

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. W. E. Berdel -

**Deskriptive Untersuchungen zur Erythropoese bei schwerer
Malaria-Anämie**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

**Vorgelegt von Iris Appelmann
aus Münster**

2008

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster**

Dekan:

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. W. E. Berdel
2. Berichterstatter: PD Dr. C. Rössig

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2008

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A
- Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. W. E. Berdel -
Referent: Univ.- Prof. Dr. med. W. E. Berdel
Koreferentin: PD Dr. med. C. Rössig

Zusammenfassung

Deskriptive Untersuchungen zur Erythropoese bei schwerer Malaria-Anämie

Iris Appelmann

Die Malaria ist die Infektionskrankheit mit der weltweit höchsten Morbidität und Mortalität und somit die wichtigste parasitäre Erkrankung des Menschen. Es handelt sich um eine Protozoen-Infektion, die Erythrozyten befällt und durch den Biss der weiblichen Anopheles-Mücke übertragen wird. Die mit der Malaria assoziierten Todesfälle und schweren Verläufe der Erkrankung sind fast ausnahmslos auf Infektionen mit *Plasmodium falciparum* zurückzuführen, welches die sogenannte Malaria tropica auslöst.

Die zwei schwerwiegendsten Komplikationen der Malaria tropica sind die zerebrale Malaria und die schwere Malaria-Anämie. In vielen Regionen spielt die Malaria-Anämie als Komplikation insbesondere bei Kindern im Alter bis sechs Jahre eine sehr wichtige Rolle. Erschwerend ist sie aufgrund mangelhafter Transfusionsinfrastruktur oft nur unzureichend behandelbar.

Zwischen 2003 und 2005 wurde im Albert-Schweitzer-Krankenhaus in Lambaréné, Gabun, bei insgesamt 91 an Malaria tropica erkrankten Kinder im Alter von einem bis sechs Jahren die Pathogenese der schweren Malaria-Anämie untersucht. Die vorliegende Arbeit befasst sich in diesem Zusammenhang mit der Erythropoese bei Malaria-Anämie. Die Parasitämie und die Parasiteneliminationszeit sind nicht allein verantwortlich für das Ausmaß der Anämie. Retikulozytenzahlen im peripheren Blut steigen adäquat und zeitgerecht an. Ein Eisenmangel und dessen Folgen konnten als Anämieursache ausgeschlossen werden. Im Knochenmark der schwer anämischen Patienten finden sich Zell-Zell-Wechselwirkungen und ein unbekannter Faktor, wodurch die Erythropoese gesteigert wird. Dies ist durch Zytokinzusätze nicht reproduzierbar. Insgesamt ist zytologisch eine gesteigerte Erythropoese mit stark ausgeprägter Dyserythropoese erkennbar. Auf der Ebene der Erythropoese lässt sich allerdings die Schwere der Anämie nicht allein erklären, sondern auch die Faktoren Erythrophagozytose und Hämolyse spielen eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese der schweren Malaria-Anämie.

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2008

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	S. 4
<u>1. Einleitung</u>	S. 6
1.1 Allgemeines zur Malaria tropica	S. 6
1.1.1 Epidemiologie	S. 6
1.1.2 Lebenszyklus von Plasmodien und Ätiologie der Erkrankung	S. 8
1.1.2.1 <i>Präerythrozytäre Entwicklung</i>	S. 8
1.1.2.2 <i>Erythrozytäre asexuelle Entwicklung</i>	S. 9
1.1.2.3 <i>Sexuelle Entwicklung in der Mücke</i>	S. 9
1.1.3 Immunität	S. 9
1.1.4 Pathophysiologie	S. 10
1.1.4.1 <i>Zytokine</i>	S. 10
1.1.4.2 <i>Sequestrierung</i>	S. 12
1.1.4.3 <i>Zytoadhärenz</i>	S. 13
1.1.5 Klinik	S. 13
1.1.6 Diagnostik	S. 14
1.1.7 Therapie	S. 14
1.2 Allgemeines zur Erythropoese	S. 15
1.2.1 Erythroide Differenzierung von pluripotenten Stammzellen	S. 16
1.2.2 Erythroide Progenitorzellen	S. 16
1.2.2.1 <i>BFU-E</i>	S. 17
1.2.2.2 <i>CFU-E</i>	S. 18
1.2.3 Späte erythroide Vorläuferzellen	S. 19
1.2.4 Regulation und Kontrolle der Erythropoese	S. 20
1.2.4.1 <i>Sauerstoffpartialdruck</i>	S. 20
1.2.4.2 <i>Erythropoetin</i>	S. 21
1.3 Allgemeines zu Anämien	S. 22
1.4 Die schwere Malaria-Anämie	S. 23
1.4.1 Definition	S. 23
1.4.2 Epidemiologie	S. 24
1.4.3 Pathogenese	S. 25
1.4.4 Klinik	S. 26

1.4.5	Diagnostik	S. 26
1.4.6	Therapie	S. 27
1.5	Hypothese und Fragestellung	S. 28
<u>2.</u>	<u>Studie, Patienten und Methoden</u>	S. 29
2.1	Klinische Studie und Patienten	S. 29
2.1.1	Studiendesign	S. 29
2.1.2	Studienort	S. 29
2.1.3	Patienten	S. 30
2.1.4	Studienprotokoll	S. 31
2.1.4.1	<i>Ein- und Ausschlusskriterien</i>	S. 31
2.1.4.2	<i>Diagnostik</i>	S. 32
2.1.4.3	<i>Therapie</i>	S. 33
2.1.4.4	<i>Probengewinnung</i>	S. 33
2.1.4.5	<i>Follow Up</i>	S. 34
	Tabellarische Zusammenfassung	S. 34
2.2	Material	S. 35
2.2.1	Geräte	S. 35
2.2.2	Verbrauchsmaterialien	S. 35
2.2.3	Chemikalien	S. 35
2.2.4	Zusätze	S. 36
2.2.5	Patientenproben	S. 36
2.3	Methoden	S. 36
2.3.1	Dicker Tropfen	S. 36
2.3.2	Blutausstrich	S. 37
2.3.3	Differentialblutbild	S. 37
2.3.4	Retikulozytenzählung	S. 38
2.3.5	Knochenmarkpunktion	S. 38
2.3.6	Knochenmarkausstriche	S. 39
2.3.7	Gradientenzentrifugation zur Zellseparation	S. 39
2.3.8	Klonales Wachstum in Methylcellulose (Colony Assay)	S. 40
2.3.9	Erythropoetin-Bestimmung	S. 41

2.3.10 Eisen-Bestimmung	S. 41
2.3.11 Statistik	S. 42
<u>3. Ergebnisse</u>	S. 43
3.1 Allgemeines	S. 43
3.2 Flussdiagramm der Studie	S. 43
3.3 Patientencharakteristika	S. 44
3.4 Untersuchung peripheren Bluts	S. 45
3.4.1 Parasitämie	S. 46
3.4.2 Hämoglobin	S. 47
3.4.3 Retikulozyten	S. 47
3.4.4 Erythropoetin-Spiegel	S. 49
3.4.5 Eisenstoffwechsel	S. 51
3.5 Untersuchung des Knochenmarks	S. 53
3.5.1 Koloniewachstum in Methylcellulose	S. 53
3.5.2 Darstellung der Erythropoese in der Zytologie	S. 55
<u>4. Diskussion</u>	S. 61
<u>5. Literaturverzeichnis</u>	S. 69
<u>6. Danksagung</u>	S. 73
<u>7. Lebenslauf</u>	S. 74

Abkürzungsverzeichnis

A.	Anopheles
ACD	Anemia of chronic disease (Anämie chronischer Erkrankungen)
a.e.	am ehesten
BFU	Burst forming unit
BM	Bone marrow (Knochenmark)
BSA	Bovin Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
CD	Cluster of Differentiation (Differenzierungsantigen)
CFR	Case-Fatality-Rate
CFU	Colony forming unit (Kolonie bildende Einheit)
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Epo	Erythropoetin
EpoR	Erythropoetinrezeptor
FACS	Fluorescence-activated cell scanning
FCM	Flow cytometry (Durchflusszytometrie)
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GpA	Glycophorin A
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HAS	Hôpital Albert Schweitzer (Albert-Schweitzer-Krankenhaus)
Hb	Hämoglobin
HbF	fetales Hämoglobin
HBV	Hepatitis B-Virus
HCV	Hepatitis C-Virus
HIF	Hypoxia inducible factor
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
Hkt	Hämatokrit
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KM	Knochenmark
n.s.	nicht signifikant
P.	Plasmodium

PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaktion (Polymerase-Kettenreaktion)
PDW	Platelet distribution width (Thrombozytenverteilungsbreite)
P.f.	Plasmodium falciparum
PO2	Sauerstoffpartialdruck
RA	Rheumatoide Arthritis
RBC	Red blood cell (Erythrozyt)
RDW	Red cell distribution width (Erythrozytenverteilungsbreite)
RPM	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale RNA
SMA	Schwere Malaria-Anämie
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	unter anderem
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
zvad-fmk	zvad-Fluoromethylketone

1. Einleitung

1.1 Allgemeines zur Malaria tropica

Die Malaria ist eine Protozoen-Infektion, die Erythrozyten befällt und durch den Biss der weiblichen Anopheles-Mücke übertragen wird (Manson 2002; Miller 2002). Es gibt vier verschiedene, regional unterschiedlich verbreitete Spezies von Malaria-Parasiten, die den Menschen infizieren können: *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium falciparum*.

