu einer Eisenmangelanämie (zusammengefasst von [4]).

Die hauptsächlich an der Eisen-Homöostase beteiligten Zellen sind duodenale Enterozyten, welche das Eisen aus der Nahrung aufnehmen, Hepatozyten, welche den größten Teil an Eisen in Form von Ferritin speichern, Gewebs-Makrophagen, welche für die Wiederverwendung und Speicherung von Eisen aus alternden Erythrozyten verantwortlich sind und placentare Zellen des Syncytiotrophoblasten, welche für den Transport von maternalem Eisen zum Fetus verantwortlich sind (zusammengefasst von [1, 4]). Diese verschiedenen Zelltypen nutzen unterschiedliche Wege, um das Eisen aufzunehmen (siehe Abb. 2).

Die duodenalen Enterozyten nehmen das Eisen in der zweiwertigen Form Protonen-gebunden über eine Kombination aus der Eisen(Fe)-III-Reduktase (duodenales Cytochrom B, Dcytb) und dem „divalent metal transporter 1“ (DMT-1) auf (siehe Abb. 1) [3, 5, 6]. Hierbei ist die Fe-III-Reduktase für die Überführung des Eisens von der dreiwertigen in die zweiwertige Form verantwortlich, in welcher der DMT-1 es anschließend in die Zelle transportieren kann [3, 5, 6].

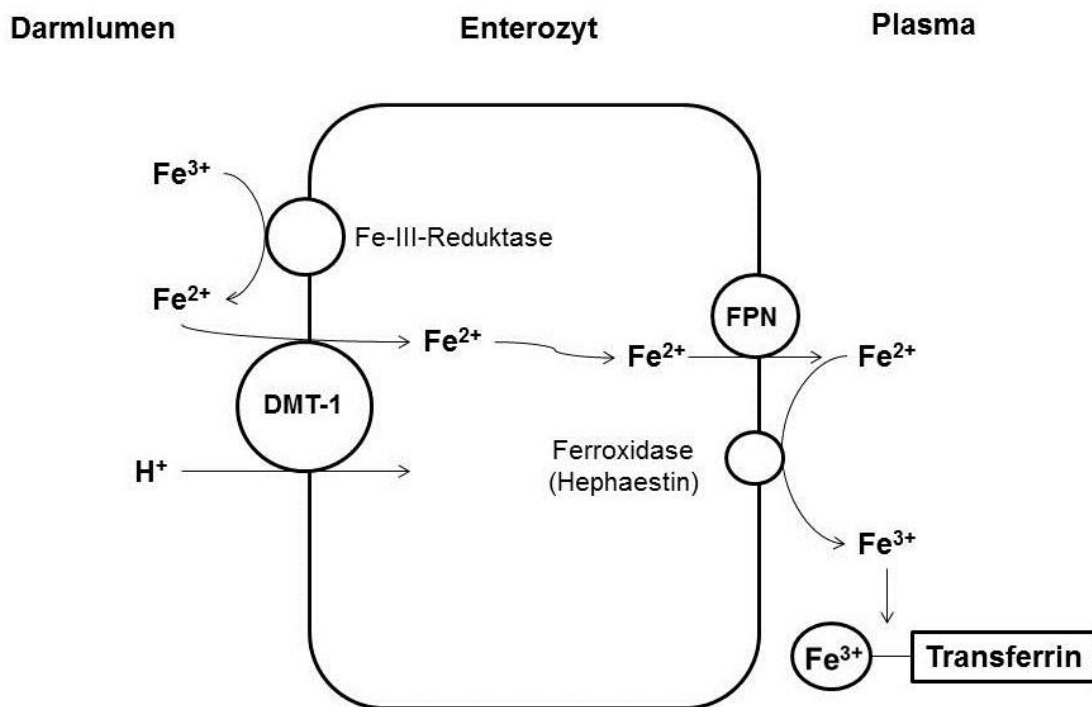


Abb. 1: Die Eisenaufnahme in einem duodenalen Enterozyt
 Das mit der Nahrung in das Duodenum gelangte Eisen (Fe) ist 3-fach positiv (Fe^{3+}) geladen. Um in den Enterozyten aufgenommen zu werden, muss es mittels Fe-III-Reduktase in die zweiwertige Form (Fe^{2+}) überführt werden. Nun kann es mit Hilfe des „divalent metal transporter 1“ (DMT-1) durch einen Co-Transport mit Wasserstoff-Ionen (H^+) in den Enterozyten importiert werden. Aus der Zelle ins Plasma gelangt das Eisen mit Hilfe des einzigen bekannten zellulären Eisenexporters Ferroportin (Fpn). Im Plasma wird Eisen an Transferrin gebunden transportiert. Um dies zu ermöglichen muss es jedoch wieder in die dreiwertige Form mit Hilfe der Ferrooxidase Hephaestin überführt werden. Orientiert an Collard et al. (2009) (zusammengefasst von [7]).

Die Makrophagen gelangen indirekt an das Eisen, indem sie alternde Erythrozyten phagozytieren, lysieren und das Eisen aus deren Hämoglobin gewinnen [8]. Normalerweise zirkuliert extrazelluläres Eisen im Plasma an Transferrin gebunden und ist in dieser Form nicht reaktiv (zusammengefasst von [2]). Hepatozyten, Plazentazellen und die meisten anderen Zellen erhalten das Eisen Transferrin-gebunden über Transferrinrezeptoren (TfR) [9, 10]. Um an Transferrin gebunden zu werden, muss das Eisen in die dreiwertige Form mittels einer Ferrooxidase, welche an Ferroportin (Fpn) gebunden ist, überführt werden (siehe Abb. 1) [11-14]. In duodenalen Zellen ist dies Hephaestin und in nicht intestinalen Zellen Ceruloplasmin [11, 12]. Ferroportin ist der einzige bekannte zelluläre Eisenexporter, über ihn geben die verschiedenen Zelltypen das Eisen in das Plasma ab [11, 15-17]. Ist dieser Eisenexporter in großer Zahl vorhanden, kann

viel Eisen aus der Nahrung aufgenommen werden, da es direkt weiter ins Plasma transportiert wird [17]. Bei einer geringeren Ferroportinkonzentration an der basolateralen Membran der Enterozyten wird dagegen weniger Eisen über den Darm aufgenommen [17].

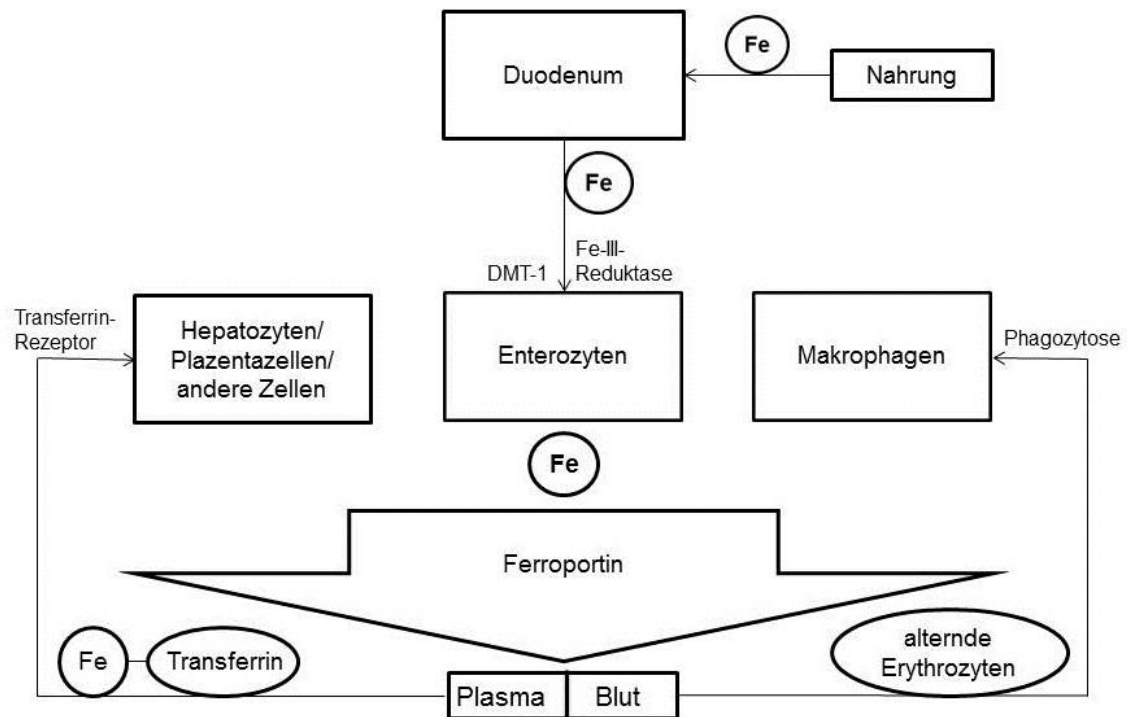


Abb. 2: Übersicht über Eisenaufnahme und -Abgabe verschiedener Zellen
 Ein Teil des benötigten Eisens (Fe) gelangt über die Nahrung in das Duodenum. Dort wird es mit Hilfe der Fe-III-Reduktase und des „divalent metal transporter 1“ (DMT-1) in den Enterozyten aufgenommen. Von hier gelangt es über Ferroportin in das Blutplasma. Auch Makrophagen geben ihr gewonnenes Eisen über Ferroportin an das Plasma ab. Sie erhalten das Eisen über Phagozytose und Abbau von alternden Erythrozyten. Im Blut wird Eisen an Transferrin gebunden transportiert. Über Transferrin-Rezeptoren wird es z.B. in Hepatozyten oder Plazentazellen aufgenommen und gespeichert. Bei Bedarf wird das Eisen ebenfalls über Ferroportin an das Plasma abgegeben.

1.3. Eisenhaushalt bei Früh- und Reifgeborenen

1.3.1. *Blutbildung*

In den ersten Monaten der Fetalperiode findet die Blutbildung noch nicht im Knochenmark, sondern hauptsächlich in der Leber statt [18]. Erst ab ca. der 20. Schwangerschaftswoche (SSW) beginnt die Blutbildung im Knochenmark, welches ab dem letzten Trimenon zum Hauptbildungsort wird [18]. In der fetalen Leber wird vor allem fetales Hämoglobin (HbF) gebildet, welches aus 2 α - und 2

γ -Ketten besteht [18]. Neugeborene (NG) weisen noch 60-90% fetales Hämoglobin auf [18]. Das restliche Hämoglobin besteht aus adultem Hämoglobin (HbA), welches meistens aus 2 α - und 2 β -Ketten besteht (HbA₁) [18, 19].

1.3.2. Neonatale Eisenaufnahme

Intrauterin erfolgt der transplazentare Eisentransfer von der Mutter auf das Kind besonders im letzten Trimenon der Schwangerschaft [9, 20]. Dies ist wichtig, da Kinder anfangs noch nicht in der Lage sind genügend Eisen aus der Nahrung aufzunehmen, da Muttermilch nur sehr wenig Eisen enthält [21]. In den ersten Lebenswochen werden die zahlreichen alternden Erythrozyten abgebaut und das daraus gewonnene Eisen gespeichert, woraus anfänglich ein großer Eisenspeicher entsteht, der den postnatalen Bedarf decken kann [22].

Leong et al. zeigten 2003 in einer Tierstudie, dass neugeborene Ratten anfangs eine geringe Menge an DMT-1 und Ferroportin vorweisen und die Expression dieser beiden Transporter unabhängig vom Eisenbedarf wie auch von der Eisenzufuhr ist [23]. Im Laufe der ersten Lebenswochen ändert sich allerdings die Expression von DMT-1 und Ferroportin abhängig vom Eisenbedarf [23]. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass neugeborene Ratten anfangs nicht nur ein geringes Angebot an Eisen durch die Muttermilch bekommen, sondern auch noch nicht in der Lage sind viel Eisen über den Darm aufzunehmen. Dies ändert sich jedoch in den ersten Lebenswochen.

1.3.3. Einflussfaktoren auf die fetalen Eisenspeicher

Es gibt viele Faktoren, die den Eisenhaushalt eines Neugeborenen beeinflussen.

Den größten Einfluss auf den Eisenspeicher hat der Geburtszeitpunkt. Da normalerweise das meiste Eisen im letzten Trimenon von der Mutter auf das Kind übergeht, wird dieser Transfer durch die Frühgeburtlichkeit unterbrochen [9, 20]. Je früher das Kind zur Welt kommt, desto kleiner ist der Eisenspeicher [24].

Ein weiterer nicht zu vernachlässigender Einflussfaktor ist das Geburtsgewicht. Neugeborene, die mit einem Geburtsgewicht kleiner der dritten Perzentile gebo-

ren werden, bezeichnet man als hypotroph. Die Hypotrophie eines Fetus entsteht in erster Linie durch eine unzureichende Versorgung über die Plazenta, zum Beispiel im Rahmen einer chronischen Plazentainsuffizienz [25]. Hypotrophe Feten haben aufgrund einer schlechteren placentaren Versorgung nicht nur ein geringes Geburtsgewicht, sondern auch kleinere Eisenspeicher als eutrophe Feten [26-28].

Auch Kinder diabetischer Mütter haben geringere Eisenspeicher [26, 29]. Als Ursache hierfür sind mehrere Dinge zu nennen. Unkontrollierter maternale Hyperglykämien können intrauterin zu einer vermehrten Adipogenese des Fetus und somit zu einer Makrosomie führen [30, 31]. Das vermehrte Wachstum geht wiederum mit einem erhöhten Bedarf an Eisen einher. Zusätzlich haben Mütter mit schlecht eingestelltem Diabetes aufgrund von Glykogenablagerungen in den Gefäßen meist eine Plazentainsuffizienz, die zu einer chronischen Hypoxie des Feten führen kann [30, 32]. Um den Sauerstoffbedarf zu decken, steigt die fetale Erythropoetinproduktion und somit die Erythropoese und bei einer gesteigerten Blutbildung wird auch vermehrt Eisen benötigt [29, 33]. Dieser Bedarf kann jedoch von der Plazenta nicht gedeckt werden, weshalb der Körper auf das gespeicherte Eisen zurückgreift [29]. Dies führt wiederum zu geringeren Eisenspeichern bei Neugeborenen diabetischer Mütter [29].

1.3.4. Folgen eines Ungleichgewichts im Eisenhaushalt

Aufgrund des schnellen Wachstums und der Differenzierung wird vor allem in der späten Fetal- und frühen Neonatalperiode viel Eisen benötigt (zusammengefasst von [7]). Ist in dieser Zeit das Eisengleichgewicht gestört, kann dies zu einer Entwicklungsstörung führen, denn besonders das Nervensystem scheint empfindlich auf Eisenmangel oder -überschuss zu reagieren [34, 35]. Lozoff et al. konnte zeigen, dass Kinder, die schon im Säuglingsalter an einem Eisenmangel leiden, eine schlechtere geistige und motorische Entwicklung aufweisen und dass sich dieser Entwicklungsrückschritt, trotz Therapie des Eisenmangels, noch mit 5 Jahren nachweisen lässt [36, 37].

Eine frühe Eisensupplementierung von Frühgeborenen scheint keinen negativen, sondern einen positiven Effekt auf das spätere neurologische Outcome zu haben [38].

Nicht nur ein Eisenmangel, sondern auch ein Eisenüberschuss kann Probleme für das sich entwickelnde Gehirn darstellen. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass ein Eisenüberschuss durch Anhäufung in den Basalganglien zu motorischen, Parkinson-ähnlichen Auffälligkeiten führen kann [34].

Dies lässt darauf schließen, dass ein ausgeglichener Eisenhaushalt in den ersten Lebensmonaten vor allem bei Frühgeborenen von großer Bedeutung ist. Um dies zu gewährleisten ist es wichtig, mehr Erkenntnisse über den Eisenhaushalt bei Früh- und Reifgeborenen zu gewinnen.

1.3.5. Frühgeborenenanämie und Prävention

Frühgeborene haben im Vergleich zu Reifgeborenen aufgrund geringeren Eisenspeichern bei Geburt, schnellerem postnatalen Wachstum und zusätzlichem iatrogenen Blutverlust ein deutlich erhöhtes Risiko eine Eisenmangelanämie zu entwickeln [24, 27, 28, 39].

Um einer Frühgeborenenanämie vorzubeugen und eventuell auch längerfristige Konsequenzen auf die neurologische Entwicklung zu verhindern sollten alle Frühgeborenen eine frühe enterale Eisensupplementierung erhalten [38, 40]. Aktuell werden 2-4 mg/kg Körpergewicht empfohlen [24, 41]. Da der Eisenbedarf, der Eisenverlust wie auch die enterale Eisenaufnahme aus dem Darm bei Frühgeborenen individuell sehr verschieden sind, wäre es sinnvoll, den individuellen Eisenstatus zu bestimmen und anhand dessen eine Eisensupplementierung vorzunehmen. Aktuell führt allerdings die Bestimmung der bisher verwendeten Eisenstatusparameter wie z.B. Ferritin und Transferrinsättigung aufgrund der Blutentnahmen zu einem zusätzlichen Eisenverlust, was wiederum eine Anämie begünstigt. Eine Alternative hierzu stellt Hcpidin dar, ein recht neuer Eisenstoffwechselformparameter, der nicht-invasiv im Urin bestimmt werden kann [42].

1.4. Hepcidin

Das 25 Aminosäuren (AS) lange Peptidhormon Hepcidin wurde 2000 erstmals im Blut und 2001 erstmals im Urin nachgewiesen [42, 43]. Es wird in der Leber produziert, hat eine antimikrobielle Wirkung und ist der wichtigste Regulator für die Eisen-Homöostase [1, 43]. Park et al. setzten 2001 den Namen Hepcidin aus seinen bis dahin bekannten Eigenschaften „hepatic“ und „antibactericidal“ zusammen [42]. Weitere Untersuchungen an Mausmodellen zeigten jedoch, dass die antimikrobielle Funktion in vivo vernachlässigbar klein ist (zusammengefasst von [44]). Während im Blut vor allem die Vorstufen sowie das bioaktive 25-AS lange Hepcidin vorkommen, konnten im Urin auch kürzere Formen (20- und 22-AS Hepcidin), nachgewiesen werden [42]. Diese haben eine geringere Aktivität bezogen auf die Regulation des Eisenhaushalts und sind am N-terminalen Ende gekürzt, was darauf schließen lässt, dass dieses Ende einen bedeutenden Einfluss auf die Eisenregulation hat und vermutlich die Bindungsstelle an Ferroportin darstellt [45].

1.4.1. Struktur und Stoffwechsel von Hepcidin

Auf Chromosom 19 des menschlichen Genoms befindet sich das Hepcidin-Gen [42]. Es besteht aus drei Exons und zwei Introns [42]. Das Hepcidinmolekül, welches dem dritten Exon entspricht, besteht aus 25 AS, darunter acht Cysteinmoleküle, die untereinander vier Disulfidbrücken bilden [42]. Diese Disulfidbrücken führen zu einer Schlaufenbildung in der Mitte des Peptids und zu einer antiparallelen β -Faltblattstruktur mit einer konvexen und konkaven Oberfläche auf jeder Seite [42, 46]. Während die konvexe Seite einen hydrophoben Charakter aufweist, ist die konkave Seite hydrophil [46]. Diese Eigenschaften machen das Peptid ambiphil, typisch für antimikrobielle und fungizide Moleküle [46]. Im neutralen Milieu ist es dreifach positiv geladen [42].

Hepcidin wird hauptsächlich in der Leber, in geringen Mengen aber auch in anderen Geweben wie Makrophagen, Adipozyten oder im Gehirn gebildet [47]. Das aus den drei Exons des Gens entstehende Prä-Pro-Hepcidin ist 84 AS lang und beinhaltet eine N-terminale 24-AS lange Signalsequenz für das endoplas-

matische Retikulum (zusammengefasst von [44]). Dort entsteht nach Abspaltung dieser Sequenz das Pro-Hepcidin, welches 60 AS lang ist (zusammengefasst von [44]). Dieses Propeptid enthält wiederum eine Spaltfläche für Furin und einige andere Proprotein-Convertasen der Furin-Familie [48]. Die Spaltung erfolgt im Golgi-Apparat und es entsteht dabei das endgültige 25-AS lange Peptidhormon Hepcidin (zusammengefasst von [44]).

Die Ausscheidung von Hepcidin erfolgt über die Niere [49]. 2008 konnten Ganz et al. und 2012 Müller et al. zeigen, dass eine Korrelation zwischen Serum-Hepcidin und Hepcidin im Urin erkennbar ist [49, 50].

Die Ergebnisse einer Pilot-Studie deuten darauf hin, dass Hepcidin glomerulär filtriert und im proximalen Tubulus durch Megalin-vermittelte Endozytose resorbiert wird [51]. Diese Ergebnisse konnten bisher allerdings noch nicht histopathologisch bestätigt werden.

1.4.2. Wirkung von Hepcidin auf den Eisenhaushalt

Hepcidin kontrolliert die Eisenkonzentration im Plasma und die Eisenverteilung im Gewebe, indem es an Ferroportin, den einzigen bekannten zellulären Eisen-transporter, bindet. Dadurch wird Ferroportin in Lysosomen abgebaut und steht somit für die Eisenausschleusung aus der Zelle nicht mehr zur Verfügung [52]. Wird Hepcidin überexprimiert, wird weniger Eisen aus der Zelle ausgeschleust, was zu einem Mangel an Eisen und im Verlauf zu einer Eisenmangel-Anämie führt (zusammengefasst von [44]).

Im Gegensatz dazu führt ein Hepcidin-Mangel zu einer erhöhten Eisenkonzentration im Plasma und somit zu Eisenablagerungen in der Leber und anderen Geweben (zusammengefasst von [44]). Der Mangel an Hepcidin scheint daher auch die Ursache für einige Formen der Hämochromatose (HFE Hämochromatose, Juvenile Hämochromatose) zu sein [49, 53]. Dementsprechend wurden Mutationen im Hepcidin-Gen bei Patienten mit juveniler Hämochromatose gefunden [54].

1.4.3. Regulation von Hepcidin

Anämie, Hypoxie, Erythropoese, Entzündung und die Serum-Fe-Konzentration haben einen Einfluss auf die Hepcidin-Expression, wie verschiedene Studien im Mausmodell zeigen konnten [47, 55, 56] (siehe Abb. 3). Bei hoher Eisenbelastung sowie bei Infektion und Inflammation wird die Synthese von Hepcidin erhöht [49].

Induziert wird die Hepcidin-Expression im Falle einer Entzündung durch den STAT3-Signalweg [56]. Das bei einer Infektion ausgeschüttete IL-6 führt in den Hepatozyten zur Phosphorylierung von STAT3, welches anschließend an eine Regulationseinheit im Bereich des Hepcidin-Promotors binden und diesen aktivieren kann [56]. Dies ist besonders bei Infektionen und chronisch entzündlichen Erkrankungen von Bedeutung, da hierdurch die Konzentration des Eisens im Serum erniedrigt wird, was zu einer Anämie chronischer Erkrankungen führen kann [49]. Diese Reaktion ist vermutlich ein Verteidigungsmechanismus des Körpers, da somit die Verfügbarkeit von Eisen für die eindringenden Mikroorganismen gesenkt wird [57]. Der zelluläre Eisenmangel stoppt das Bakterienwachstum und kann zum Zelltod führen [2, 57].

Im Falle der Hepcidin-Regulation durch Eisen gelingt dies über die Eisenbedingte Aktivierung von SMAD 4, welches wiederum die Hepcidin-Expression aktiviert [56]. Durch diese Aktivierung wird die weitere Abgabe von Eisen an das Plasma verhindert und somit das Fortschreiten der Eisenüberladung verhindert.

Bei einer Anämie und Hypoxie wird die Hepcidinsynthese reduziert und vermehrt Eisen über Ferroportin an das Plasma abgegeben [55]. Dieses erhöhte Angebot an Eisen wird für die gesteigerte Erythropoese unter Anämie- wie auch Hypoxiebedingungen benötigt. Dies ist wichtig um mehr Sauerstoff aufnehmen und transportieren zu können. Für die Regulation der Hepcidinsynthese scheinen in diesem Zusammenhang die Faktoren Hypoxie-induzierter Transkriptionsfaktor (HIF) und Erythropoetin (EPO) wichtig zu sein [58, 59]. Eine Hypoxie-induzierter Transkriptionsfaktor-vermittelte Unterdrückung der Hepcidinsynthese benötigt eine Erythropoetininduktion, welche wiederum assoziiert ist mit einer

erhöhten erythropoetischen Aktivität [58, 59]. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht abschließend geklärt.

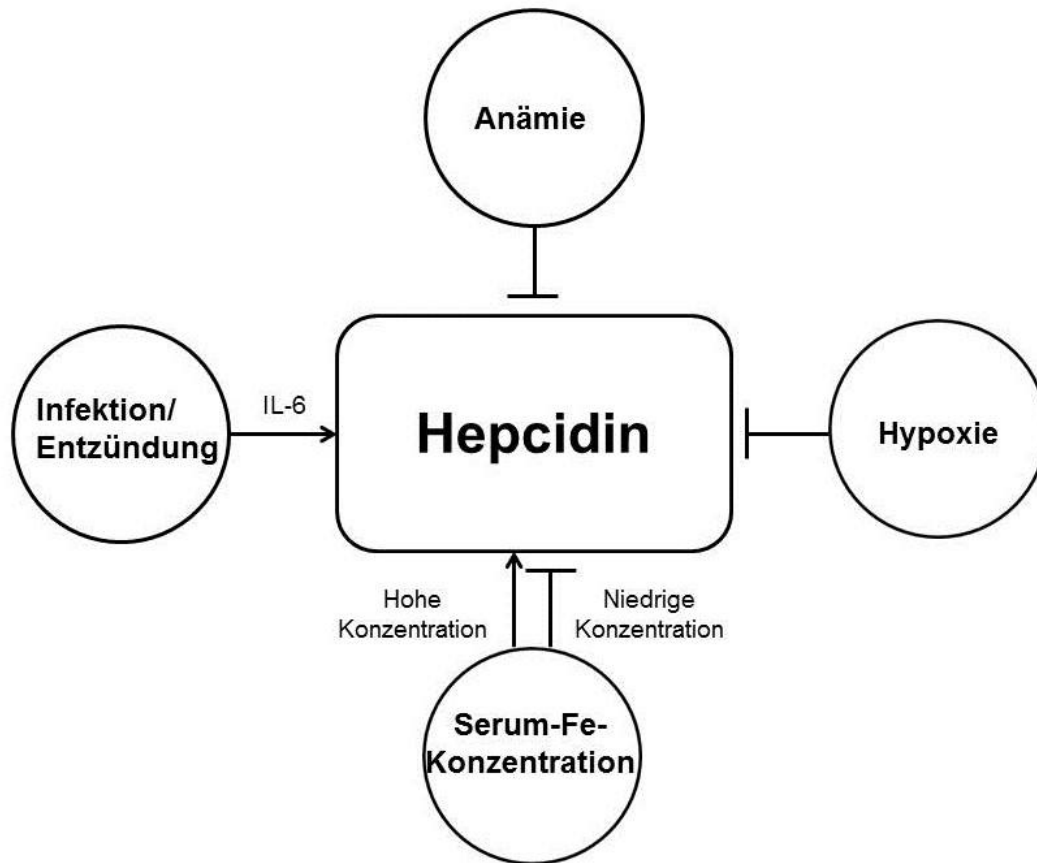


Abb. 3: Regulation von Hepcidin

Es gibt verschiedene Faktoren, die die Konzentration von Hepcidin beeinflussen. Anämie, Hypoxie und eine niedrige Serum-Eisen(Fe)-Konzentration hemmen die Hepcidinsynthese, somit kann mehr Eisen aufgenommen werden. Eine hohe Serum-Fe-Konzentration wiederum führt zu einer erniedrigten Hepcidinkonzentration, um eine weitere Eisenaufnahme zu verhindern. Außerdem wird die Hepcidin-Expression und somit die Eisenaufnahme durch eine Infektion vermindert. Dies läuft Interleukin-6 (IL-6) vermittelt ab.

Orientiert an Huang et al. (2009) [56]

1.4.4. Fetales Hepcidin reguliert den plazentaren Eisentransfer

Wie Donovan et al. (2005) am Mausmodell zeigen konnten, scheint Ferroportin bereits intrauterin Eisen aus der Zelle auszuschleusen [17]. Die Inaktivierung von Ferroportin in Mausembryonen führte zu einer Eisenablagerung in Enterozyten, Makrophagen und Hepatozyten und zum Tod der Embryonen [17].

Bastin et al. (2006) konnten in einer Untersuchung von menschlichen Plazenten Ferroportin lokalisieren [60]. Während sich der Transferrinrezeptor an der apika-

len Seite der Zellen des Synzytiotrophoblasten befindet und somit dem mütterlichen Kreislauf zugewandt ist, sitzt Ferroportin an der basolateralen, fetalen Seite [60]. Dies lässt darauf schließen, dass das Eisen über den maternalen Kreislauf zur Plazenta gelangt, dort über den Transferrinrezeptor aufgenommen wird und über Ferroportin in den fetalen Kreislauf abgegeben wird [60]. Auch Hepcidin konnte in diesem Zusammenhang an der basolateralen Seite, immer co-lokalisiert zu Ferroportin, nachgewiesen werden [60].

In einer Studie von Rehu et al. (2010) wurde der Zusammenhang des fetalen und maternalen Eisenhaushalts mit der Hepcidinkonzentration in mütterlichem- und Nabelschnurblut untersucht [61].

Die Ergebnisse dieser beiden Studie lassen vermuten, dass der Eisentransfer von Mutter zu Kind über die Plazenta durch das fetale Hepcidin reguliert wird [61]. Dies konnte bisher jedoch noch nicht abschließend bewiesen werden.