Die mit der Malaria assoziierten Todesfälle und schweren Verläufe der Erkrankung sind fast ausnahmslos auf Infektionen mit *Plasmodium falciparum* zurückzuführen, welches die sogenannte Malaria tropica auslöst. Die durch die anderen drei Plasmodien-Spezies ausgelösten Erkrankungen zeichnen sich in den meisten Fällen durch einen milderen Verlauf aus.

Malaria wird in Ländern, in denen die Erkrankung endemisch ist, für eine Erniedrigung des jährlichen Wirtschaftswachstums von etwa 1,3 Prozent verantwortlich gemacht (Sachs 2001). Insgesamt wirken sich wiederholte Malaria-Infektionen und besonders Komplikationen wie Anämie oder zerebrale Malaria auch langfristig negativ auf die Entwicklung von Kindern aus (Walker 2007).

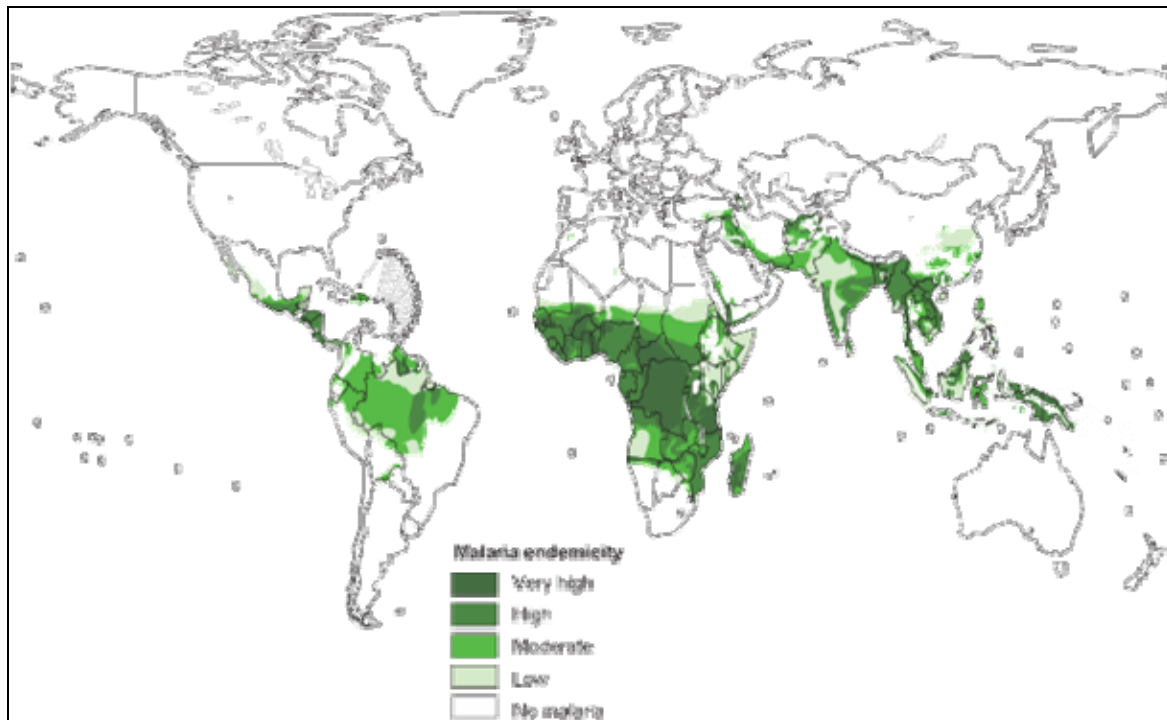


Abb 1: Verbreitung und Epidemiologie der Malaria tropica, modifiziert nach WHO, (WHO 2005)

1.1.1 Epidemiologie

Die Malaria ist die Infektionskrankheit mit der weltweit höchsten Morbidität und Mortalität und somit die wichtigste parasitäre Erkrankung des Menschen (WHO 2003). Dieses zeigt sich vor allem daran, dass pro Jahr etwa 500 Millionen Menschen daran erkranken und bis zu 2,5 Millionen daran versterben, darunter vor allem Kinder unter sechs Jahren im tropischen Afrika. Etwa 60 Prozent aller klinischen Malaria-Erkrankungen und 80 Prozent aller Todesfälle durch Malaria ereignen sich in Afrika südlich der Sahara. Obwohl die Erkrankung in Europa, Russland und dem nördlichen Asien seit Mitte des 20. Jahrhunderts als ausgerottet gilt, nimmt die Zahl der Erkrankten weltweit kontinuierlich zu. Die Mortalität von Kindern mit Malaria tropica hat sich seit 1980 etwa verdoppelt (Korenromp 2003). Dies erklärt sich durch eine Zunahme von Resistenzen der Parasiten gegen Anti-Malaria-Medikamente sowie durch verspätete Reaktionen v.a. afrikanischer Staaten auf aktualisierte Therapieempfehlungen (Hastings 2007). Weiterhin stellt auch die Resistenzentwicklung der Anopheles-Mücke gegen Insektizide ein zunehmendes Problem dar (Ambroise-Thomas 2004). Von den etwa 400 Anopheles-Arten können nur etwa 80 eine Malaria übertragen. Das Überleben und die Vermehrung von Anophelesmoskitos ist an Wasser gebunden, sodass Transmissionsraten der Malaria in der Regenzeit ansteigen. Mit steigender Zahl an Flugreisen in tropische Länder steigt auch die Zahl von nach Europa importierten Malariaerkrankungen und stellt somit auch hier ein zunehmendes Problem dar (Ladhani 2007).

1.1.2 Lebenszyklus von Plasmodien und Ätiologie

1.1.2.1 Präerythrozytäre Entwicklung

Eine weibliche Anopheles-Mücke injiziert aus ihrer Speicheldrüse beim Stich eines Menschen bis zu 100 sogenannte Sporozoiten, bevor sie Blut aspiriert. Diese gelangen entweder direkt oder über die Lymphe ins periphere Blut. Innerhalb von 45 Minuten invadieren die Sporozoiten Hepatozyten und können sich in ihnen vermehren. Es entwickelt sich ein Schizont, welcher rupturiert und dann Merozoiten in die Blutbahn entlässt. Diese erste asexuelle Vermehrung in der Leber dauert bei *Plasmodium falciparum* 5,5 Tage. Insgesamt werden aus einem platzenden hepatischen Schizont mehrere Tausende Merozoiten entlassen. Weil aber zuvor nur einige Hepatozyten infiziert wurden, verläuft diese Phase für den Menschen asymptomatisch (Manson 2002).

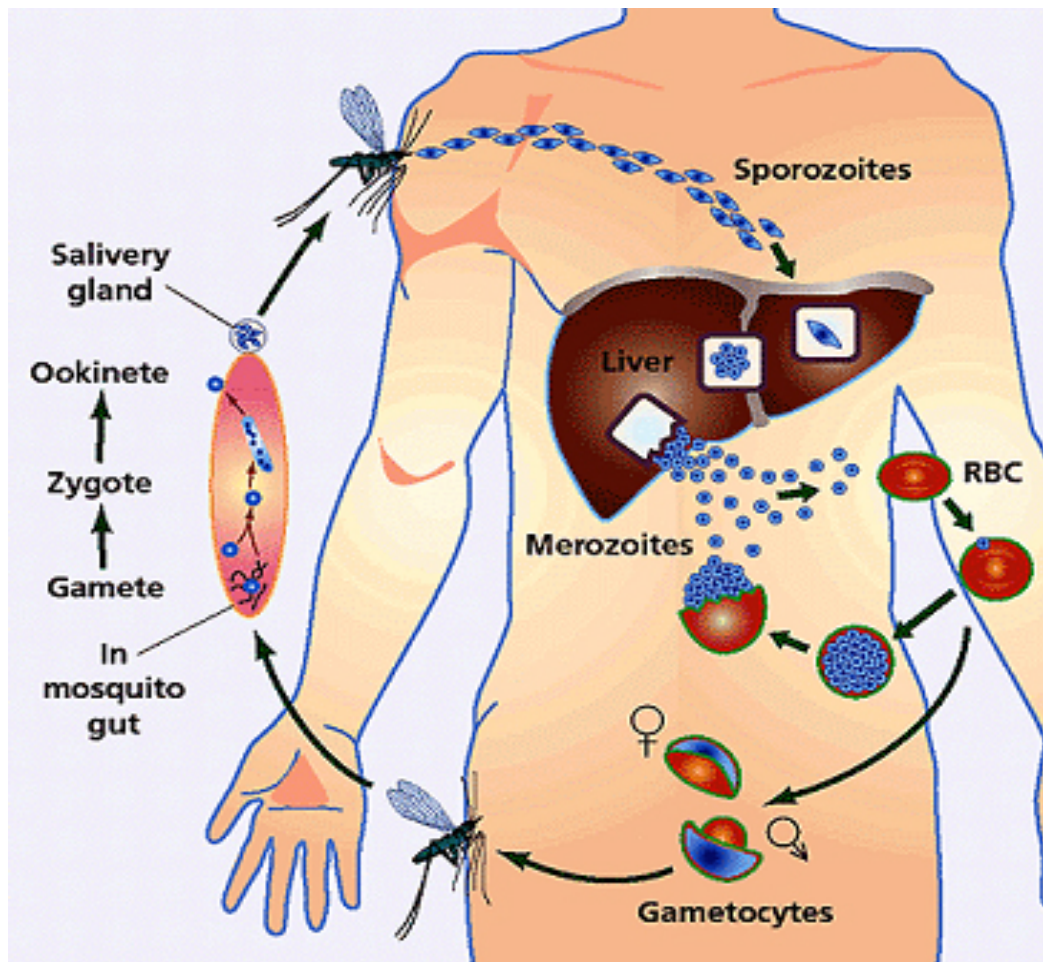


Abb. 2: Lebenszyklus von Plasmodien (vor allem *Plasmodium falciparum*)