1.4.5. Hepcidin bei Früh- und Reifgeborenen

Erste Daten aus unserer Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass Hepcidin auch bei Frühgeborenen den Eisenstoffwechsel regulieren könnte und mit etablierten Parametern zur Evaluierung des Eisenstoffwechsels wie z.B. Ferritin korreliert [50]. Daher stellt sich die Frage, ob diese Regulation bereits intrauterin stattfindet und ob die fetale Hepcidinkonzentration abhängig vom Gestationsalter und anderen intrauterinen wie auch peripartalen Faktoren ist, wie es zumindest auf mütterlicher Seite zu sein scheint [61]. Da es hierzu aktuell keine Daten gibt, war das Ziel dieser Studie die Nabelschnurkonzentration von Hepcidin bei Früh- und Reifgeborenen verschiedenen Gestationsalters zu bestimmen.

2. Methoden

2.1. Studiengenehmigung durch die Ethikkommission

Am 25. Oktober 2011 wurde das Studienprotokoll durch die Ethikkommission der Universität Tübingen genehmigt. (Projekt-Nummer: 486/2011B01)

Voraussetzung für die Studienteilnahme war das Vorliegen einer schriftlichen Einwilligungserklärung der Eltern.

2.2. Studienfinanzierung

Der AKF-Antrag (Förderprogramm der Medizinischen Fakultät Tübingen zur Angewandten Klinischen Forschung) wurde am 21.03.2012 über eine Laufzeit von einem Jahr genehmigt. (Antrags-Nr. 283-0-0)

2.3. Studiendesign

Bei der vorliegenden Pilot-Studie handelte es sich um eine prospektive Beobachtungsstudie über die Dauer von 1,5 Jahren.

2.4. Studienpopulation

Willkürlich wurde vor Studienbeginn beschlossen, dass insgesamt wenn möglich Nabelschnurblut von der unten aufgeführten Studienpopulation untersucht werden sollte:

80 Reifgeborene (RG):

- 20 eutrophe RG
(alle der folgenden Kriterien sollten erfüllt sein: 10. - 90. Perzentile, Nabelarterien-pH (NA-pH) > 7,3, Interleukin 6 (IL-6) < 25 pg/ml, C-reaktives Protein (CRP) < 0,5 mg/dl, keine anamnestischer Hinweis auf ein Amnioninfektionssyndrom (AIS), kein (Gestations-)Diabetes)
 - 10 RG, die durch einen primären Kaiserschnitt zur Welt gekommen sind
 - 5 RG aus der 37 0/7 - 39 0/7 SSW
 - 5 RG aus der 40 0/7 - 42 0/7 SSW
 - 10 RG, die spontan, vaginal entbunden wurden
 - 5 RG aus der 37 0/7 - 39 0/7 SSW
 - 5 RG aus der 40 0/7 - 42 0/7 SSW

- 20 hypotrophe RG (< 3. Perzentile)
 - 10 hypotrophe RG, die durch einen primären Kaiserschnitt zur Welt gekommen sind
 - 5 RG aus der 37 0/7 - 39 0/7 SSW
 - 5 RG aus der 40 0/7 - 42 0/7 SSW
 - 10 hypotrophe RG, die spontan, vaginal entbunden wurden
 - 5 RG aus der 37 0/7 - 39 0/7 SSW
 - 5 RG aus der 40 0/7 - 42 0/7 SSW
- 10 eutrophe RG mit einer systemischen Entzündungsreaktion (IL-6 > 100 pg/ml oder CRP > 1 mg/dl)
- 10 eutrophe RG mit Hinweis auf AIS der Mutter (Leukozyten > 15000/µl oder CRP > 1 mg/dl und mindestens einem klinischen Zeichen (Temperatur > 38°C, fötides Fruchtwasser, CTG > 160/min, vorzeitiger Blasensprung (VBS) > 18h))
- 10 eutrophe RG mit Gestationsdiabetes mellitus der Mutter
- 10 eutrophe RG mit perinataler Azidose (NA-pH < 7,15)

80 Frühgeborene (FG):

- 20 FG aus der 23 0/7 - 26 0/7 SSW
- 20 FG aus der 27 0/7 - 30 0/7 SSW
- 20 FG aus der 31 0/7 - 33 0/7 SSW
- 20 FG aus der 34 0/7 - 36 0/7 SSW

2.5. Einschlusskriterien

Für die Studienteilnehmer galten folgende Einschlusskriterien:

- Früh- und Reifgeborene aus 23+0/7 bis 42+0/7 Schwangerschaftswochen, die in der Universitätsklinik Tübingen geboren wurden
- Vorliegendes schriftliches Einverständnis der Eltern

2.6. Ausschlusskriterien

Es galten folgende Ausschlusskriterien für die Studienteilnehmer:

- angeborene Fehlbildungen oder syndromale Erkrankungen

- Fehlendes Einverständnis der Eltern

2.7. Fallzahl / Poweranalyse

Über die Nabelschnur-Hepcidin-Konzentration bei Frühgeborenen gab es keine Daten, an denen sich eine Poweranalyse hätte orientieren können. Es war jedoch bekannt, dass innerhalb eines Jahres in der Universitäts-Frauenklinik Tübingen ca. 2700 Früh- und Reifgeborene zur Welt kommen, sodass davon auszugehen war, dass die gewünschte Patientenzahl von 80 Reifgeborene mit den oben genannten Risikokonstellationen, wie auch 80 Frühgeborene verschiedenen Gestationsalters innerhalb von 1-2 Jahren erreicht werden konnte. Pro Fragestellung bzw. Variablen sollten wenn möglich jeweils mindestens 20 Nabelschnurproben untersucht werden. Bei diesem Stichprobenumfang lässt sich eine Differenz im Mittelwert von etwa einer Standardabweichung mit einer Power von 90% nachweisen.

2.8. Rekrutierung

In der Universitäts-Frauenklinik war es zum Zeitpunkt der Untersuchung etablierte Praxis, die Frauen im Kreissaal pränatal mündlich sowie schriftlich über eine Reihe von Studien, die Nabelschnurblut als Untersuchungsmaterial benötigen, durch den Kreißsaalarzt aufzuklären. Bei vorliegendem Einverständnis der Mutter wurde das Blut postnatal durch die Hebamme aus der Nabelschnur entnommen und durch die medizinische Doktorandin asserviert und weiterverarbeitet. Die Einverständniserklärung aus der Akte der Mutter wurde kopiert und zusammen mit den erhobenen Daten in einem Ordner im Büro des Versuchsleiters aufbewahrt.

2.9. Datenerfassung der Studienteilnehmer

Um den Datenschutz zu gewährleisten wurde jedes Früh- und Reifgeborene mit Hilfe einer Studiennummer pseudonymisiert. In einem Erhebungsbogen wurden folgende Daten erfasst:

- klinische Daten

- Geburtsgewicht mit der dazugehörigen Perzentile und dem Standard Deviation Score (SDS)
- Gestationsalter
- Nabelschnurarterien-pH (NA-pH)
- Zeit zwischen Blasensprung und Geburt
- Geburtsmodus
- Nachweis eines Gestationsdiabetes mellitus bei der Mutter
- Nachweis von Gruppe B-Streptokokken im Vaginalabstrich der Mutter
- Anamnestische Faktoren, die auf ein AIS hinweisen könnten
- Gewicht, Größe, Temperatur, CRP und Leukozyten der Mutter
- Zeit zwischen Blutgewinnung und Verarbeitung

Um das Geburtsgewicht und damit die intrauterine Versorgung der Probanden unabhängig vom Gestationsalter bei Geburt als in der Regel normal verteilten Parameter darstellen und vergleichen zu können wurde der Z-Score oder Standard Deviation Score (SDS) des Gewichts bei Geburt mit Hilfe des Microsoft Excel Add-ins LMSGrowth (version 2.14; www.healthforallchildren.co.uk) errechnet. Die Berechnung basiert auf der britischen Referenzpopulation von 1990, die anhand der Methode „maximum penalized likelihood“ adaptiert wurde. [62, 63]

- Laborwerte im Nabelschnurblut
 - Blutbild mit Hämoglobin (Hb) und Hämatokrit (Hkt)
 - Erythrozytenindices: mittleres korpuskuläres Volumen (MCV), mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt (MCH), mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration (MCHC), Erythrozytenzahl
 - Retikulozyten
 - Retikulozyten-Hämoglobin
 - CRP
 - Interleukin 6 (IL-6)
 - Ferritin
 - Hepcidin

2.10. Studienablauf und Untersuchungsmethoden

2.10.1. *Studienbedingte Untersuchungen*

Zusätzliche klinische Untersuchungen des Kindes waren nicht erforderlich. Aus der Patientenakte der Mutter und des Kindes wurden klinische Daten, wie z.B. ein vorzeitiger Blasensprung (>18h) sowie mütterliche oder kindliche erhöhte Infektparameter (IL-6 und/oder CRP), die einen anamnestische Hinweise auf ein AIS und eine neonatale Inflammationsreaktion geben könnten, erfasst. Die Studienteilnahme hatte weder auf die Mutter noch auf das Kind Auswirkungen, da das Nabelschnurblut andernfalls mit der Plazenta verworfen worden wäre.

2.10.2. *Studienbedingte Untersuchungen von Blut*

Unmittelbar nach dem Abnabeln wurde aus der Nabelvene und/oder der Nabelarterie der Plazenta Nabelschnurblut entnommen und in einem EDTA-Röhrchen aufbewahrt. Das Abnabeln erfolgte zum Zeitpunkt der Untersuchung bei Frühgeborenen < 32. SSW verzögert, das heißt das entwickelte Kind wurde ca. 45 Sekunden unter das Plazentaniveau gehalten und erst dann wurde die Nabelschnur abgeklemmt.

Das EDTA-Blut wurde so schnell wie möglich, jedoch nach einer maximalen Aufbewahrungszeit von 24h bei 4°C im Kühlschrank, folgendermaßen weiterverarbeitet und untersucht (siehe Abb. 4):

Mindestens 0,3 ml EDTA-Blut wurde zur Bestimmung von Blutbild, Erythrozytenindices, Retikulozyten und Retikulozyten-Hämoglobin vom hämatologischen Labor der Universitäts-Kinderklinik Tübingen innerhalb der ersten 16 Stunden postnatal untersucht. Dazu wurde das Gerät ADVIA 120 (Siemens, München, Deutschland) verwendet. Da bei Frühgeborenen in der Regel nur wenig Nabelschnurblut zu gewinnen ist, wurde auf die Bestimmung des Retikulozyten-Hämoglobins verzichtet und die Bestimmung des Blutbilds, der Erythrozytenindices und der Retikulozyten erfolgte im Rahmen der klinischen Routine durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums Tübingen mittels Sysmex XE-2100 (Sysmex GmbH, Norderstedt, Deutschland). Auf Grund eines Gerätedefektes wurde im Dezember 2012 der alte Sysmex XE-2100 durch einen neuen ersetzt. Es handelte sich dabei um dasselbe Modell mit den exakt gleichen Referenz-

werten und internen Kalibrationskurven. Daher kann man davon ausgehen, dass die gemessenen Werte in ihren absoluten Zahlen genauso im alten Gerät bestimmt worden wären. Das neue Gerät konnte nun allerdings auch das Retikulozyten-Hämoglobin mitbestimmen.

1 ml EDTA-Nabelschnurblut wurde im Labor der Neonatologischen Intensivstation bei 3500 UpM, 8 Minuten lang zentrifugiert (Zentrifuge: Biofuge fresco, Heraeus, (Osterode, Deutschland) und der Überstand in zwei Aliquots aufgeteilt und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei -33°C bis zur Analyse tiefgefroren.

Nachdem alle Proben gesammelt waren, wurde aus Aliquot 1 (mindestens 0,3 ml) Ferritin mittels ADVIA Centaur (Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Deutschland), high sensitivity CRP mittels ADVIA 1800 (Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Deutschland) und IL-6 mit Hilfe des Immulite 2000 xpi (Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Deutschland) im Zentrallabor bestimmt. Proben mit geringem Plasmavolumen (< 300 µl) mussten für die Messung verdünnt werden.

Aus Aliquot 2 (mindestens 0,1 ml) wurde Hep_(CB) bestimmt. Hierzu wurde Aliquot 2 tiefgefroren auf 10 kg Trockeneis nach LaJolla (Kalifornien, USA) zu Intrinsic LifeScience LLC mittels FedEx versandt. Dort erfolgte die Messung mit Hilfe eines durch Bioassay validierten kompetitiven enzyme linked immunosorbent assay (c-ELISA).

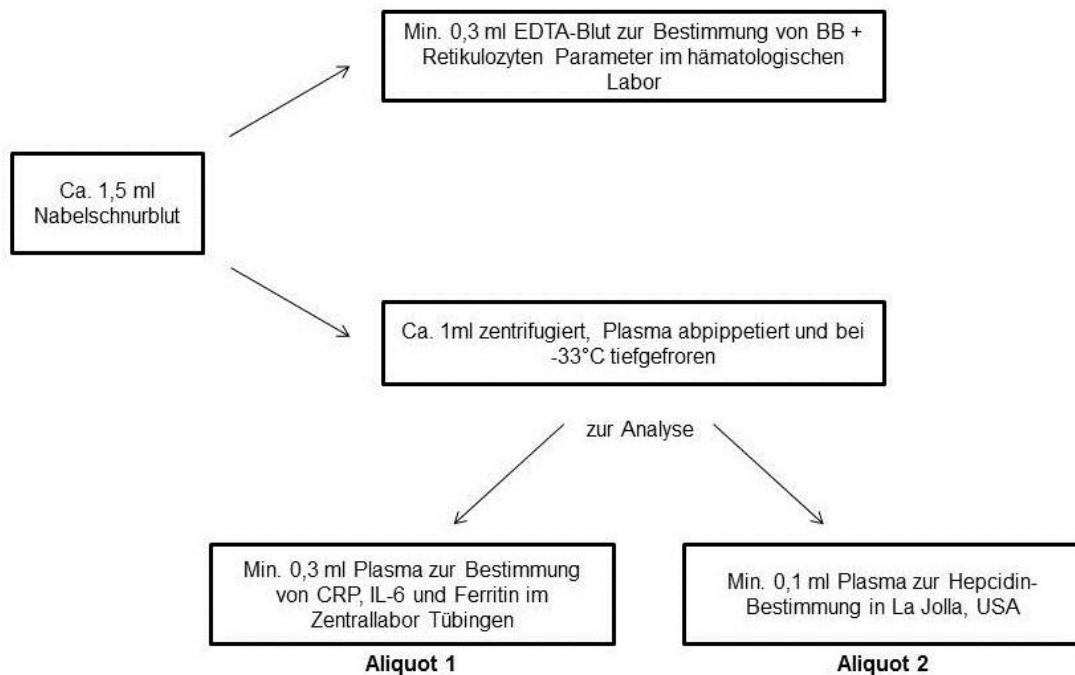


Abb. 4: Probenverarbeitung

Die Messung des Hepcidins mittels c-ELISA wurde folgendermaßen durchgeführt [49]:

Eine Mikropplatte wurde mit den Hepcidin-Antikörpern bepflanzt und mit 100µl Plasma inkubiert. Als Indikator diente Biotin-versetztes Hepcidin-25 (Intrinsic LifeSciences, LaJolla, CA). Die Standardkurven wurden durch mehrfache Verdünnung von synthetischem Hepcidin (Bachem Biosciences, King of Prussia, PA) erstellt. Es wurde ein Variationskoeffizient (CV) verwendet um die Genauigkeit des Tests zu zeigen. Ein niedriger CV bedeutet höhere Genauigkeit. An den Enden der Standardkurve ist der CV hoch, in der Mitte niedrig.

2.11. Statistische Auswertung

2.11.1. *Univariate Auswertung*

Alle Variablen wurden als Median und Interquartilenabstand (IQR) dargestellt. Werte unterhalb der Nachweisgrenze wurden dem Wert Null gleichgesetzt. Mittels des Shapiro-Wilk-W-Tests wurde überprüft, ob die Messwerte normalverteilt sind. Da weder die Originalmesswerte noch die logarithmierten Messwerte normal verteilt waren, wurden nicht parametrische statistische Tests zur weite-

ren Analyse benutzt. Zum Vergleich der $\text{Hep}_{(\text{CB})}$ in verschiedenen Patienten-Subpopulationen wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet. Mit Hilfe des Spearman Korrelationskoeffizienten konnte der Zusammenhang zwischen zwei stetigen Variablen beschrieben werden. Als statistisch signifikant galt ein p-Wert $<0,05$. Alle Berechnung wurden mit JMP 9.0.0 (SAS Institute, Cary, NC (USA)) durchgeführt.

2.11.2. Multivariate Auswertung

Um den Einfluss einiger Variablen auf die $\text{Hep}_{(\text{CB})}$ und deren Wechselwirkungen untereinander genauer zu überprüfen, wurde eine multivariate Auswertung durchgeführt. Diese erfolgte als multiple logistische Regressionsanalyse. Hierfür wurden die Kinder in Gruppen eingeteilt und die entsprechenden Variablen Gestationsalter, Z-Score, Ferritin, Geburtsmodus und Hcpidin wie folgt dichotomisiert:

- Gestationsalter: 0 = 24 + 0 bis 26 + 6
 1 = 37 + 0 bis 41 + 6
- Z-Score: 0 = < -2
 1 = ≥ -2
- Ferritin: 0 = $< 60 \mu\text{g/l}$
 1 = $\geq 60 \mu\text{g/l}$ [64]
- Geburtsmodus: 0 = primäre Sectio
 1 = vaginale Geburt/ sekundäre Sektio
- $\text{Hep}_{(\text{CB})}$: 0 = $< 65 \text{ ng/ml}$
 1 = $\geq 65 \text{ ng/ml}$

Der Cut-off für $\text{Hep}_{(\text{CB})}$ lag zwischen der 75. Perzentile der Frühgeborenen und der 25. Perzentile der Reifgeborenen.

Als Cut-off für Ferritin bei Reifgeborenen wurde $60 \mu\text{g/l}$ gewählt, basierend auf der zum Zeitpunkt der Auswertung größten und aktuellsten Studie zu Ferritin in Nabelschnurblut [64]. Auch bei Frühgeborenen wurde $\text{Hep}_{(\text{CB})}$ in Abhängigkeit von Ferritin untersucht. Hier wurde als Cutt-off $40 \mu\text{g/l}$ gewählt [65, 66].

Die Schätzwerte, angepassten Odds-Ratios und die 95%igen Konfidenzintervalle wurden für die unabhängigen Variablen mit relevantem zusätzlichem Einfluss auf Hepcidin dargestellt. Die Berechnungen der multivariaten Analyse erfolgten mittels SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

3. Ergebnisse

3.1. Univariate Auswertung

In die Studie wurden 221 Früh- und Reifgeborene mit einem Gestationsalter von 24 1/7 bis 41 6/7 SSW eingeschlossen (siehe Tab. 1). Ausgeschlossen wurden ein Patient mit Blackfan-Diamond-Anämie, der pränatal eine Erythrozytentransfusion erhalten hat, sowie ein Patient mit einem Triple-X-Syndrom. Die Hep_(CB) war in 13 von 221 Proben (5,9%) nicht messbar (<5 ng/ml). 3 der 221 Proben (1,4%) wurden verdünnt um Hepcidin bestimmen zu können, da nur kleine Mengen an Plasma vorhanden waren. Aus dem gleichen Grund wurden 21 der 221 Proben (9,5%) verdünnt, um Ferritin, CRP und IL-6 bestimmen zu können.

Tab. 1: Variablen-Übersicht

Variable	Anzahl der NG n (%)
Gestationsalter bei Geburt:	
24-29 SSW	40 (18.1%)
30-36 SSW	81 (36.2%)
36-42 SSW	100 (45.2%)
standard deviation score für das Geburtsgewicht:	
SDS < -2	16 (7.2%)
SDS zwischen -2 und 2	198 (89.6%)
SDS ≥ 2	7 (3.2%)
Geburtsmodus:	
Spontane vaginale Geburt	67 (30.3%)
Primäre Sectio	90 (40.7%)
Sekundäre Sectio	64 (28.9%)
Geschlecht des NG:	
Männlich	103 (46.6 %)
Weiblich	118 (53.4%)

NG = Neugeborene

Hep_(CB) stieg signifikant ($r = 0,53$, $p < 0,0001$, $n = 221$) mit steigendem Gestationsalter an (siehe Abb. 5). Bei sehr unreifen Frühgeborenen (24 0/7 – 29 6/7 SSW, $n = 40$) betrug Hep_(CB) = 26,9 (13,5 – 63,1) ng/ml, bei den weniger unreifen Frühgeborenen (30 0/7 – 36 6/7 SSW, $n = 81$) 45,9 (24,7 – 74,5) ng/ml und bei den Reifgeborenen (37 0/7 – 41 6/7 SSW, $n = 100$) 103,9 (61,4 – 149,2) ng/ml (siehe Abb. 6 und Tab. 2)

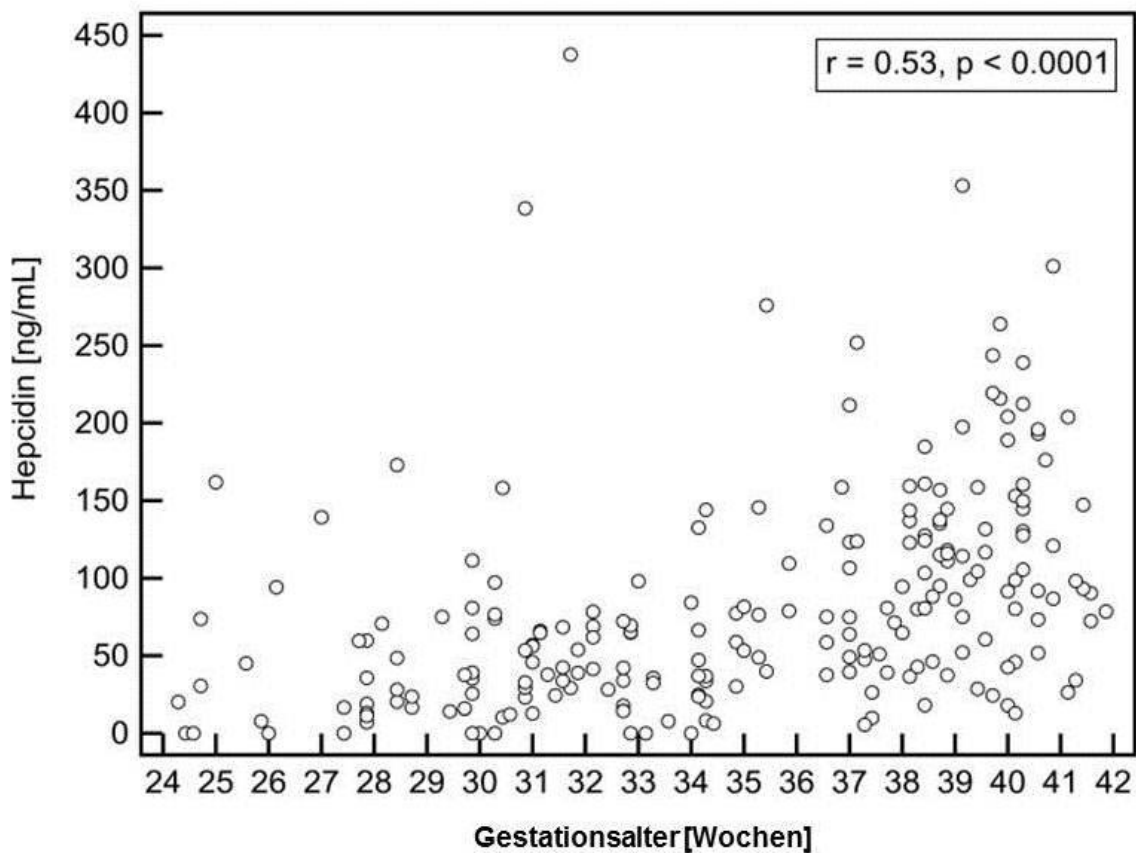


Abb. 5: Verteilung der gemessenen Hepcidinkonzentration im Nabelschnurplasma in Abhängigkeit vom Gestationsalter

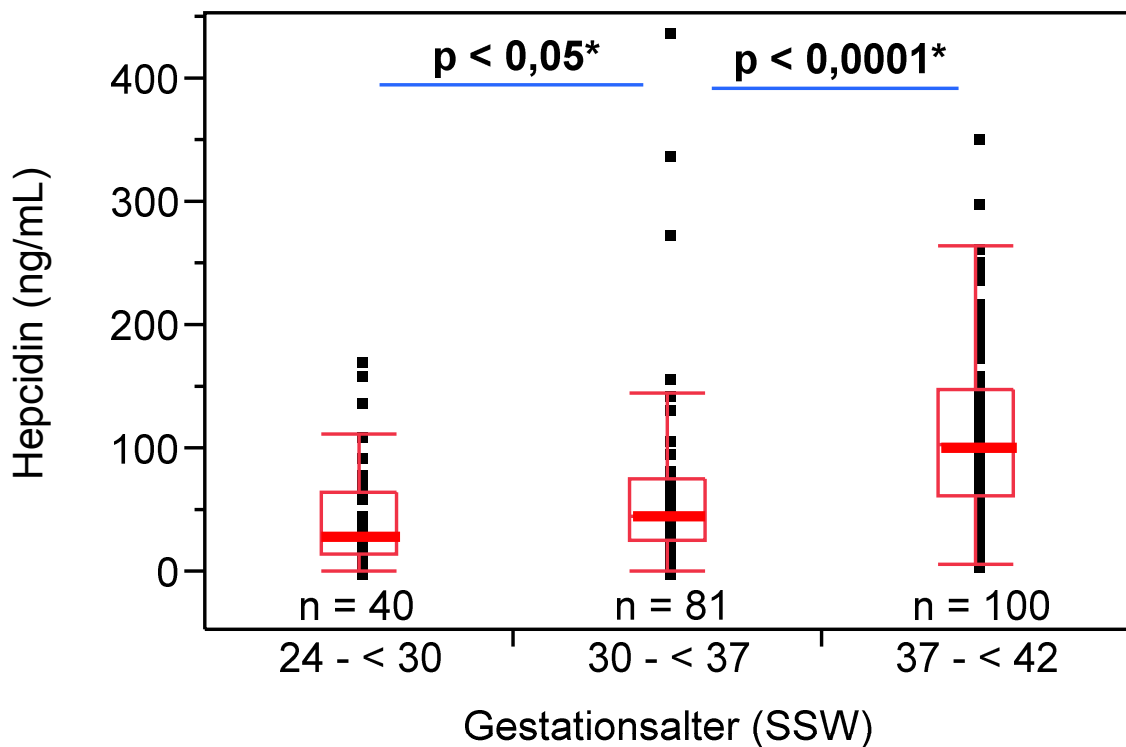


Abb. 6: Hepcidin in Abhängigkeit vom Gestationsalter

Tab. 2: Gestationsaltersspezifische Referenzwerte von Hepcidin

Referenzwerte für Hep_(CB) [ng/ml] anhand von Perzentilen

GA [Wochen]	n	2,5 P	10 P	25 P	50 P	75 P	90 P	97.5 P
24-29	40	< 5	<5	13.5	26.9	63.1	109.7	172.7
30-36	81	< 5	<5	24.7	45.9	74.5	133.6	335.3
37-42	100	11.5	34.4	61.4	103.9	149.2	210.9	281.5

GA = Gestationsalter

Hep_(CB) = Hepcidinkonzentration in Nabelschnurblut

P = Perzentile

Nicht nur die Hep_(CB), sondern auch die Ferritinkonzentration im Nabelschnurblut nahm mit steigendem Gestationsalter zu ($r = 0,29$, $p < 0,0001$, $n = 206$).

Des Weiteren war eine positive Korrelation zwischen Hep_(CB) und Ferritin ($r = 0,56$, $p < 0,0001$, $n = 207$) zu erkennen (siehe Abb. 7). Bei Kinder mit niedrigen

Eisenspeichern (Ferritin < 60 µg/l [64], n = 64) betrug $Hep_{(CB)}$ 36,9 (18,1 – 58,3) ng/ml und bei Kindern mit Ferritin \geq 60 µg/l (n = 142) konnte ein $Hep_{(CB)}$ -Wert von 86,6 (51,9 – 143,8) ng/ml gemessen werden (siehe Abb. 8).

Dieser Unterschied war auch zu erkennen, wenn man die Patienten in Reifgeborene und Frühgeborene unterteilt. Reifgeborene mit niedrigen Eisenspeichern (Ferritin < 60 µg/l, n = 25) hatten eine $Hep_{(CB)}$ von 51,1 (26,4 – 80,8) ng/ml, bei Reifgeborenen mit ausreichenden Eisenspeichern (Ferritin \geq 60 µg/l, n = 75) konnte dagegen eine $Hep_{(CB)}$ von 122,9 (88,2 – 160,4) ng/ml bestimmt werden. Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p < 0,0001$).

Bei Frühgeborenen mit niedrigen Eisenspeichern (Ferritin < 40 µg/l, n = 29) konnte eine $Hep_{(CB)}$ von 34 (14,5 – 50,3) ng/ml gemessen werden, während Frühgeborene mit ausreichenden Eisenspeichern (Ferritin \geq 40 µg/l, n = 77) einen $Hep_{(CB)}$ -Wert von 57 (24,7 – 76,6) ng/ml zeigten. Bei den Frühgeborenen war dieser Unterschied ebenfalls statistisch signifikant ($p < 0,05$).