1.1.2.2 *Erythrozytäre asexuelle Entwicklung*

Die ovoiden, beweglichen Merozoiten können sehr schnell Erythrozyten invadieren. Dazu müssen sie mit dem sogenannten apikalen Komplex an die Zellmembran andocken und sich mit einer bohrenden Bewegung in die Membran einstülpen, sodass sie sich im Erythrozyten in einer abgeschlossenen Vakuole (parasitophore Vakuole) befinden. Die Bindung an die Erythrozytenoberfläche geschieht bei *Plasmodium falciparum* über Sialinsäure und GpA. Innerhalb des Erythrozyten entwickeln sich die Merozoiten weiter zu Trophozoiten, deren charakteristische Ringform man im Lichtmikroskop erkennen kann. Die Trophozoiten entwickeln sich zu Blutschizonten, welche rupturieren und aus denen erneut Merozoiten in die Blutbahn gelangen. Schließlich endet die asexuelle Entwicklung, indem sich Merozoiten zu männlichen (Mikro-) und weiblichen (Makro-) Gametozyten entwickeln. Dieses wird beispielsweise durch eine Veränderung des pH-Werts und der Bikarbonatkonzentration als Folge der Infektion induziert. Die Mikro- und Makrogametozyten werden bei einem erneuten Stich der weiblichen Anopheles-Mücke in die Mücke aufgenommen. Dort beginnt der sexuelle Vermehrungszyklus. Die asexuelle Entwicklung dauert insgesamt 48h.

1.1.2.3 *Sexuelle Entwicklung in der Mücke*

Im Mitteldarm der Mücke wird der die Gametozyten noch immer umgebende Erythrozyt mechanisch durch Darmbewegungen und chemisch durch Verdauungsenzyme zerstört. Die Mikrogameten durchlaufen den Prozeß der Exflagellation und befruchten anschließend die Makrogameten. Es entwickelt sich eine Zygote, später ein Ookinet, der die Darmwand des Moskitodarms durchdringt und sich zur Oozyste entwickelt. Diese bewegt sich über die Hämolymphe in die Speicheldrüse des Moskitos. Dort kann die weitere Entwicklung zum Sporozoiten geschehen. Sporozoiten werden dann beim nächsten Stich möglicherweise wieder in den Wirt injiziert (Manson 2002; Miller 2002).

1.1.3 **Immunität**

Anders als bei einigen viralen oder bakteriellen Erkrankungen oder nach Impfungen kann sich eine vollständige Immunität gegen Malaria nicht entwickeln, da es zu viele verschiedene lokale Plasmodien-Stämme gibt. Durch wiederholte Infektionen in holo- oder hyperendemischen Gebieten ergibt sich aber gerade bei kleinen Kindern eine erhebliche Morbidität und Mortalität. Gleichzeitig kann sich aber auch durch diese wiederholten

Infektionen eine partielle Immunität (sog. „preimmunity“) entwickeln, durch die erneute Infektionen zwar nicht verhindert werden, aber nicht oder nur selten zu schweren Symptomen oder zum Tod führen. Diese Art Immunität entwickelt sich bei Kindern verhältnismäßig langsam als Funktion des Alters. Im Gegensatz dazu können bisher nicht infizierte Erwachsene, die in ein Holoendemie-Gebiet kommen, eine solche „preimmunity“ schneller entwickeln.

Während der akuten Infektion spielen sowohl unspezifische, als auch spezifische Abwehrmechanismen eine Rolle. Spezifische Antikörper verhindern die Ausbreitung der Erkrankung durch Agglutination von Merozoiten und durch Bindung an parasitierte Erythrozyten sowie durch Aktivierung deren Fc-Rezeptoren. Bei der unspezifischen Immunantwort spielen vor allem Phagozytose über CD36 an der Zelloberfläche von Monozyten und Makrophagen, proinflammatorische Zytokine und die Aktivierung von Neutrophilen eine Rolle. Aktivierte Neutrophile setzen parasitizide Sauerstoffradikale und Stickoxide frei. Des Weiteren ist der Abbau parasitierter Erythrozyten in der Milz gesteigert durch eine erhöhte Filtration (verminderte Elastizität parasitierter Erythrozyten) und Fc-vermittelte Erythrophagozytose

1.1.4 Pathophysiologie

Die Krankheit und die Schwere der Symptomatik sind Resultat aus Abbau von Erythrozyten und Hämoglobin, Freisetzung von erythrozytärem und parasitärem Material und der daraus resultierenden Antwort des Wirts auf diese Ereignisse (Wickramasinghe and Abdalla 2000; Manson 2002; Miller 2002; Stauffer and Fischer 2003; Goldberg 2005; Min-Oo and Gros 2005).

1.1.4.1 Zytokine

Lange Zeit war nicht klar, wie Plasmodien, die nahezu ausschließlich innerhalb von Erythrozyten leben, Gewebeschäden und biochemische Veränderungen auslösen können. Die Theorie eines Parasitentoxins, das diesen gewebeschädigenden Effekt haben sollte, wurde vor einigen Jahren verlassen zugunsten der Theorie, dass der Wirt selbst Proteine sezerniert als Reaktion auf Plasmodien: Zytokine oder Zellbotenstoffe.

Zytokine sind Zellbotenstoffe aus Makrophagen, T-Zellen und NK-Zellen, und sind wichtige Mediatoren zur interzellulären Kommunikation bei verschiedensten Infektionen.

Im Tiermodell (Maus) und wahrscheinlich auch beim Menschen werden von den beiden Untergruppen der CD4-positiven Lymphozyten, Th-1 und Th-2-Zellen, wichtige Zytokine

ausgeschüttet. Th-1-Zellen produzieren v.a. $\text{IFN}\gamma$, IL-2 und $\text{TGF}\beta$. Diese wiederum aktivieren Makrophagen und leisten damit indirekt einen Beitrag zur folgenden Produktion von proinflammatorischen, zytotoxischen Zytokinen wie $\text{TNF}\alpha$, IL-1 und IL-6. Th-1-Antworten sind also unabdingbar für eine effektive Abwehr bei der Akute-Phase-Reaktion.

Th-2-Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-10, IL-13. Diese induzieren einerseits eine starke Antikörper-Produktion durch B-Zellen und haben andererseits einen inhibitorischen Effekt auf viele Makrophagen-Funktionen. Bei Überwiegen der Th-2-Antwort ist somit die Empfänglichkeit für die Erkrankung erhöht und der Krankheitsverlauf schwerer. Eine zentrale Frage ist nun, wie ein Gleichgewicht zwischen Th-1- und Th-2-Antwort aufrechterhalten wird bzw. wie bei einer Infektion mit Plasmodien die Immunantwort des Wirts in Richtung Th-1 oder Th-2 gelenkt wird. Viele Faktoren scheinen Einfluss darauf zu haben: physikochemische Eigenschaften, Dosis und Persistenz des Antigens, der Ort der Antigen-Exposition, der Genotyp und der Immunstatus des Wirts. Außerdem regulieren $\text{TGF}\beta 1$ und IL-12 das Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen. Die $\text{TGF}\beta 1$ und IL-12-Spiegel liegen bei unkomplizierter Malaria höher als bei einer schweren Erkrankung (McDevitt 2004).

Eine gesteigerte Produktion von Th-1-Zytokinen, insbesondere $\text{TNF}\alpha$ und Stickoxiden scheint bei der Pathogenese der zerebralen Malaria wie auch bei der Entwicklung einer KM-Depression, Dyserythropoese, Erythrophagozytose und Anämie bei Malaria eine wichtige Rolle zu spielen (Anstey, Granger et al. 1999), (Clark and Chaudhri 1988).

Die Menge an freigesetztem IL-10, welches ein sehr potentes antiinflammatorisches Th-2-Zytokin ist, ist bei schwerer Malaria deutlich erhöht, wird allerdings im Falle einer letztlich tödlich verlaufenden Erkrankung nicht ausreichend produziert, um die Folgen von zirkulierendem $\text{TNF}\alpha$ zu antagonisieren. Bei mildereren Verläufen der Malaria-Anämie finden sich häufig erhöhte Spiegel von $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-6 und IL-10 (Wenisch, Parschalk et al. 1995). Unerwartet niedrige IL-10-Spiegel wurden bei Kindern mit schwerer Malaria-Anämie in einzelnen Studien beschrieben (Kurtzhals, Adabayeri et al. 1998).

Im Mausmodell löst die Injektion von rekombinantem $\text{TNF}\alpha$ eine Dyserythropoese aus, welche sich durch anti- $\text{TNF}\alpha$ -Antikörper (Remicade®) wieder antagonisieren lässt .

Erhöhte Spiegel von $\text{TNF}\alpha$ sind assoziiert mit der Entwicklung von ineffektiver Erythropoese bzw. Dyserythropoese bei einer Infektion mit *Plasmodium falciparum* (McDevitt 2004). Bei Patienten mit metastasierten Karzinomkrankungen führt die Gabe von $\text{TNF}\alpha$ zu einer Anämie. $\text{TNF}\alpha$ scheint einen direkten inhibitorischen Einfluss auf BFU-Es zu haben während der Einfluss auf CFU-Es auf indirektem Wege geschieht (McDevitt 2004).