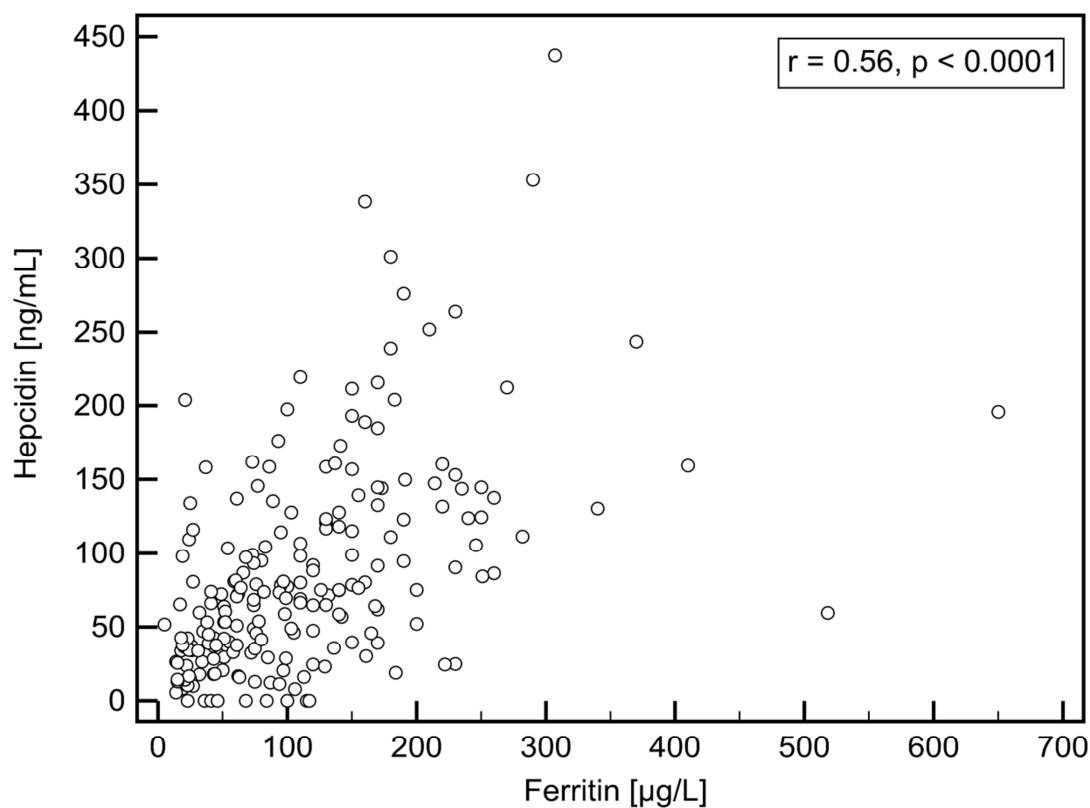


Abb. 7: Verteilung der Hepcidinkonzentration im Nabelschnurplasma in Abhängigkeit von Ferritin im Nabelschnurplasma.

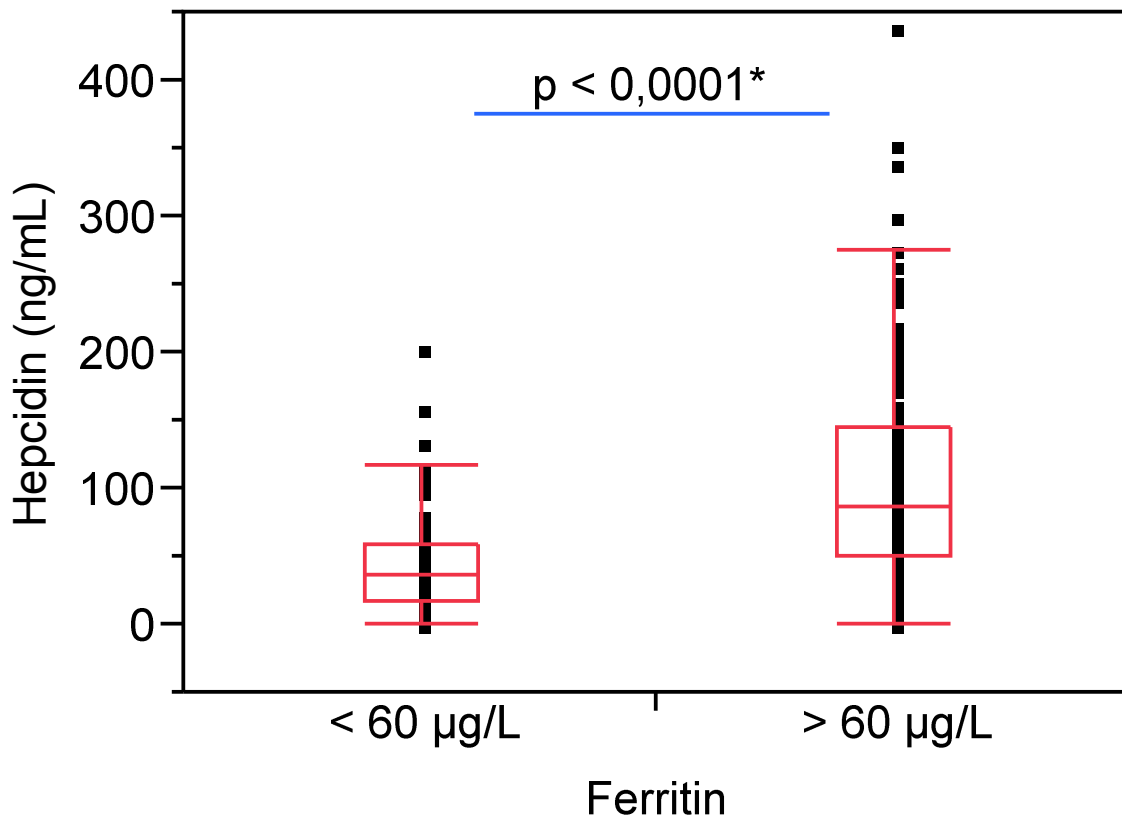


Abb. 8: Hepcidin in Abhängigkeit von Ferritin

Während eine negative Korrelation von der $Hep_{(CB)}$ mit MCV ($r = -0,31$, $p < 0,0001$, $n = 215$), MCH ($r = -0,36$, $p < 0,0001$, $n = 215$) und den Retikulozyten ($r = -0,25$, $p < 0,0005$, $n = 209$) zu erkennen war, korrelierte $Hep_{(CB)}$ nur schwach negativ mit Hämoglobin ($r = -0,16$, $p = <0,05$, $n = 215$) und dem Hämatokrit ($r = -0,15$, $p = <0,05$, $n = 215$).

Untersuchte man Hepcidin in Abhängigkeit vom Geburtsgewicht, hier als Geburtsgewicht-Z-Score, konnte ebenfalls ein Unterschied in der Hepcidinkonzentration zwischen hypotrophen und eutrophen Kindern gesehen werden.

Eutrophe Kinder ($-2 \leq Z\text{-Score} < +2$, $n = 198$) hatten eine $Hep_{(CB)}$ von 71,1 (34 – 121,7) ng/ml. Hypotrophe Kinder ($Z\text{-Score} < -2$, $n = 16$) hatten eine $Hep_{(CB)}$ von 23,1 (11,7 – 61,5) ng/ml.

Hypertrophe Kinder ($Z\text{-Score} \geq +2$, $n = 7$) zeigten im Vergleich zu den Eutrophen ebenfalls eine niedrigere $Hep_{(CB)}$ mit 46,2 (18,2 – 53,3) ng/ml.

Während der Unterschied von hypotrophen zu eutrophen Kindern mit $p < 0,005$ signifikant war, konnte man beim Vergleich von eutrophen und hypertrophen Neugeborenen nur eine Tendenz erkennen ($p = 0,164$) (siehe Abb. 9).

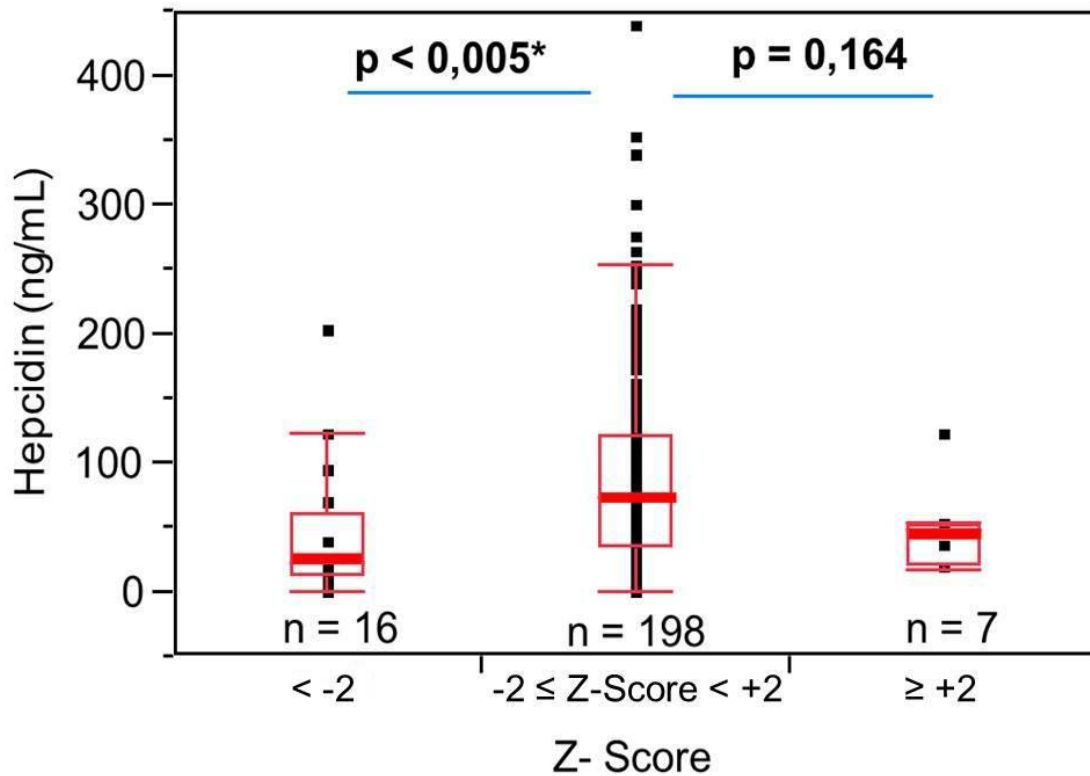


Abb. 9: Hepcidin in Abhängigkeit vom Geburtsgewicht (Z-Score)

Betrachtet man den Einflussfaktor Gestationsdiabetes mellitus der Mutter, so konnte kein klinisch relevanter Unterschied der Hepcidinwerte festgestellt werden ($p = 0,132$). Kinder von Müttern mit Verdacht auf oder mit einem nachgewiesenen Gestationsdiabetes mellitus ($n = 27$) hatten eine $Hep_{(CB)}$ von 80,7 (45,1 – 149,8) ng/ml, während Kinder von Müttern ohne diesen potentiellen Einflussfaktor ($n = 190$) eine $Hep_{(CB)}$ von 62,9 (29,2 – 111,1) ng/ml aufwiesen.

Beim Vergleich der Hepcidinwerte von Kindern, die mittels verschiedenen Entbindungsmodi (vaginal bzw. sekundäre Sectio vs. primäre Sectio) geboren wurden, konnte ein statistisch signifikanter Unterschied in den $Hep_{(CB)}$ beobachtet werden ($p < 0,0001$) (siehe Abb. 10).

Bei den Kindern, die mittels vaginaler Entbindung bzw. per sekundärer Sectio zur Welt kamen ($n = 131$), konnte eine $Hep_{(CB)}$ von $80,3$ ($48,5 - 137,6$) ng/ml festgestellt werden, während bei den Kindern, die durch eine primäre Sectio geboren wurden ($n = 90$), eine $Hep_{(CB)}$ von $38,3$ ($15,5 - 73,7$) ng/ml gemessen wurde.

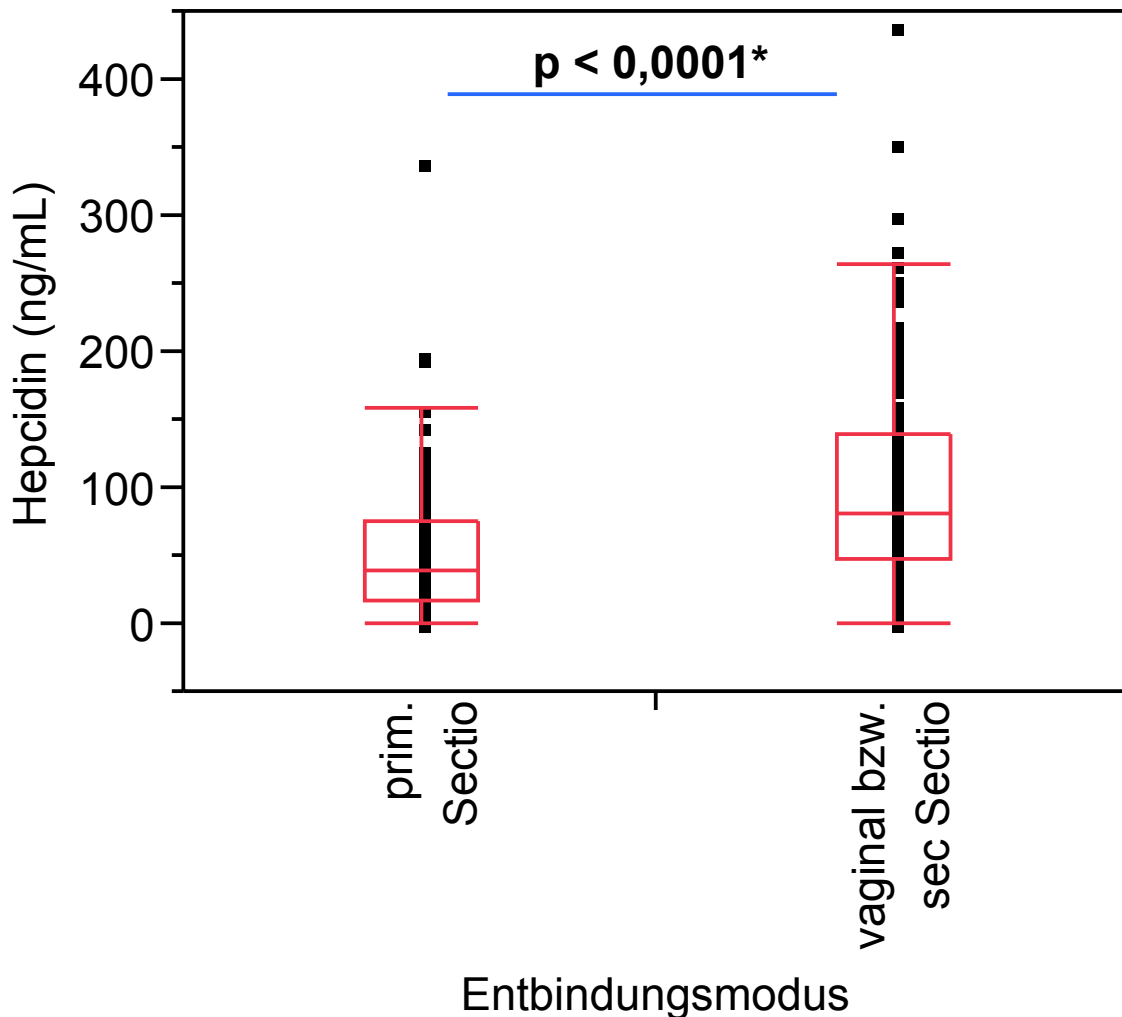


Abb. 10: Hepcidin in Abhängigkeit vom Entbindungsmodus

Analysiert man die Hepcidinkonzentration in Abhängigkeit von verschiedenen Geburtsmodi nur bei Reifgeborenen (primäre Sectio vs. vaginale Entbindung bzw. sekundäre Sectio), so war weiterhin ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) zu beobachten. Vaginal bzw. per sekundärer Sectio entbundene Reifgeborene ($n = 67$) hatten eine $Hep_{(CB)}$ von $116,7$ ($78,5 - 160,9$) ng/ml.

Bei Reifgeborenen, die durch eine primäre Sectio geboren wurden ($n = 33$), betrug die $\text{Hep}_{(\text{CB})} = 80,1$ ($41,2 - 120,5$) ng/ml.

Bei Frühgeborenen war dieser Unterschied ebenfalls statistisch signifikant ($p < 0,0001$). Während vaginal bzw. per sekundärer Sectio entbundene Frühgeborene ($n = 64$) eine $\text{Hep}_{(\text{CB})}$ von $62,1$ ($33,1 - 80,1$) ng/ml aufwiesen, hatten per primärer Sectio entbundene Frühgeborene ($n = 57$) eine $\text{Hep}_{(\text{CB})}$ von $25,7$ ($9,3 - 45,5$) ng/ml.

Betrachtet man den Einfluss der verschiedenen Entbindungsmodi (vaginal bzw. sekundäre Sectio vs. primäre Sectio) auf die Zahl der mütterlichen Leukozyten im Blut, so konnte man auch hier einen statistisch signifikanten ($p < 0,0001$) Unterschied erkennen. Mütter vaginal bzw. per sekundärer Sectio entbundener Kinder ($n = 65$) hatten eine Leukozytenzahl von 13020 ($11075 - 15890$) / μl . Bei Müttern, die ihre Kinder per primären Sectio entbunden haben ($n = 33$) betrug, die Leukozytenzahl 9710 ($8130 - 10325$) / μl .

Es konnte jedoch nur ein geringer Zusammenhang zwischen dem Entbindungsmodus und dem mütterlichen CRP ($p = 0,11$) oder der mütterlichen Körpertemperatur ($p < 0,05$) festgestellt werden.

Ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$) war bei der Untersuchung des Einflusses von Entbindungsmodus auf die kindlichen Leukozyten zu erkennen. Kinder, die per primärer Sectio entbunden wurden, hatten eine Leukozytenzahl von 9080 ($7343 - 12358$) / μl während Kinder, die per vaginaler Entbindung bzw. per sekundärer Sectio geboren wurden, eine Leukozytenzahl von 12690 ($9440 - 16835$) / μl aufwiesen.

Eine geringe statistische Signifikanz hatte der Zusammenhang des Geburtsmodus mit den kindlichen IL-6- ($p < 0,05$) sowie mit den kindlichen CRP-Werten ($p < 0,05$).

Einen Zusammenhang mit der Hepcidinkonzentration zeigten weder das kindliche IL-6 ($p = 0,123$), noch das kindliche CRP ($p = 0,543$) noch die kindlichen Leukozyten ($p = 0,167$).

Kinder mit einer early onset neonatal sepsis (n = 12), definiert als CRP-Erhöhung im Verlauf (der ersten 5 Lebenstage) und/oder einer positiven Blutkultur und 2-fach Antibiose für mindestens 5 Tage, zeigten eine Hep_(CB) von 84 (43,6 – 153,5) ng/ml. Bei Kindern ohne early onset neonatal sepsis (n = 209) betrug die Hep_(CB) = 64,8 (29 – 114,7) ng/ml. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied (p = 0,103).

Die höchste Hepcidinkonzentration, mit Hep_(CB) von 437,6 ng/ml, wurde bei einem Kind mit einer Enterococcus faecalis Sepsis gemessen. Dieses Kind hatte ein IL-6 von 1760 ng/l.

Bei der Untersuchung des Nabelarterien-pHs als möglichen Einflussfaktor auf die Hep_(CB) zeigte sich eine Tendenz (r = -0,14, p <0,05, n = 219) zu höheren Hepcidinwerten bei Kindern mit einer perinatalen Azidose.

Bezogen auf das Geschlecht konnte kein signifikanter Unterschied in der Hepcidinkonzentration gezeigt werden (p = 0,94). Bei Mädchen (n = 103) war die Hep_(CB) 64,8 (34 – 105,4) ng/ml und bei Jungen (n = 118) betrug die Hep_(CB) 65,2 (27,8 – 126,2) ng/ml.

3.2. Multivariate Auswertung

Die Variablen Gestationsalter, Z-Score (Geburtsgewicht), Ferritin und Geburtsmodus zeigten bei der univariaten Auswertung einen Zusammenhang mit der Hepcidinkonzentration, weshalb sie in einer multivariaten Auswertung noch einmal genauer überprüft wurden.

Diese zeigte, dass Gestationsalter, Ferritin und Geburtsmodus auch unter Berücksichtigung der jeweils anderen Variablen relevant und unabhängig von anderen Variablen mit der Hepcidinkonzentration in Zusammenhang stehen. Den stärksten Zusammenhang schien Ferritin mit einer Odds-Ration von 9,0 (4,1 – 19,4) zu haben (siehe Tab. 3).

Der Z-Score zeigte bei dieser Auswertung keinen signifikanten Einfluss (p = 0,8766) und wurde daher aus dem endgültigen Modell ausgeschlossen.

Außerdem zeigte sich eine Wechselwirkung nur zwischen Gestationsalter und Ferritin.

Tab. 3: Ergebnis der multivariaten Auswertung mittels multipler logistischer Regression

Variable	Schätz -wert	p Wert	Odds-Ratio für Hep_(CB)<65 ng/mL (95% Konfidenzintervall)
<i>Modell ohne Berücksichtigung von Wechselwirkungen</i>			
Ferritin < vs. ≥ 60 µg/L	2.19	<0.0001	9.0 (4.1 - 19.4)
GA < vs. ≥ 37 Wochen	1.61	<0.0001	5.0 (2.5 - 10.0)
ECS vs. SVD und SCS	1.61	<0.0001	5.0 (2.5 - 10.3)
<i>Endgültiges Modell unter Berücksichtigung von Wechselwirkungen</i>			
Wechselwirkung zw. Ferritin/GA	2.02	0.012	- GA ≥ 37 SSW und Ferritin < 60 µg/L 30.5 (8.4 - 111.4) - GA < 37 SSW und Ferritin ≥ 60 µg/L 9.5 (3.9 - 23.2) - GA < 37 SSW und Ferritin < 60 µg/L 38.4 (13.6 - 108.3)
ECS vs. SVD und SCS	1.77	<0.0001	5.9 (2.7 - 12.6)

KI = Konfidenzintervall

ECS = primäre Sectio

SVD = spontane vaginale Geburt

SCS = sekundäre Sectio

4. Diskussion

In dieser Studie wurde zum ersten Mal Hepcidin im Nabelschnurblut von Früh- und Reifgeborenen untersucht, um gestationsaltersspezifische Referenzwerte zu etablieren.

Die in dieser Studie gemessenen Hepcidinkonzentrationen im Nabelschnurblut von Reifgeborenen sind etwas höher als die Hepcidinkonzentrationen von Reifgeborenen einer Studie von Rehu et al. von 2010 (Median: 78,4 ng/ml; 20,5 – 231,9 ng/ml) [61], obwohl in beiden Studien derselbe ELISA verwendet worden war. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied beruht auf unserer Hypothese, dass Faktoren wie AIS, perinatale Azidose und Hypotrophie zu einem Anstieg der Hepcidinkonzentration führen können. Da bei einem großen Anteil der in dieser Studie untersuchten Reifgeborenen einer dieser Faktoren vorlag, können wir nicht ausschließen, dass dies die Ursache für den beobachteten Unterschied darstellt.

Um diese Hypothese zu prüfen wurde ein Vergleich der Subgruppe „Reifgeborene mit AIS, perinataler Azidose und Hypotrophie“ und „Reifgeborene ohne diese Risikofaktoren“ durchgeführt. Allerdings konnte kein Unterschied in der mittleren $Hep_{(CB)}$ festgestellt werden. Die Unterschiede in der medianen $Hep_{(CB)}$ zwischen dieser Studie und der Studie von Rehu [61] können so also nicht erklärt werden. Von viel größerer Bedeutung als die mediane Konzentration ist jedoch die 10. Perzentile der $Hep_{(CB)}$, da dieser Grenzwert für die Ermittlung einer unterdrückten Hepcidinsynthese (z.B. aufgrund eines Eisenmangels) angesehen werden kann. Dieser Wert für die 10. Perzentile der $Hep_{(CB)}$ bei Reifgeborenen ist in dieser Studie (34,4 ng/ml) ähnlich zu den bereits publizierten Hepcidinkonzentrationen bei Reifgeborenen von Rehu [61].

Unsere Studie belegt, dass Frühgeborene ab der 23.SSW Hepcidin synthetisieren. Auch in einer vorangegangenen Studie von Müller et al. [50] konnte unsere Arbeitsgruppe bereits nachweisen, dass nicht nur Reifgeborene, sondern auch Frühgeborene Hepcidin produzieren. Es wurden Hepcidinkonzentrationen in Serum und Urin bei Frühgeborenen untersucht, welche aufgrund einer Frühge-

borenenanämie Bluttransfusionen erhalten hatten (mittleres GA bei Geburt: 26 SSW, mittleres postnatales Alter: 35 Tage, mittlerer Hämatokrit: 50,6%, Median Ferritin: 92 µg/l). In Müllers Studienpopulation waren die postnatal bestimmten Hepcidinkonzentrationen im Mittel höher (geometrisches Mittel: 48,5 ng/ml; 95%iges Konfidenzintervall: 33,0 – 71,3 ng/ml) verglichen mit den Hepcidinkonzentrationen im Nabelschnurblut von ähnlich unreifen Frühgeborenen dieser Studie (Hepcidin 29,6 (13,5 – 63,1) ng/ml, Median GA bei Geburt: 28 SSW, mittlerer Hämatokrit: 50,6%, Median Ferritin: 96 µg/l), obwohl die Ferritinkonzentrationen sehr ähnlich waren. Da die Hepcidinbestimmungen in beiden Studien mit dem gleichen Hepcidin-ELISA durchgeführt wurden, ist nicht davon auszugehen, dass der Unterschied methodisch bedingt ist.

Potentielle postnatale Einflussfaktoren wie gleichzeitig bestehende Infektion, vorangegangene Bluttransfusionen oder Eisensubstitution könnten jedoch ursächlich hierfür sein. Es konnte zum Beispiel bereits gezeigt werden, dass geringgradig hypotrophe Kinder in Folge einer Eisensupplementierung ab der 6. Lebenswoche höhere Hepcidinkonzentrationen im Alter von 12 Wochen sowie 6 Monaten aufweisen als geringgradig hypotrophe Kinder ohne Eisensupplementierung [67].

Grundüberlegung für die Durchführung unserer Studie war, dass die Hepcidin-Referenzkonzentrationen helfen könnten, Frühgeborene und Reifgeborene mit Eisenmangel und Eisenüberladung zu identifizieren und eine individualisierte Eisensupplementierung zu überwachen. Da sehr unreife Frühgeborene postnatal viele Komorbiditäten aufweisen und diese die Hepcidinkonzentration beeinflussen können, gingen wir davon aus, dass nicht postnatale Referenzwerte, sondern Referenzwerte aus dem Nabelschnurblut herangezogen werden sollten. Im Gegensatz zu den postnatalen Hepcidinkonzentrationen spiegeln die Nabelschnurwerte eher den physiologischen Eisenstatus in dem aktuellen gestationsaltersspezifischen Entwicklungsstadium wieder.

Da bekannt ist, dass sowohl Eisenmangel [55], erhöhte Erythropoese [68] als auch Hypoxie [55, 59] die Hepcidinsynthese supprimieren und Entzündung [69]

und Eisenüberladung [52] die Hepcidinsynthese induzieren, wurde in dieser Studie außerdem versucht prä- und perinatale Faktoren zu eruieren, die die Hepcidinkonzentration im Nabelschnurblut beeinflussen können.

Es konnte gezeigt werden, dass ein steigendes Gestationsalter, vor allem nach der 37. SSW, mit höheren $Hep_{(CB)}$ assoziiert ist. Dies spiegelt möglicherweise den zunehmenden Eisenspeicher, der durch den Fetus während des dritten Trimesters erworben wird, wider. Um eine fetale Eisenüberladung zu verhindern, wird vom Fetus vermehrt Hepcidin produziert, welches wiederum zu einer verminderten Eisenaufnahme über die Plazenta führt. Auch die Ferritinkonzentration im Nabelschnurblut nimmt mit steigendem Gestationsalter zu, dies konnte bereits 2001 durch Sweet et al. gezeigt werden [65]. Die dazu veröffentlichten Studien wurden durch Lorenz et al. zusammengefasst [70]. Alternativ kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eventuell zusätzlich eine unreifere Leberfunktion der Frühgeborenen zu der beobachteten niedrigeren Hepcidin- und Ferritinkonzentration im Nabelschnurblut im Vergleich zu Reifgeborenen beiträgt.

Derzeit ist nur sehr wenig über die intrauterine Hepcidinproduktion und ihre Regulation bekannt. Seitdem der Transferrinrezeptor 1 auf der apikalen, zur Mutter hin gerichteten Seite der Zellen des Synzytiotrophoblasten und Ferroportin auf der basalen, zum Fetus hin gerichteten Seite nachgewiesen wurden [60], ist anzunehmen, dass Hepcidin den einseitig gerichteten Eisentransport von Mutter zum Fetus reguliert. Hepcidin bindet an den einzigen bekannten zellulären Eisenexporter Ferroportin und führt somit zu dessen Endozytose und Abbau in Lysosomen [52]. Deshalb führt eine hohe fetale Hepcidinkonzentration zu einem geringeren Eisenexport aus den Zellen des Synzytiotrophoblasten und weniger Eisen wird über diesen Weg dem Fetus zur Verfügung gestellt [52]. Aktuell wird vermutet, dass die maternalen und fetalen Hepcidinkonzentrationen unabhängig voneinander reguliert werden. Am Ende der Schwangerschaft ist die maternale Hepcidinkonzentration niedrig und die Hepcidinkonzentrationen im fetalen Nabelschnurblut im Vergleich dazu hoch [61]. Die Ursache hierfür könnte sein, dass am Ende der Schwangerschaft die Mutter so viel Eisen wie

möglich enteral aufnimmt um den hohen Bedarf des Fetus zu decken, welcher im letzten Trimenon seine Eisenspeicher füllt, da in den ersten postnatalen Lebensmonaten nur wenig Eisen durch die Muttermilch zur Verfügung gestellt wird [21]. Die Hepcidinkonzentration des Fetus steigt mit zunehmendem Gestationsalter und zunehmenden fetalen Eisenspeichern ebenfalls, um den Fetus wiederum vor einer Eisenüberladung zu schützen.

Diese Studie konnte zeigen, dass die Hepcidinkonzentrationen im Nabelschnurblut von Reifgeborenen höher sind als von Frühgeborenen, was die mit dem Gestationsalter steigenden Eisenspeicher widerspiegeln könnte und damit die Hypothese unterstützen würde, dass Hepcidin den diaplazentaren Eisentransfer von der Mutter zum Kind reguliert.