Die $\text{TNF}\alpha$ / IL-10 – Ratio war bei Kindern mit schwerer Malaria-Anämie wesentlich höher als bei Kindern mit milden Verläufen. Dies legt nahe, dass eine inadäquate Erhöhung des IL-10-Spiegels bei bereits erhöhtem $\text{TNF}\alpha$ -Spiegel eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der schweren Malaria-Anämie spielt (Kurtzhals, Adabayeri et al. 1998; Othoro, Lal et al. 1999; May, Lell et al. 2000; Doodoo, Omer et al. 2002; Li, Sanni et al. 2003).

Auch bezüglich eines verfrühten Abbaus von RBCs sind Zytokine von besonderer Wichtigkeit. So kann Fieber innerhalb weniger Tage zu einer Veränderung der rheologischen Eigenschaften mit vermehrter Membran-Rigidität und somit zum vorzeitigen Abbau im RHS führen (Day, Hien et al. 1999).

Zytokine haben auch einen direkten Einfluß auf die Erythropoese: IL-1, $\text{TNF}\alpha$ (und $\text{TGF}\beta$ je nach Studie) haben einen inhibitorischen Effekt auf die Produktion von Epo als wichtigstem Regulator der Erythropoese, IL-6 dagegen stimuliert sie (Jr, Olsen et al. 1989; Jr and Krantz 1991; Jelkmann, Pagel et al. 1992).

Die vielfältigen Wirkungen von Zytokinen beinhalten auch die Hochregulation endothelialer Gefäßwandliganden (ICAM1). Dadurch kommt es zu einer vermehrten Zytoadhärenz von parasitierten Erythrozyten an der Gefäßwand mit resultierenden Störungen der Mikrozirkulation. Durch Aktivierung von Leukozyten zur Ausschüttung von Sauerstoffradikalen, Stickoxiden und Fettoxyden wirken sie indirekt parasitizid. Somit sind also die Zytokine, die in hohen Konzentrationen schweren Schaden anrichten können, in geringer Konzentration von wahrscheinlich enormer Wichtigkeit für die Abwehr von Plasmodien (McDevitt 2004)

Alle oben erwähnten Zellbotenstoffe sind essentiell für die malaria-typische Symptomatik, v.a. für Fieber und generelles Unwohlsein (Kwiatkowski and Bate 1997). Bei *P.vivax*, wo sich die zeitliche Synchronisierung schneller einstellt als bei anderen Plasmodien Spezies, kann eine pulsatorische Ausschüttung von $\text{TNF}\alpha$ direkt nach der Ruptur von Blutschizonten beobachtet werden. Es gibt eine positive Korrelation zwischen der Menge an freigesetzten Zytokinen und der Prognose bei *Plasmodium falciparum*-Malaria (McDevitt 2004).

1.1.4.2 Sequestrierung

Ein wesentlicher pathogenetischer Faktor der Malariaerkrankung ist die sogenannte Sequestrierung von Parasiten. Das bedeutet, dass sich parasitierte Zellen an das Endothel von Kapillaren und v.a. Venolen anheften und ins umgebende Gewebe austreten können. Die Anzahl von Parasiten, die sich insgesamt im Körper befinden, korreliert also nicht mit den im Blut lichtmikroskopisch sichtbaren Parasiten. Ein Teil der Parasiten befindet sich sequestriert

in anderen Geweben, etwa in der weißen Hirnsubstanz. Daraus resultieren beispielsweise Mikrozirkulationsstörungen und Ödembildung.

In der ersten Hälfte des asexuellen Vermehrungszyklus von *Plasmodium falciparum* ist bereits zu beobachten, dass reifere Parasitenformen nicht mehr im peripheren Blut gefunden werden, sich also sequestriert im Gewebe befinden. Findet man sie dennoch im peripheren Blut, so ist dies als Indikator für eine schwere Infektion anzusehen.

Der Prozess der Sequestrierung läuft nicht in allen Organen gleichmäßig ab. Am häufigsten findet man sequestrierte Parasiten im Gehirn (v.a. in der weißen Substanz), im Herzen, in den Augen, in der Leber und den Nieren. Die Rolle und das Ausmaß von Sequestrierung im KM ist bislang nicht geklärt. Es gibt aber Hinweise darauf, dass im Knochenmark sequestrierte Parasiten eine Rolle bei der Entwicklung einer Dyserythropoese spielen (Wickramasinghe 1987).

1.1.4.3 Zytoadhärenz

Zytoadhärenz wird durch einige verschiedene Faktoren vermittelt, von denen eine wichtige Rolle das PfEMP1 hat, das *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1. PfEMP1 wird innerhalb des Parasiten transkribiert, synthetisiert und gelagert. Etwa 12 h nach Eindringen des Parasiten in den Erythrozyten wird erstmals das PfEMP1 an der Oberfläche der Erythrozyten exprimiert. An der Oberfläche bilden sich sogenannte knobs, mit denen die Adhäsion wohl vereinfacht wird, die aber nicht essentiell dafür sind. Parasitierte Erythrozyten können damit am Gefäßendothel anheften und somit Sequestrierung erleichtern und zu Störungen der Mikrozirkulation führen.

1.1.5 Klinik

Säuglinge entwickeln nur selten eine schwere Malaria. Dies liegt v.a. an von der Mutter übertragenen Immunglobulinen und an dem noch hohen Anteil von HbF in ihrem Hämoglobin. HbF verlangsamt die Entwicklung der Malariaparasiten, da diese HbF und auch andere Hb-Varianten schlechter oder nicht für den zu ihrem Überleben wichtige Hämoglobin-Katabolismus nutzen können (Pasvol 1977; Fried, Nosten et al. 1998; Goldberg 2005; Min-Oo and Gros 2005). Bei kleinen Kindern wird als Komplikation v.a. die schwere Anämie beobachtet, während mit zunehmendem Alter die zerebrale Malaria und das akute Nierenversagen als Komplikationen an Bedeutung gewinnen (Brewster 1990).

In Abhängigkeit vom Immunstatus des Wirtes reicht die klinische Ausprägung der Malaria von asymptomatischer Parasitämie bis hin zu fulminanten Verlaufsformen mit Beteiligung

von Gehirn, Nieren und anderen inneren Organen. Hauptsymptom ist wiederkehrendes hohes Fieber. Dieses wird häufig begleitet von Allgemeinsymptomen wie Schüttelfrost, Schweißausbrüchen, Kopf-, Bauch-, Rücken- und Muskelschmerzen, Appetitlosigkeit, allgemeiner Leistungsschwäche und Erbrechen. Häufig tritt bei einer Malaria-Infektion eine Splenomegalie manchmal erheblichen Ausmaßes auf. Patienten sind außerdem durch sekundäre Infektionen und Gerinnungsstörungen gefährdet.

1.1.6 Diagnostik

Die Diagnose einer Malaria wird anhand verschiedener Kriterien gestellt. Zum einen ist eine ausführliche Anamnese und körperliche Untersuchung notwendig. Zum anderen sind z.T. sehr einfach durchzuführende Tests schnell wegweisend, insbesondere der sogenannte „Dicke Tropfen“. Wenn im „Dicken Tropfen“ keine Parasiten nachzuweisen sind, wird diese Untersuchung zunächst in täglichen Abständen wiederholt für insgesamt drei Tage. Ist dann nach wie vor kein Parasitennachweis erfolgt, so ist eine Malariainfektion mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen. Veränderungen im Blutbild oder Differentialblutbild können ebenfalls ein Hinweis für eine Erkrankung sein. Wichtig ist unter Umständen auch die Klinische Chemie. Hier sind beispielsweise ein Bilirubinanstieg, eine Hypoglykämie und eine Laktatazidose Anzeichen für einen komplizierten Verlauf der Erkrankung. Auch Gerinnungsstörungen sind nicht selten bei schweren Verläufen einer Malaria nachweisbar. Bei der Malaria-Diagnostik kommen aber auch Methoden wie PCR und immunologische Tests zum Tragen (Manson 2002; Stauffer and Fischer 2003).

1.1.7 Therapie

Grundsätzlich stehen zur Therapie einer Malaria einige verschiedene Substanzen zur Verfügung. Diese sollten optimalerweise in Abhängigkeit der Plasmodienspezies und deren Resistenzlage, sowie der Schwere der Klinik ausgewählt werden. Leider ist allerdings vielerorts die Medikamentenauswahl eingeschränkt und damit eine optimale Therapie nicht möglich. Optimalerweise sollte die Malariatherapie als Kombination von Präparaten mit unterschiedlichen Wirkmechanismen durchgeführt werden, da hierdurch die Gefahr der Resistenzentwicklung minimiert werden kann (s. Abb. 3).