Übereinstimmend mit vorherigen Studien [49, 50], konnte eine gute Korrelation von Hepcidin mit Ferritin beobachtet werden. Kinder mit Eisenmangel (Ferritin < 60 µg/l [64]) haben im Vergleich zu Kindern ohne Eisenmangel kompensatorisch deutlich niedrigere Hepcidinkonzentrationen im Nabelschnurblut, wahrscheinlich um einen maximalen plazentaren Eisentransfer von der Mutter zum Fetus zu ermöglichen. Der enge Zusammenhang zwischen Ferritin und Hepcidinkonzentration konnte auch in einer multivariaten Analyse bestätigt werden, was unsere Hypothese unterstützt, dass Hepcidin als Eisenstatusparameter dienen könnte. Somit könnte die Bestimmung der Hepcidinkonzentration im Nabelschnurblut helfen, Kinder ausfindig zu machen, welche bereits bei Geburt unter einem Eisenmangel leiden und somit von einer früheren oder höheren Eisensupplementierung profitieren würden.

Wir konnten niedrigere Hepcidinkonzentrationen nicht nur in Nabelschnurblut von Frühgeborenen beobachten, sondern auch in Nabelschnurblut von Kindern mit einer intrauterinen Wachstumsretardierung, erkennbar an einem Gewicht-SDS < -2. Ursache einer intrauterinen Wachstumsretardierung ist meist eine Plazentainsuffizienz. Durch eine Plazentainsuffizienz werden Kinder empfänglicher für einen Eisenmangel. Der Grund hierfür ist sowohl ein verminderter transplazentarer Eisentransport [71], wie auch ein Verlust des schon bestehen-

den Eisenspeichers aufgrund einer gesteigerten Erythropoese, welche durch eine chronische intrauterine Hypoxie verursacht wird [26]. Jedoch scheint eine intrauterine Wachstumsretardierung im Vergleich zur Frühgeburtlichkeit nur einen geringen Einfluss auf die Hepcidinkonzentration im Nabelschnurblut zu haben, da eine Korrelation von Hepcidin und Wachstumsretardierung in der multivariaten Analyse nicht bestätigt werden konnte. Passend zu den Ergebnissen der hier durchgeführten multivariaten Analyse konnten auch Briana et al. bei hypotrophen im Vergleich zu eutrophen Kindern keine niedrigeren $Hep_{(CB)}$ nachweisen [72]. Die Ergebnisse von Briana et al. müssen jedoch kritisch betrachtet werden, da ein älterer Hepcidin ELISA verwendet wurde, welcher in vorherigen Studien keine Korrelation mit Eisenparametern zeigte [73] und in der Zwischenzeit vom Hersteller weiterentwickelt werden musste [74].

Eine weitere Hypothese war, dass im Nabelschnurblut von Kindern, deren Mütter unter einem Gestationsdiabetes mellitus leiden, niedrigere Hepcidinkonzentrationen zu messen sind. Ebenso wie eine Plazentainsuffizienz führt ein maternaler Gestationsdiabetes mellitus zu einer erhöhten fetalen Erythropoese aufgrund einer chronischen Hypoxie. Eine gesteigerte Erythropoese resultiert in einem erhöhten Eisenverbrauch, was im Verlauf die fetalen Eisenspeicher reduziert [29]. Wir konnten keine klinisch relevanten Unterschiede in der $Hep_{(CB)}$, der Ferritin- sowie der Hämoglobin-Konzentration zwischen Kindern, deren Mütter einen Gestationsdiabetes mellitus hatten und Kindern, deren Mütter diesen nicht hatten, zeigen. Dies liegt vermutlich daran, dass betroffene Schwangere heutzutage mittels eines pathologischen oralen Glukosetoleranztests frühzeitig erkannt und anschließend diätetisch oder mittels Insulin therapeutisch adäquat eingestellt werden.

Es ist bekannt, dass durch Hypoxie die Hepcidinproduktion in Zellkulturen [55], Tiermodellen [55] und in Menschen in vivo [75] reduziert wird. Im Falle einer Hypoxie nimmt die erythropoetische Aktivität deutlich zu [76], um mehr Sauerstoff mittels einer erhöhten Anzahl an Erythrozyten transportieren zu können. Bei einer erhöhten Erythropoese wird wiederum vermehrt Eisen benötigt, wes-

halb die Hepcidinkonzentration sinken muss, um dieses zur Verfügung stellen zu können. Der molekulare Pathomechanismus ist jedoch noch nicht vollständig verstanden. Bis noch vor kurzer Zeit wurde angenommen, dass Hypoxie-induzierte Faktoren [58] selber die Hepcidinproduktion inhibieren, aktuelle Studien unterstützen allerdings die Hypothese, dass die vermehrte Erythropoetinproduktion unter Hypoxie notwendig ist, um die Hepcidinsynthese zu supprimieren [59]. Betrachtet man die Hepcidinproduktion bei Menschen direkt nachdem sie einer Hypoxie durch einen Aufenthalt in großer Höhe ausgesetzt wurden oder nach einer Erythropoetin-Injektion bei gesunden Erwachsenen, so wird diese erst nach 1 - 2 Tagen unterdrückt [75, 77]. Im Gegensatz hierzu steigt die Erythropoetin-Konzentration unter Hypoxie innerhalb von ca. 90 Minuten [78]. Diese Beobachtungen sind zumindest vereinbar mit der Hypothese, dass Erythropoetin einer der Faktoren sein könnte, der zur Reduktion der Hepcidinproduktion unter Hypoxie führt. Sollte die Erythropoetin-Ausschüttung tatsächlich zusätzlich zur Hypoxie erforderlich sein, so wäre es nicht überraschend, dass in dieser Studie ein niedriger Nabelarterien-pH, welcher einen nur kurzfristigen Hypoxiezustand widerspiegelt, nicht mit einer niedrigen Hepcidinkonzentration im Nabelschnurblut von Reifgeborenen assoziiert war. Leider war es aufgrund zu geringer Nabelschnurblutmengen bei den unreifen Frühgeborenen nicht möglich zusätzlich die Erythropoetin-Konzentration zu bestimmen. Dies wäre von Vorteil gewesen, da (wie oben dargestellt zumindest bei Erwachsenen) die Erythropoetin-Produktion im Vergleich zu Hepcidin schneller auf einen Hypoxiezustand reagiert.

Die Hepcidinkonzentration ist sowohl im Falle einer Inflammationsreaktion wie auch einer systemischen Infektion erhöht, da die Hepcidinproduktion durch das pro-inflammatorische Zytokin IL-6 induziert wird [69]. Neben seiner antimikrobiellen Aktivität [79], führt eine erhöhte Hepcidinkonzentration während einer Infektion dazu, dass den pathogenen Keimen weniger lebenswichtiges Eisen zur Verfügung gestellt wird [52]. Es konnte jedoch in dieser Studie kein Zusammenhang zwischen der Hepcidinkonzentration im Nabelschnurblut und Entzündungsparametern (CRP und IL-6) gezeigt werden. Die Ursache könnte die

Tatsache sein, dass die Kinetik von IL-6, CRP und Hepcidin verschieden ist. Proinflammatorische Zytokin-Konzentrationen (z.B. IL-6 und IL-8) sind vor allem in der frühen Phase perinataler Infektionen erhöht [80], der CRP-Anstieg erfolgt erst später [80] und die Kinetik von Hepcidin ist noch nicht bekannt (ist aber wie oben dargestellt zumindest nach Hypoxie bei Erwachsenen deutlich verzögert). Wir gehen davon aus, dass in dieser Studie die Zeitspanne des erhöhten IL-6 zu kurz war um zu einer Erhöhung der Hepcidinkonzentration im Nabelschnurblut zu führen oder dass der durch perinatale IL-6-Ausschüttung getriggerte Hepcidinanstieg erst mit zeitlichem Abstand nach der Geburt erfolgt und damit im Nabelschnurblut nicht nachweisbar ist.

Interessanterweise konnte die höchste Hepcidinkonzentration im Nabelschnurblut eines Frühgeborenen mit einer early onset neonatal sepsis und mit einer positiven Blutkultur mit *E. faecalis* beobachtet werden. Dies passt zu den Beobachtungen einer bereits veröffentlichten Studie über die Hepcidinkonzentration bei Frühgeborenen im Alter von im Mittel 26 Tagen von Müller et al. [50]. Auch in Müllers Studie konnte die höchste Hepcidinkonzentration bei einem Frühgeborenen mit einer Sepsis und positiver Blutkultur nachgewiesen werden. Frühgeborenen mit einer postnatalen Kultur-gesicherten late-onset Sepsis oder mit klinischen Zeichen einer Sepsis haben laut einer kürzlich erschienenen Studie ebenfalls höhere Hepcidinkonzentrationen im Plasma als Reifgeborene oder Frühgeborene ohne eine Sepsis [81]. Außerdem konnten in einer aktuellen Studie erhöhte Hepcidinkonzentration bei Früh- und Reifgeborenen mit einer early onset neonatal sepsis (Hepcidin 118.1 – 8400 ng/ml, Median GA bei Geburt: 35. SSW) gemessen werden [82]. Die Studie ist jedoch kritisch zu betrachten, da sie keine statistisch relevante Korrelation zwischen Hepcidin und Eisenstoffwechselfparametern zeigen konnte.

Um den genauen Pathomechanismus der Hepcidinregulation im Falle einer neonatalen Sepsis zu verstehen, sind weitere Studien nötig.

Im Rahmen der Geburtseinleitung kommt es sowohl bei der Mutter [83] als auch beim Fetus [84] zu einer Akute-Phase-Reaktion mit Zytokinaktivierung. Es wird vermutet, dass am Ende der Schwangerschaft die Hemmung des mütterlichen

Immunsystems aufgrund des Progesteronabfalls abnimmt. Der Fetus wird als „fremder Organismus“ erkannt und es kommt zu einer milden Entzündungsreaktion. Diese wiederum fördert die zervikale Reifung, den Blasensprung sowie die Kontraktilität der Uterusmuskulatur wodurch es zur Geburtseinleitung kommt (zusammengefasst von [83]).

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Mütter, die ihr Kind spontan oder per sekundärer Sectio zur Welt brachten, deutlich höhere Leukozytenkonzentrationen und höhere Körpertemperaturen aufwiesen, im Gegensatz zu den Müttern, die per primärer Sectio entbunden haben. Ähnliche Beobachtungen konnten bei den Neugeborenen gemacht werden. Es zeigten sich deutlich höhere Leukozyten- wie auch CRP- und IL-6-Konzentrationen bei den Kindern, die spontan oder per sekundären Sectio entbunden wurden im Vergleich zu denen, die per primärer Sectio auf die Welt kamen.

Da Kinder die spontan oder per sekundärer Sectio zu Welt kamen höhere Hepcidinkonzentrationen aufwiesen als Kinder, die per primärer Sectio geboren wurden, nehmen wir an, dass die zuvor beschriebene perinatale Entzündungsreaktion hierzu beigetragen haben könnte, auch wenn es keine deutliche Korrelation zwischen Entzündungsmarkern und der $Hep_{(CB)}$ gibt. Die Ursache hierfür liegt möglicherweise in der unterschiedlichen Kinetik der verschiedenen Parameter, die oben beschrieben wurde.

Wie in dieser Diskussion dargestellt, scheinen viele Faktoren die Hepcidinkonzentration zu beeinflussen. Diese Problematik ist auch von anderen Eisenstoffwechselfparametern bekannt. Die Interpretation der Einzelwerte muss deshalb in Kenntnis dieser beeinflussenden Faktoren mit Vorsicht erfolgen.

Für die weitere Entwicklung von Hepcidin als Eisenstoffwechselfparameter ist insbesondere zu beachten, dass die aktuell auf dem Markt existierenden Messmethoden noch nicht standardisiert und deshalb nur eingeschränkt vergleichbar sind.

5. Zusammenfassung

Dies ist die erste Studie, die gestationsaltersspezifische Referenzwerte für die Hepcidinkonzentration im Nabelschnurblut von Früh- und Reifgeborenen definiert. Um perinatale Einflussfaktoren identifizieren zu können, die diese Hepcidinkonzentration im Nabelschnurblut möglicherweise beeinflussen könnten, wurde zusätzlich das Nabelschnurblut von Neugeborenen mit unterschiedlichem Geburtsgewicht sowie weiteren potenziellen Einflussfaktoren wie Geburtsmodus, Gestationsdiabetes, Amnioninfektionssyndrom und systemische Entzündungsreaktion des Kindes untersucht.

Einige dieser Faktoren sollten mitbedacht werden, falls Hepcidin zukünftig als Eisenstoffwechselfaktor bei Früh- und Neugeborenen benutzt werden sollte. Hierbei müssten vor allem die Ferritinkonzentration, das Gestationsalter, das Geburtsgewicht sowie der Entbindungsmodus berücksichtigt werden. Ein signifikanter Zusammenhang bestand zwischen Entbindungsmodus und Hepcidinkonzentration. Im Vergleich zu Kindern, die per vaginaler Geburt oder sekundärer Sectio entbunden wurden, zeigen Kinder die per primärer Sectio zu Welt kamen signifikant niedrigere Hepcidinkonzentrationen. Bei steigendem Gestationsalter nimmt die Hepcidinkonzentration im Nabelschnurblut zu, was jedoch auch in Zusammenhang mit der steigenden Ferritinkonzentration bei zunehmendem Gestationsalter liegen könnte. Da Ferritin in der multivariaten Analyse am stärksten mit $Hep_{(CB)}$ assoziiert war, könnte Hepcidin als Eisenstatusparameter zur Überwachung und Individualisierung der Eisensupplementierung bei Frühgeborenen dienen. Diese Hypothese muss jedoch ebenso wie die Frage, ob eine individualisierte Eisensupplementierung überhaupt einer standardisierten Eisensupplementierung überlegen ist, in zukünftigen Studien untersucht werden. Wir gehen davon aus, dass Nabelschnurblut verwendet werden sollte, da aufgrund von postnatalen Einflussfaktoren wie Infektionen, zahlreichen Blutentnahmen und Eisensupplementierung Nabelschnurblut eher den physiologischen Eisenstatus widerspiegelt.

6. Literaturverzeichnis

1. Nemeth, E. and T. Ganz, *Regulation of iron metabolism by hepcidin*. Annu Rev Nutr, 2006. **26**: p. 323-42.
2. Hentze, M.W., M.U. Muckenthaler, and N.C. Andrews, *Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism*. Cell, 2004. **117**(3): p. 285-97.
3. Gunshin, H., et al., *Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter*. Nature, 1997. **388**(6641): p. 482-8.
4. Andrews, N.C., *Molecular control of iron metabolism*. Best Pract Res Clin Haematol, 2005. **18**(2): p. 159-69.
5. Fleming, M.D., et al., *Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene*. Nat Genet, 1997. **16**(4): p. 383-6.
6. McKie, A.T., et al., *An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron*. Science, 2001. **291**(5509): p. 1755-9.
7. Collard, K.J., *Iron homeostasis in the neonate*. Pediatrics, 2009. **123**(4): p. 1208-16.
8. Bratosin, D., et al., *Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review*. Biochimie, 1998. **80**(2): p. 173-95.
9. Bradley, J., et al., *Influence of gestational age and fetal iron status on IRP activity and iron transporter protein expression in third-trimester human placenta*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. **287**(4): p. R894-901.
10. Richardson, D.R. and P. Ponka, *The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1331**(1): p. 1-40.
11. McKie, A.T., et al., *A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation*. Mol Cell, 2000. **5**(2): p. 299-309.
12. Vulpe, C.D., et al., *Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse*. Nat Genet, 1999. **21**(2): p. 195-9.
13. Osaki, S., D.A. Johnson, and E. Frieden, *The possible significance of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum*. J Biol Chem, 1966. **241**(12): p. 2746-51.
14. Harris, Z.L., et al., *Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(19): p. 10812-7.
15. Abboud, S. and D.J. Haile, *A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism*. J Biol Chem, 2000. **275**(26): p. 19906-12.
16. Donovan, A., et al., *Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter*. Nature, 2000. **403**(6771): p. 776-81.
17. Donovan, A., et al., *The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis*. Cell Metab, 2005. **1**(3): p. 191-200.

18. Niemayer, C.M., et al., *Hämatologie*, in *Pädiatrie*, S.C.G. M, Editor 2009, Springer Medizin Verlag: Heidelberg. p. 605 - 680.
19. Blattmann, C., *Hämatologische und Onkologische Erkrankungen*, in *Kurzlehrbuch Pädiatrie*, M. Bald, et al., Editors. 2012, Georg Thieme Verlag KG: Stuttgart. p. 398-399.
20. Tawada, T., et al., *Studies on the placental transport mechanism for iron*. Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi, 1985. **37**(5): p. 735-42.
21. Domellof, M., et al., *Iron, zinc, and copper concentrations in breast milk are independent of maternal mineral status*. Am J Clin Nutr, 2004. **79**(1): p. 111-5.
22. Tiker, F., et al., *Serum pro-hepcidin levels and relationships with iron parameters in healthy preterm and term newborns*. Pediatr Hematol Oncol, 2006. **23**(4): p. 293-7.
23. Leong, W.I., et al., *DMT1 and FPN1 expression during infancy: developmental regulation of iron absorption*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **285**(6): p. G1153-61.
24. Baker, R.D. and F.R. Greer, *Diagnosis and prevention of iron deficiency and iron-deficiency anemia in infants and young children (0-3 years of age)*. Pediatrics, 2010. **126**(5): p. 1040-50.
25. Steldinger, R. and T. Klosterhalfen, *Intrauterine Mangelentwicklung*, in *Duale Reihe - Gynäkologie und Geburtshilfe*, M. Stauber and T. Weyerstrahl, Editors. 2007, Georg Thieme Verlag KG: Stuttgart. p. 673 - 674.
26. Chockalingam, U.M., et al., *Cord transferrin and ferritin values in newborn infants at risk for prenatal uteroplacental insufficiency and chronic hypoxia*. J Pediatr, 1987. **111**(2): p. 283-6.
27. Widdowson, E.M. and C.M. Spray, *Chemical development in utero*. Arch Dis Child, 1951. **26**(127): p. 205-14.
28. Haga, P., *Plasma ferritin concentrations in preterm infants in cord blood and during the early anaemia of prematurity*. Acta Paediatr Scand, 1980. **69**(5): p. 637-41.
29. Verner, A.M., et al., *Influence of maternal diabetes mellitus on fetal iron status*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2007. **92**(5): p. F399-401.
30. Daskalakis, G., et al., *Placental pathology in women with gestational diabetes*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2008. **87**(4): p. 403-7.
31. Steldinger, R., E. Lengyel, and A. Beham, *Diabetes mellitus*, in *Duale Reihe - Gynäkologie und Geburtshilfe*, M. Stauber and T. Weyerstrahl, Editors. 2007, Georg Thieme Verlag KG: Stuttgart. p. 563 - 569.
32. Madazli, R., et al., *The incidence of placental abnormalities, maternal and cord plasma malondialdehyde and vascular endothelial growth factor levels in women with gestational diabetes mellitus and nondiabetic controls*. Gynecol Obstet Invest, 2008. **65**(4): p. 227-32.
33. Salvesen, D.R., et al., *Fetal plasma erythropoietin in pregnancies complicated by maternal diabetes mellitus*. Am J Obstet Gynecol, 1993. **168**(1 Pt 1): p. 88-94.
34. Fredriksson, A., et al., *Maze learning and motor activity deficits in adult mice induced by iron exposure during a critical postnatal period*. Brain Res Dev Brain Res, 2000. **119**(1): p. 65-74.

35. Armony-Sivan, R., et al., *Iron status and neurobehavioral development of premature infants*. J Perinatol, 2004. **24**(12): p. 757-62.
36. Lozoff, B., et al., *The effects of short-term oral iron therapy on developmental deficits in iron-deficient anemic infants*. J Pediatr, 1982. **100**(3): p. 351-7.
37. Lozoff, B., E. Jimenez, and A.W. Wolf, *Long-term developmental outcome of infants with iron deficiency*. N Engl J Med, 1991. **325**(10): p. 687-94.
38. Steinmacher, J., et al., *Randomized trial of early versus late enteral iron supplementation in infants with a birth weight of less than 1301 grams: neurocognitive development at 5.3 years' corrected age*. Pediatrics, 2007. **120**(3): p. 538-46.
39. Obladen, M., M. Sachsenweger, and M. Stahnke, *Blood sampling in very low birth weight infants receiving different levels of intensive care*. Eur J Pediatr, 1988. **147**(4): p. 399-404.
40. Franz, A.R., et al., *Prospective randomized trial of early versus late enteral iron supplementation in infants with a birth weight of less than 1301 grams*. Pediatrics, 2000. **106**(4): p. 700-6.
41. Agostoni, C., et al., *Enteral nutrient supply for preterm infants: commentary from the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2010. **50**(1): p. 85-91.
42. Park, C.H., et al., *Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 7806-10.
43. Krause, A., et al., *LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity*. FEBS Lett, 2000. **480**(2-3): p. 147-50.
44. Nemeth, E. and T. Ganz, *The role of hepcidin in iron metabolism*. Acta Haematol, 2009. **122**(2-3): p. 78-86.
45. Nemeth, E., et al., *The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study*. Blood, 2006. **107**(1): p. 328-33.
46. Hunter, H.N., et al., *The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis*. J Biol Chem, 2002. **277**(40): p. 37597-603.
47. Pigeon, C., et al., *A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 7811-9.
48. Valore, E.V. and T. Ganz, *Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin*. Blood Cells Mol Dis, 2008. **40**(1): p. 132-8.
49. Ganz, T., et al., *Immunoassay for human serum hepcidin*. Blood, 2008. **112**(10): p. 4292-7.
50. Muller, K.F., et al., *Hepcidin concentrations in serum and urine correlate with iron homeostasis in preterm infants*. J Pediatr, 2012. **160**(6): p. 949-53 e2.
51. Peters, H.P., et al., *Tubular reabsorption and local production of urine hepcidin-25*. BMC Nephrol, 2013. **14**(1): p. 70.

52. Nemeth, E., et al., *Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization*. Science, 2004. **306**(5704): p. 2090-3.
53. Nicolas, G., et al., *Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8780-5.
54. Roetto, A., et al., *Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis*. Nat Genet, 2003. **33**(1): p. 21-2.
55. Nicolas, G., et al., *The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation*. J Clin Invest, 2002. **110**(7): p. 1037-44.
56. Huang, H., et al., *Contribution of STAT3 and SMAD4 pathways to the regulation of hepcidin by opposing stimuli*. Blood, 2009. **113**(15): p. 3593-9.
57. Kemna, E., et al., *Time-course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS*. Blood, 2005. **106**(5): p. 1864-6.
58. Peyssonnaud, C., et al., *Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs)*. J Clin Invest, 2007. **117**(7): p. 1926-32.
59. Liu, Q., et al., *Hypoxia-inducible factor regulates hepcidin via erythropoietin-induced erythropoiesis*. J Clin Invest, 2012. **122**(12): p. 4635-44.
60. Bastin, J., et al., *Localisation of proteins of iron metabolism in the human placenta and liver*. Br J Haematol, 2006. **134**(5): p. 532-43.
61. Rehu, M., et al., *Maternal serum hepcidin is low at term and independent of cord blood iron status*. Eur J Haematol, 2010. **85**(4): p. 345-52.
62. Freeman, J.V., et al., *Cross sectional stature and weight reference curves for the UK, 1990*. Arch Dis Child, 1995. **73**(1): p. 17-24.
63. Cole, T.J., J.V. Freeman, and M.A. Preece, *British 1990 growth reference centiles for weight, height, body mass index and head circumference fitted by maximum penalized likelihood*. Stat Med, 1998. **17**(4): p. 407-29.
64. Shao, J., et al., *Maternal serum ferritin concentration is positively associated with newborn iron stores in women with low ferritin status in late pregnancy*. J Nutr, 2012. **142**(11): p. 2004-9.
65. Sweet, D.G., et al., *Cord blood transferrin receptors to assess fetal iron status*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2001. **85**(1): p. F46-8.
66. Siddappa, A.M., et al., *The assessment of newborn iron stores at birth: a review of the literature and standards for ferritin concentrations*. Neonatology, 2007. **92**(2): p. 73-82.
67. Berglund, S., et al., *Effects of iron supplementation on serum hepcidin and serum erythropoietin in low-birth-weight infants*. Am J Clin Nutr, 2011. **94**(6): p. 1553-61.
68. Pak, M., et al., *Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity*. Blood, 2006. **108**(12): p. 3730-5.

69. Nemeth, E., et al., *IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin*. J Clin Invest, 2004. **113**(9): p. 1271-6.
70. Lorenz, L., et al., *A review of cord blood concentrations of iron status parameters to define reference ranges for preterm infants*. Neonatology, 2013. **104**(3): p. 194-202.
71. Mando, C., et al., *Transferrin receptor gene and protein expression and localization in human IUGR and normal term placentas*. Placenta, 2011. **32**(1): p. 44-50.
72. Briana, D.D., et al., *Perinatal role of hepcidin and iron homeostasis in full-term intrauterine growth-restricted infants*. Eur J Haematol, 2013. **90**(1): p. 37-44.
73. Schwarz, P., et al., *A novel monoclonal antibody immunoassay for the detection of human serum hepcidin*. J Gastroenterol, 2011. **46**(5): p. 648-56.
74. Zipperer, E., et al., *Serum hepcidin measured with an improved ELISA correlates with parameters of iron metabolism in patients with myelodysplastic syndrome*. Ann Hematol, 2013.
75. Piperno, A., et al., *Modulation of hepcidin production during hypoxia-induced erythropoiesis in humans in vivo: data from the HIGHCARE project*. Blood, 2011. **117**(10): p. 2953-9.
76. Richalet, J.P., et al., *Control of erythropoiesis in humans during prolonged exposure to the altitude of 6,542 m*. Am J Physiol, 1994. **266**(3 Pt 2): p. R756-64.
77. Ashby, D.R., et al., *Erythropoietin administration in humans causes a marked and prolonged reduction in circulating hepcidin*. Haematologica, 2010. **95**(3): p. 505-8.
78. Eckardt, K.U., et al., *Rate of erythropoietin formation in humans in response to acute hypobaric hypoxia*. J Appl Physiol (1985), 1989. **66**(4): p. 1785-8.
79. Cuesta, A., J. Meseguer, and M.A. Esteban, *The antimicrobial peptide hepcidin exerts an important role in the innate immunity against bacteria in the bony fish gilthead seabream*. Mol Immunol, 2008. **45**(8): p. 2333-42.
80. Franz, A.R., et al., *Interleukin-8: a valuable tool to restrict antibiotic therapy in newborn infants*. Acta Paediatr, 2001. **90**(9): p. 1025-32.
81. Wu, T.W., et al., *The utility of serum hepcidin as a biomarker for late-onset neonatal sepsis*. J Pediatr, 2013. **162**(1): p. 67-71.
82. Cizmeci, M.N., et al., *Detection of cord blood hepcidin levels as a biomarker for early-onset neonatal sepsis*. Med Hypotheses, 2014. **82**(3): p. 310-2.
83. Orsi, N.M. and R.M. Tribe, *Cytokine networks and the regulation of uterine function in pregnancy and parturition*. J Neuroendocrinol, 2008. **20**(4): p. 462-9.
84. Malamitsi-Puchner, A., et al., *The influence of the mode of delivery on circulating cytokine concentrations in the perinatal period*. Early Hum Dev, 2005. **81**(4): p. 387-92.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. med. Axel Franz und Dr. med. Laila Lorenz.

Die Sammlung und Weiterverarbeitung der Blutproben sowie das Zusammen-tragen der Probandendaten wurde von mir durchgeführt. Die Messung der Hepcidinkonzentration erfolgte in La Jolla (Kalifornien, USA) bei Intrinsic LifeScience ILC. Die Messung der anderen Blutparameter erfolgte im Zentralla-bor der Universitätsklinik Tübingen durch PD Dr. med. Andreas Peter.

Die statistische Auswertung führte ich nach Beratung durch Dr. biol. hum. Co-rinna Engel (Center for Pediatric Clinical Studies (CPCS) der Universitäts-Kinderklinik Tübingen), Prof. Dr. med. Axel Franz sowie unter Anleitung durch Dr. med. Laila Lorenz durch.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weite-ren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, 04.08.2015

Johanna Herbst

8. Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Lorenz, L., Herbst, J., Engel, C., Peter, A., Abele, H., Poets, C. F., Westerman, M., Franz, A. R., Gestational age-specific reference ranges of hepcidin in cord blood. *Neonatology*, 2014. 106(2): p. 133-9.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich gerne bei einigen Menschen bedanken, die die Erstellung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Zuerst möchte ich Prof. Dr. med. Axel Franz für seine tatkräftige Unterstützung und seine stetigen aufmunternden und motivierenden Worte danken. Er war mir zu jeder Zeit eine große Hilfe und ich bin froh, dass ich diese Arbeit unter seine Betreuung erstellen durfte.

Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Laila Lorenz, die mir in jeder Phase mit Rat und Tat zur Seite stand. Sie beantwortete stets geduldig all meine Fragen und sorgte dafür, dass ich mich immer mit Freude an diese Zeit zurück erinnern werde.

Mein Dank gilt auch den Hebammen des Kreissaals sowie dem Team der Neonatologie für ihre tatkräftige Unterstützung beim Sammeln der Proben.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei Daniel Mörike bedanken, dass er zu jeder Zeit für mich da war, mir stets geduldig und helfend zur Seite stand und mich immer wieder ermutigte. Es ist wunderbar so einen Menschen an seiner Seite zu haben.

Abschließend möchte ich mich noch bei meiner Familie und meinen Freunden für die Liebe, die Unterstützung und das Vertrauen bedanken, dass sie mir stets entgegen gebracht haben. Ganz besonders gilt dieser Dank meinen Eltern, die mir dieses tolle Studium und somit auch das Erstellen dieser Arbeit erst ermöglicht haben.

Danke schön!