Medikamente zur Malariatherapie lassen sich in drei große Gruppen unterteilen: Arylaminoalkohole (z.B. Chinin, Chloroquin, Amodiaquin, Mefloquin, Halofantrine, Lumefantrine), Antifolate (z.B. Pyrimethamin, Proguanil, Trimethoprim) und Artemisinin-Derivate (z.B. Artemisinin, Artemether, Artesunate). Letztere gehören zu den

bestverträglichen und effektivsten Antimalariapräparaten. Bei Gabe von Artemisinin-Derivaten ist die Gefahr der Resistenzentstehung am geringsten. Bei der unkomplizierten Malaria steht die Therapie mit Medikamenten aus diesen drei Gruppen im Vordergrund, während bei komplizierten Formen in den meisten Fällen zusätzlich eine umfangreiche supportive Therapie und intensivmedizinische Überwachung durchgeführt werden muss. Hierzu gehören eine ausreichende Substitution von Flüssigkeit, Bluttransfusionen bei Anämie und drohendem Kreislaufversagen, eine medikamentöse oder physikalische Senkung der Körpertemperatur, Korrektur einer eventuell vorliegenden Hypoglykämie bzw. Hyperlaktatämie sowie die Behandlung Malaria-assoziiierter Komplikationen (Nierenversagen, Lungenödem, bakterielle Superinfektionen). Ebenso kann der Einsatz von Antikonvulsiva und Antiemetika notwendig sein. (WHO 2000)

In der vorliegenden Studie wurden die Patienten mit einer Kombinationstherapie aus Chinin und Clindamycin behandelt. Diese Therapie wurde zuvor in der Studienpopulation als besonders wirksam getestet. (Kremsner, Radloff et al. 1995)

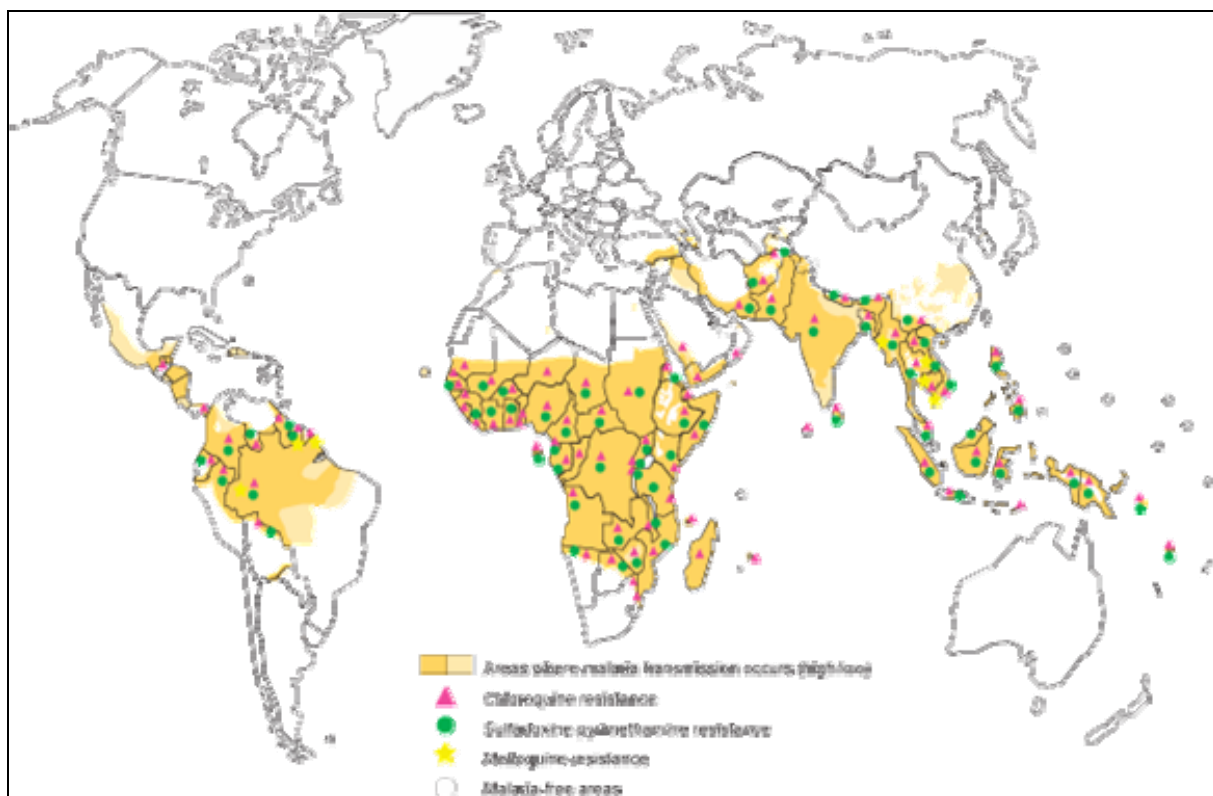


Abb. 3: Verbreitung der Malaria, Aufschlüsselung der Resistenzen gegen Anti-Malaria-Medikamente in verschiedenen Regionen, modifiziert nach WHO, (WHO 2005)

1.2 Allgemeines zur Erythropoese

Der Begriff Erythropoese bezeichnet die Bildung von Erythrozyten im Knochenmark. Dieser Prozess kann in verschiedene Phasen unterteilt werden. Zunächst müssen pluripotente Vorläuferzellen beginnen, sich erythroid zu differenzieren. Es folgen eine frühe, Erythropoetin-unabhängige Entwicklungsphase und eine späte, Erythropoetin-abhängige Phase. Die Rate der Erythrozytenproduktion ist normalerweise so limitiert, dass die Gesamtmenge an Erythrozyten im Körper konstant bleibt. Dieses erfordert eine genaue Kontrolle der Erythropoese, deren Mechanismen bislang v.a. für die späte Phase der Erythropoese untersucht sind. Während dieser Phase ist das Glykoprotein Erythropoetin (Epo) der hauptsächliche humorale Regulationsfaktor.

Die Erythropoese verläuft über einige zelluläre Zwischenstufen. Alle diese Zellen werden unter dem Begriff Erythron zusammengefasst. Das Erythron kann als eine funktionelle Einheit gesehen und werden und daher als Gewebe gelten (Wintrobe, Greer et al. 2004).

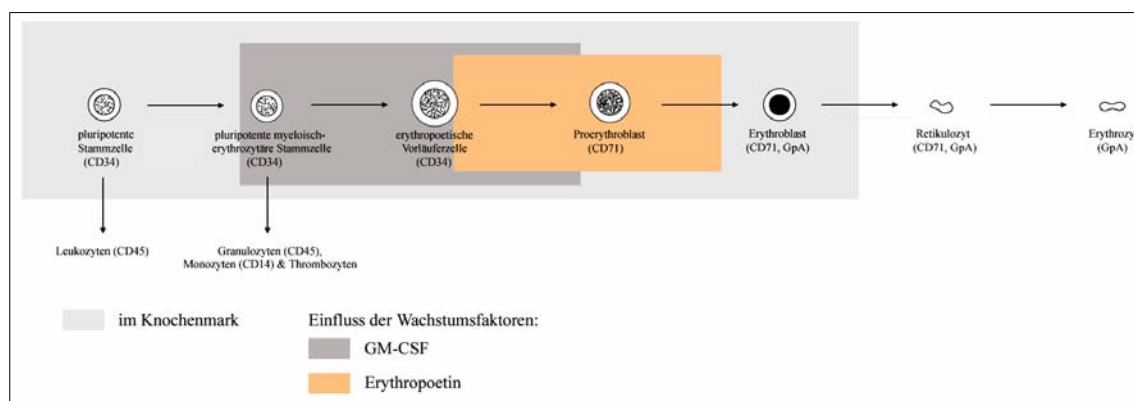


Abb. 4: Erythropoese, modifiziert nach Koury,(Koury, Sawyer et al. 2002)

1.2.1 Erythroide Differenzierung von pluripotenten Stammzellen

Im Knochenmark existieren Zellen, die sowohl die Fähigkeit zu Selbsterneuerung, als auch die Fähigkeit zur Produktion von Vorläuferzellen mit dem Potential zur Differenzierung in Erythrozyten, Megakaryozyten und Granulozyten haben. Diese Zellen bilden Kolonien *in vitro*, sodass man sie als colony forming unit (CFU) benannt hat (Till and McCulloch 1964).

Es gibt drei Theorien, die zu erklären versuchen, warum eine bestimmte Vorläuferzelle sich in eine bestimmte reife Zelle entwickelt. Die erste, „stochastische“ Theorie geht davon aus, dass das Einschlagen eines Differenzierungsweges ein zufälliges Ereignis ist. Folgte man dieser Theorie, so hätten Regulationsfaktoren der Hämatopoese erst in der späteren Phase der

Reifung Einfluss auf Zellwachstum und Entwicklung. (Till and McCulloch 1964). Die zweite Theorie (hematopoietic-inductive micro-environment) schlägt vor, dass Hämatopoese vor allem durch die Umgebung der einzelnen Zellen induziert und beeinflusst wird (Curry and Trentin 1967). Dass erythroide Differenzierung allein abhängig von humoralen Faktoren ist, wird von der dritten Theorie angenommen (VanZant and Goldwasser 1977; VanZant and Goldwasser 1979).

1.2.2 Erythroide Progenitorzellen

Die Unterscheidung der einzelnen Vorläuferzellen kann nicht allein morphologisch geschehen, sondern muss nach funktionellen Gesichtspunkten, wie der Fähigkeit, in vitro Erythroblasten-Kolonien zu bilden, erfolgen. Danach lassen sich Colony-forming units erythroid (CFUe) und Burst-forming units erythroid (BFUe) unterscheiden. Diese Vorläufer wachsen in halbfesten Kulturmedien und bilden Kolonien aus gut hämoglobinierten Erythroblasten.

1.2.2.1 BFU-E:

BFU-Es sind im Vergleich zu CFU-Es wesentlich unreifer. Sie ähneln insgesamt eher pluripotenten Stammzellen, sind beispielsweise ähnlich groß und befinden sich nur zu einem sehr geringen Teil in der S-Phase des Zellzyklus. BFU-Es sind morphologisch sehr unreifen Blasten ähnlich, haben ein leicht basophiles Zytoplasma mit wenig Pseudopodien, sehr feines Chromatin und große Nucleoli. BFU-Es sind absolut IL-3-abhängig und wachsen in Anwesenheit von Epo, G-CSF und Thrombopoietin zu großen Kolonien bestehend aus 200 bis 5000 gut hämoglobinierten Erythroblasten in einem oder mehreren Clustern heran (siehe Abb. 5). Durch Bestimmung des Hämoglobintyps konnte der klonale Ursprung der in BFU-Es enthaltenen Zellen nachgewiesen werden.

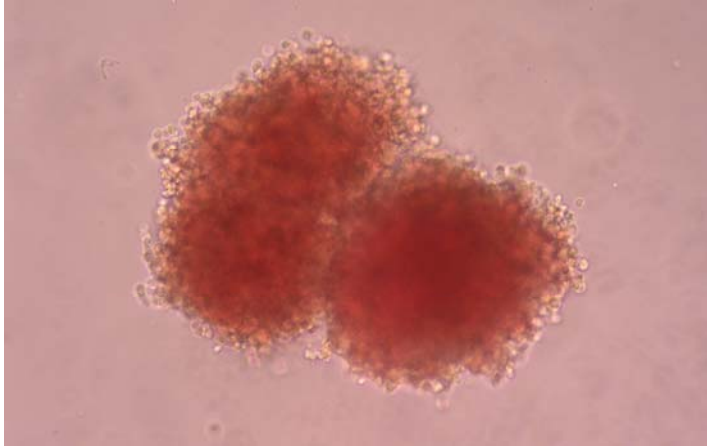


Abb. 5: Kolonie von BFU-E

Die Zahl von BFU-Es pro 10^5 kernhaltigen Zelle im Knochenmark schwankt zwischen 10 und 50 in Abhängigkeit von Kulturbedingungen und Separationsverfahren. BFU-Es sind auch im peripheren Blut zu finden, allerdings in sehr geringer Konzentration (0,02 – 0,05% der mononukleären Zellen).

Die Frühphase der BFU-E-Proliferation ist unabhängig von Erythropoetin. Dementsprechend exprimieren auch nur maximal 20 % der BFU-Es den Epo-Rezeptor. Im Gegensatz zu CFU-Es wird die absolute Zahl von BFU-Es nicht durch Epo-Level beeinflusst, allerdings kann der Anteil der sich im peripheren Blut befindlichen BFU-Es durch eine Anämie (also einen erhöhten Epo-Spiegel) erhöht werden. Eine gleiche Reaktion wird von Epo auch auf Vorläuferzellen anderer Zelllinien ausgeübt, was zeigt, dass das Knochenmark auf dem Niveau der frühen Vorläuferzellen eher als ein Gesamtorgan reagiert und nicht Zelllinienspezifisch. Des Weiteren kann Epo dafür sorgen, dass mehr BFU-Es in die Synthese-Phase des Zellzyklus eintreten. Somit kann man sagen, dass sich die Sensitivität für Epo auf der Stufe zwischen BFU-E und CFU-E entwickelt (Gregory and Eaves 1977; Gregory and Eaves 1978).

1.2.2.2 CFU-E:

Diese Zelle ähnelt dem Proerythroblasten und aus ihr können unter Erythropoetin-Einfluss Kolonien aus Erythroblasten wachsen, deren klonaler Ursprung durch Analyse von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Isoenzymen bewiesen werden kann.

Es handelt sich um Zellen mit basophilem Zytoplasma mit Pseudopodien, einem großen Nucleolus, einer hohen Kern-Plasma-Relation, feinem Chromatin und elektronenmikroskopisch erkennbaren Gruppen von Mitochondrien und Pinozytosevesikeln.

Ihre Zahl variiert je nach Separationsmethode zwischen 50 und 400 pro 10^5 kernhaltigen Zellen mit geringer Dichte. (siehe Abb. 6)

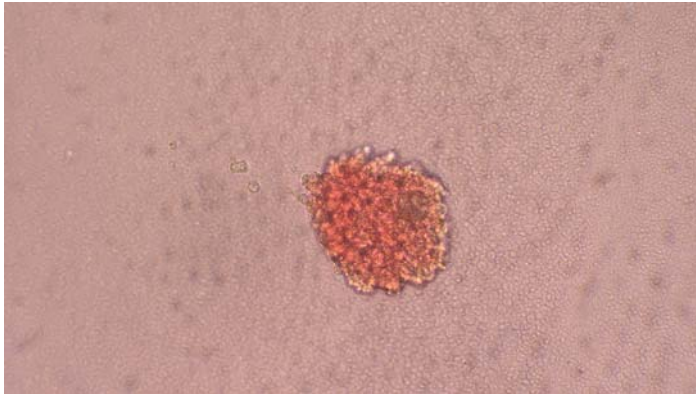


Abb. 6: Kolonie aus CFU-E

70 – 90 Prozent der CFU-Es befinden sich in der S-Phase des Zellzyklus. Wie bereits erwähnt sind CFU-Es absolut Erythropoetin-abhängig, d.h. in Abwesenheit von Epo gehen sie in Apoptose. Damit lässt sich auch erklären, dass hohe Epo-Spiegel (Anämie, Epo-Gabe) zu einer Zunahme der Zahl an CFU-Es führen und geringe Epo-Spiegel zu einer Abnahme der CFU-E-Anzahl führt. CFU-Es haben nach einigen Autoren die größte Dichte an Epo-Rezeptoren an ihrer Oberfläche und sind die für Epo empfindlichsten Zellen im gesamten Erythron (Krantz 1991; Wintrobe, Greer et al. 2004).

Die Entwicklung der erythroiden Vorstufen natürlich eigentlich eher als ein Kontinuum anzusehen, das sich über viele kleine Zwischenschritte zwischen BFU-E und CFU-E entwickelt. So wurde bei Menschen und Mäusen eine Zwischenstufe als reife BFU-E bezeichnet, die ein Proliferationspotential zwischen dem von BFU-Es und CFU-Es hat, die außerdem nicht mehr absolut IL-3-abhängig ist, dafür aber eine relative Abhängigkeit von Epo zeigen (Gregory and Eaves 1978).

1.2.3 Späte erythroide Vorläuferzellen

Die unreifste erythroide Vorläuferzelle nach der CFU-E wird als Pronormo- oder Proerythroblast bezeichnet. Die darauf folgenden, immer reiferen Zellen sind der basophile Normoblast, der polychromatische Normoblast, der orthochromatische Normoblast und schließlich der Retikulozyt.

Zeichen der Reifung im Zytoplasma ist die Änderung der Farbe von tiefblau (basophil, unreif, hoher Gehalt an RNA) zu rot (hämoglobiniert, reif). Die Kernreifung zeigt sich durch das fortschreitende Verschwinden von Nucleoli und die Kondensation von Chromatin.

Der Zellkern schrumpft (pyknotische Kerndegeneration) und wird aus der Zelle ausgestoßen. Danach bezeichnet man die Zelle als Retikulozyten, der sich vom reifen Erythrozyten durch sein um etwa 20% größeres Volumen und ein Netzwerk aus ribosomaler RNA unterscheidet. Diese ribosomale RNA kann durch eine Supravitalfärbung sichtbar gemacht werden und hat durch ihre netzartige Struktur der Zelle ihren Namen verliehen. Je älter die Zelle ist, desto weniger retikuläre ribosomale RNA und desto weniger Organellen enthält sie.

Proliferation und Reifung laufen parallel zueinander ab. Vorläufer sind nicht fähig zur Selbsterhaltung auf einer bestimmten Zwischenstufe, sondern müssen sich weiterentwickeln und teilen, bis sie zum reifen Erythrozyten geworden sind. Aus jedem Pronormoblasten entstehen in 3 bis 5 mitotischen Teilungen etwa 8 bis 32 reife Erythrozyten. Da orthochromatische Normoblasten keine DNA mehr enthalten, können sie sich nicht mehr teilen, sondern lediglich weiter reifen.

Die durch Teilung und Reifung maximal erreichbare Anzahl reifer roter Blutzellen kann variieren. Zum einen kann eine ineffektive Erythropoese Grund für eine Abnahme sein. Hierbei kommt es zum Zelltod vor oder kurz nach dem Verlassen des Knochenmark und dem Eintritt in die periphere Blutbahn. Zum anderen kann eine Entwicklungsstufe der Erythropoese übersprungen werden, woraus große, hämoglobinarmer Zellen resultieren.

Es ist nicht bekannt, was während der Differenzierung auf biochemischer Ebene in der Progenitor-Zelle geschieht, man weiß lediglich um die Veränderung von der absolut IL-3-abhängigen Zelle mit wenigen Epo-Rezeptoren zur Epo-abhängigen Zelle. Ab der Entwicklungsstufe des basophilen Normoblasten beginnt die Zelle, vermehrt Eisen, Calcium und Glucose aufzunehmen, sie beginnt mit der Synthese von Hämoglobin und Transferrin-Rezeptoren und auf der Zelloberfläche werden die für erythroide Zellen bzw. Erythrozyten typischen Proteine exprimiert (Hoffman 2000). Die Hämoglobinsynthese persistiert zu einem geringen Ausmaß auch noch im Retikulozyten. Der reife Erythrozyt kann es nicht mehr produzieren, da er keine Ribosomen mehr besitzt.

Das Vorhandensein von Hämoglobin in der Zelle scheint eine Ursache für die Kerndegeneration zu sein. Die Kernmembran wird mit der fortschreitenden Entwicklung der Zelle durchlässig für Hämoglobin, sodass man das Protein schließlich auch im Kern findet. Wenn es eine kritische Konzentration erreicht hat, interagiert es wahrscheinlich mit Histonen, was zur Inaktivierung von Chromosomen und zur Kondensation von Chromatin und schließlich zur Kerndegeneration führt. Nach der Kerndegeneration wird der Kern in etwa fünf bis 60 Minuten aus der Zelle ausgestoßen.

Für einige Tage verbleibt die nun als Retikulozyt zu bezeichnende Zelle im Knochenmark, gelangt dann in die Blutbahn und in die Milz, wo sie für ein bis zwei Tage sequestriert bleibt. Die Fähigkeit zur Hämoglobinsynthese geht durch die Entwicklung vom Retikulozyten zum Erythrozyten verloren. Normale Retikulozytenwerte bei Kindern ab dem 7. Lebenstag sind 3-10 Promille. Bei Blutungen oder Hämolyse kann das normal funktionsfähige kindliche Knochenmark die Retikulozytenproduktion wesentlich steigern: Die Retikulozytenwerte können innerhalb von drei bis vier Tagen auf das Drei- bis Zehnfache ansteigen. Ist ein Anstieg der Retikulozytenzahlen auch nach sieben bis zehn Tagen (normale Latenzzeit bis zum Maximum des Anstiegs) nicht zu beobachten, kann dies Hinweis auf eine Dyserythropoese verschiedenster Ursache sein (Hoffman 2000; Sitzmann 2006). Bei der schweren Malaria-Anämie sind die Retikulozytenzahlen als nicht adäquat erhöht beschrieben (Menendez, Fleming et al. 2000)

1.2.4 Regulation und Kontrolle der Erythropoese

Veränderungen der Hämoglobinkonzentration im Blut führen zu Veränderungen des Sauerstoff-Partialdrucks in Geweben. In der Niere führt ein Abfallen des pO_2 zu einer Ausschüttung von Erythropoetin (Epo). Epo sorgt dafür, dass sich erythroide Vorläuferzellen zu Pronormoblasten entwickeln.

1.2.4.1 Sauerstoffpartialdruck

Der Sauerstoffpartialdruck ist abhängig von Versorgung mit und Verbrauch von Sauerstoff.

Vier Komponenten bestimmen den Sauerstoffpartialdruck: Blutfluß, Hämoglobinkonzentration, Sauerstoffsättigung des Hämoglobins, Sauerstoffaffinität des Hämoglobins. Jede dieser Komponenten kann zum Ausgleich eines Defizits einer anderen verändert werden. So kann beispielsweise eine chronische Lungenerkrankung mit verminderter Sauerstoffsättigung zu einer Polyglobulie führen.

Gewebehypoxie ist der wichtigste Stimulus für eine gesteigerte Erythropoese und für die Ausschüttung von Epo (Wintrobe, Greer et al. 2004).

1.2.4.2 Erythropoetin

Erythropoetin ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 34000 kDalton. Die Potenz dieses Hormons wird in der Einheit U/l gemessen. Das Gen, das für Epo codiert, liegt auf Chromosom 7.

Epo wird hauptsächlich in der Niere produziert. Im Mausmodell kommt es bei schweren Anämiezuständen oder Blutungen auch zur Produktion in der Leber, dies trägt aber nur 7 % zur Gesamtausschüttung bei (Wintrobe, Greer et al. 2004). Es wurden keine nennenswerten Speicher des Hormons gefunden.

Erst seit kurzer Zeit ist bekannt, dass es im Epo-Gen sauerstoffsensitive Regionen gibt. Etwa in derselben Region wie das Epo-Gen findet man einen ebenfalls sauerstoffempfindlichen Enhancer, dessen Ligand der *hypoxia inducible factor 1* (HIF1) ist. Dieser scheint der physiologische Regulator der Epo-Transkription zu sein. Die Konzentration und Transkriptionsaktivität der beiden HIF1-Untereinheiten (α und β) nehmen proportional zum Ausmaß einer Hypoxie zu. Somit sind wohl diese zwei Proteine an der Regulierung der Epo-Produktion und Ausschüttung maßgeblich beteiligt und agieren als Sauerstoffsensor in den Epo-produzierenden interstitiellen Zellen der Niere (Wintrobe, Greer et al. 2004).

Epo bindet an Oberflächenproteine, die Epo-Rezeptoren (EpoR). Die Expression von Epo, als auch von EpoRs ist lebensnotwendig für den Menschen. Man geht davon aus, dass der wichtigste Kontrollpunkt der Erythropoese die Wechselwirkung von Epo und dem EpoR ist. Die Aktivierung des EpoRs generiert ein intrazelluläres Signal in unreifen Zellen der Erythropoese, das das Überleben dieser Zellen bedingt, die ansonsten in Apoptose gehen würden. Außerdem kann Epo die Proliferation von Zellen auslösen.

Die Dichte von EpoRs an der Zelloberfläche korreliert mit dem Grad der Epo-Abhängigkeit der jeweiligen Zelle. Die größte Dichte findet man bei Zellen, die sich in der Entwicklung von der CFU-E zum Pronormoblasten befinden. Bei Retikulozyten und Erythrozyten sind keine EpoRs mehr zu finden.

Nach Bindung von Epo an den EpoR findet über eine JAK2-Kinase und STAT-Proteine eine Transkriptionsaktivierung bestimmter Gene statt. Das distale Ende des EpoRs scheint eine Rolle bei der Begrenzung der Reaktion auf Epo zu spielen, denn bei Mäusen, deren EpoRs dieses distale Ende fehlte, fanden sich Zustände einer starken Erythrozytose, etwa vergleichbar mit der Polyzythämie bei Menschen (Wintrobe, Greer et al. 2004). Normale Epo-Serumspiegel liegen bei Kindern zwischen 6 und 25 U/l (Thomas 2005). Die Epo-Serumspiegel sollten im Allgemeinen nicht als einzelner Wert, sondern in Relation zum Hämatokrit und Hb-Wert gesehen werden. Bei Erkrankungen, die zu einer Hypoplasie des KM führen, sind die Epo-Spiegel i.d.R. höher als aufgrund des Hb-Abfalls zu erwarten wäre. Weniger hohe Spiegel finden sich bei ACD (anemia of chronic disease, Anämie bei chronischen Erkrankungen). Nach einer akuten Blutung oder Hämolyse steigt der Epo-Spiegel

im Serum bereits innerhalb weniger Stunden stark an und erreicht nach ein bis drei Tagen ein Maximum.

Bezüglich der Serum-Epo-Spiegel bei Malaria und Malaria-Anämie finden sich widersprüchliche Angaben in der Literatur: Burchard et al. und Burgmann et al. fanden die Serumspiegel erhöht aber dennoch inadäquat niedrig für das Ausmaß der Anämie (Burchard, Radloff et al. 1995; Burgmann, Looareesuwan et al. 1996). Miller et al. fanden in einer Studie stark erhöhte Epo-Werte bei Malaria und erklärten das Ausmaß der Anämie mit Zellen (wahrscheinlich Makrophagen), die in Milz und KM durch einen löslichen Faktor die Epo-Antwort von erythroiden Progenitorzellen inhibieren (Miller, Schooley et al. 1989).

Normalerweise verhalten sich Hb und Erythropoetin-Spiegel invers: Ein Abfall des Hbs löst einen Anstieg des Epo-Levels aus. Bei anämischen Patienten mit verschiedenen Grunderkrankungen (RA, HIV, Karzinome), also bei Vorliegen einer ACD, konnte jedoch beobachtet werden, dass im Vergleich zu anämischen Patienten mit Eisenmangel das Epo-Level zwar nach wie vor erhöht war, allerdings in wesentlich geringerem Ausmaß als es bei den Eisenmangelanämie-Patienten der Fall war (Baer, Dessypris et al. 1987; Faquin, Schneider et al. 1992).

1.3 Allgemeines zu Anämien

Als Anämie bezeichnet man eine Verminderung der Hämoglobinkonzentration, des Hämatokritwertes bzw. der Erythrozytenzahl unter den Normbereich. Typische Anämiesymptome sind Blässe von Haut und Schleimhäuten, Müdigkeit, Kopfschmerzen, Schwindel und Tachykardie oder Palpitationen. Nach der Erythrozytenmorphologie lassen sich Anämien nach dem Erythrozytenvolumen (MCV) in mikro-, normo- und makrozytär sowie nach dem Hämoglobingehalt (MCH, MCHC) in hypo-, normo- und hyperchrom einteilen. Pathophysiologisch lassen sich Anämien wie folgt unterteilen: Anämien können durch Störungen im Stammzellkompartiment entstehen, beispielsweise als aplastische Anämie oder durch Infiltration des Stammzellkompartiments durch Leukämien, Lymphome oder solide Tumoren. Störungen der Erythropoese verursachen eine Anämie durch Hb-Synthesestörungen (z.B. bei Eisenmangelanämie) oder DNA Synthesestörungen (z.B. bei Vitamin-B12-Mangel). Durch Hämolyse können Anämien auf der Stufe des reifen Erythrozyten entstehen. Weiterhin können Anämien durch Erythrozytenverlust bzw. -mangel bedingt sein, so etwa bei Blutungen oder Splenomegalie. Für die Differentialdiagnose der verschiedenen Anämieformen sind neben der Anamnese und körperlichen Untersuchung ein Blutbild mit Differentialblutbild,

eine Bestimmung der Retikulozytenzahl, eine Serumchemie inklusive Leber- und Nierenparameter sowie Bestimmung der Hämolyseparameter unabdingbar. Weiterhin sind ein Eisenstatus, Vitaminstatus, Coombs-Test, Virusserologie und ggf. Epo-Spiegel-Bestimmung von Bedeutung.

Die häufigste Anämieform weltweit ist die Eisenmangelanämie. Diese ist charakteristischerweise „mikrozytär“, d.h. sie geht mit niedrigem Erythrozytenvolumen einher. Bedingt ist die Eisenmangelanämie in vielen Fällen durch Mangelernährung, aber auch durch Verlust von Eisen, z.B. bei Blutungen. Normalwerte für Eisen im Serum bei Kindern ab dem 12. Lebensmonat liegen bei 40 bis 135 µg/dL. In der Studienpopulation war die Eisenmangelanämie ebenfalls verbreitet, zahlreiche Malariapatienten konnten wegen einer koinzidierenden mikrozytären, also a.e. Eisenmangelanämie, nicht in die Studie aufgenommen werden.

1.4 Die schwere Malaria-Anämie

Die zwei schwerwiegendsten Komplikationen der Malaria sind die zerebrale Malaria und die schwere Malaria-Anämie. Diese treten fast ausschließlich bei nicht immunen Patienten auf. In vielen Regionen, in denen die Malaria endemisch ist, spielt die Malaria-Anämie als Komplikation insbesondere bei Kindern im Alter zwischen sechs Monaten und sechs Jahren eine sehr wichtige Rolle. Erschwerend ist sie aufgrund mangelhafter Transfusionsinfrastruktur oft nur unzureichend behandelbar.

1.4.1 Definition

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert die schwere Malariaanämie (SMA) als Hämoglobinkonzentration (Hb) < 5g/dl oder Hämatokrit (Hkt) < 15% bei einer Parasitämie von > 10.000 Parasiten/µL Blut und einem normozytären Ausstrich (Slutsker 2001).

1.4.2 Epidemiologie

Einheitliche Aussagen zur Epidemiologie der schweren Malaria-Anämie lassen sich kaum treffen, da die Pathogenese der schweren Malaria-Anämie multifaktoriell ist und wesentlichen saisonalen und geographisch bedingten Schwankungen sowie Einflüssen in der Studienpopulation selbst unterliegt. Insbesondere die Koinzidenz der Malaria mit bakteriellen, viralen und anderen parasitären Erkrankungen sowie die Häufigkeit von erblichen Hämoglobinopathien und Enzymopathien in Endemiegebieten erschweren die Diagnose. Zusätzlich spielen verschiedene Formen von Mangelanämien, insbesondere die

Eisenmangelanämie, in Malariaendemiegebieten eine wichtige Rolle. So konnten von 404 ausgeschlossenen Malariapatienten allein 115 aufgrund eines zu niedrigen Erythrozytenvolumens bei wahrscheinlich zugrundeliegender Eisenmangelanämie nicht in die Studie aufgenommen werden.

Zum Erkrankungsalter lässt sich feststellen, dass in Holo- bzw. Hyperendemiegebieten eher jüngere Kinder im Alter von ein bis drei Jahren an der schweren Malariaanämie erkranken. In Gebieten mit variablen Transmissionsraten verschiebt sich das Erkrankungsalter hin zu älteren Kindern. Auch Erwachsene können in diesen Gebieten leichter an einer SMA erkranken: Aufgrund der geringeren Transmissionsrate konnte sich eine partielle Immunität bei den Betroffenen im frühen Kindesalter nicht oder nur unzureichend entwickeln (WHO 2005).

Bezüglich der Hospitalisierungsraten aufgrund einer SMA muss man leider feststellen, dass nur ein Teil der an SMA erkrankten Kinder zu einem Arzt bzw. in ein Krankenhaus gelangt. Daher spiegeln die in der Literatur genannten Werte sicher nur einen Teil der realen Zahlen wider und es muss befürchtet werden, dass diese eigentlich sehr viel höher liegen. Die Hospitalisierungsrate wird bei Kindern bis 4 Jahre mit 7,6 pro 1000 Kinder pro Jahr und bei älteren Kindern bis 9 Jahre auf 0,47 pro 1000 Kinder pro Jahr geschätzt. Die Kindersterblichkeit aufgrund einer SMA wird auf etwa 37,8 pro 1000 Kinder pro Jahr geschätzt (Hendrickse and al. 1971; Marsh and al. 1995; Slutsker 2001; Smith, Leuenberger et al. 2001; Korenromp 2003).

Im Durchschnitt beträgt die case fatality rate (CFR, Anteil der Personen, die an einer definierten Erkrankung innerhalb eines definierten Zeitraumes verstirbt) für hospitalisierte Kinder mit SMA 9,7%, wobei dieser Wert in verschiedenen Studien zwischen 8 und 18 % schwankt. Die Prävalenz der Malaria-Anämie unter allen hospitalisierten Kindern unabhängig vom Hospitalisierungsgrund beträgt nach Angaben einiger Autoren 8 bis 29 %. Unter diesen Betroffenen liegt der Anteil der davon nach WHO-Definition transfusionspflichtigen Kinder bei 20 bis 65 % (Schellenberg 1999).

Sozioökonomische Faktoren wie schlechte Wohnverhältnisse, Überbevölkerung und schlechtes Bildungsniveau prädisponieren laut WHO World Malaria Report 2005 zu einer komplizierten Malaria, also auch zu einer Anämie (WHO 2005). Hierzu finden sich in der Primärliteratur kontroverse Ergebnisse. Für Endemiegebiete in Asien und Lateinamerika finden sich dazu einzelne bestätigende Studien (Banguero 1984). Bei westafrikanischen Studienpopulationen findet sich eine solche Assoziation zwischen sozioökonomischen Faktoren und dem Risiko, an einer SMA zu erkranken, nicht (Luckner, Lell et al. 1998).

1.4.3 Pathogenese

Die Entstehung der Malaria-Anämie ist als ein multifaktoriell bedingtes Geschehen anzusehen. Drei Pathomechanismen scheinen im Wesentlichen daran beteiligt zu sein: Hämolyse, Erythrophagozytose und Dyserythropoese (Abdalla and Wickramasinghe 1988; Wickramasinghe and Abdalla 2000).

Von Bedeutung ist die Hämolyse und Phagozytose parasitierter Erythrozyten. Diesbezüglich haben einige Autoren festgestellt, dass die Parasitämie nur selten mit dem Ausmaß der Anämie korreliert (Menendez, Fleming et al. 2000). Im Widerspruch dazu stehen Feststellungen anderer Autoren, dass das Ausmaß der Anämie allein durch die Parasitämie erklärbar ist (Ekvall, Premji et al. 2001).

Anscheinend verändern auch nicht-parasitierte Erythrozyten bei einer Infektion mit *P.falciparum* ihre Membraneigenschaften, sodass auch nicht-parasitierte Erythrozyten vermehrt in der Milz gefiltert bzw. phagozytiert werden (Dondorp, Angus et al. 1999).

Weiterhin kommt einer Dyserythropoese bei Malaria eine erhebliche Bedeutung bei der Entstehung der Malaria-Anämie zu. In vitro konnte eine Dyserythropoese nachgewiesen werden, die durch Invasion von Plasmodien in Erythroblasten erklärt wird. In vivo konnte dies nicht bestätigt werden. Nur ein geringer Prozentsatz von Erythroblasten war mit Plasmodien infiziert (Abdalla 1990).

Die Erythropoese wird von einigen Autoren als adäquat gesteigert im Verhältnis zum Schweregrad der Anämie angesehen (Verhoef, West et al. 2002). Andere beschreiben die Erythropoese als vermindert, möglicherweise aufgrund bestimmter Mediatoren im Serum (Jootar, Chaisiripoomkere et al. 1993).

Insgesamt muss man feststellen, dass sich die in der Literatur zu findenden Informationen zur Pathogenese der schweren Malaria-Anämie als äußerst uneinheitlich zeigen und sich somit bisher keine klaren Aussagen diesbezüglich machen lassen. Lediglich eine multifaktorielle Genese wird angenommen, welcher Faktor aber nun in welchem Ausmaß die Entstehung der Anämie beeinflusst, muss vorerst als unbekannt angesehen werden (Weatherall 1988; Weatherall, Miller et al. 2002).

1.4.4 Klinik

Durch einen Abfall der Erythrozytenzahl stehen dem Körper bei einer Anämie weniger Sauerstofftransporter zur Verfügung, wodurch es zu einer Sauerstoffminderversorgung

lebenswichtiger Organe kommen kann. Diese fällt klinisch zunächst durch eine Blässe von Haut und Schleimhäuten auf (Weber 1997; Muhe 2000). Die Betroffenen verspüren eine allgemeine Schwäche und eine Belastungsdyspnoe, welche sich bei Kindern in Nasenflügeln und lauten Atemgeräuschen zeigt. Insgesamt steigen Herz- und Atemfrequenz an. Es können Kopfschmerzen auftreten. Bei der Auskultation kann ein Galopprrhythmus oder ein systolisches Strömungsgeräusch über dem Herzen wahrgenommen werden, welches durch Turbulenzen durch verminderte Blutviskosität ausgelöst wird. Prognostisch ungünstig ist die Entwicklung einer Laktatazidose, welche wiederum zu weiteren Störungen der Atmung führt (Mackintosh, Beeson et al. 2004).

Durch Hämolyse parasitierter und nicht-parasitierter Erythrozyten fallen vermehrt Hämoglobin-Abbauprodukte an. Dies lässt sich laborchemisch durch einen Anstieg des indirekten Bilirubins nachweisen und ist an Haut und Skleren als Ikterus zu sehen.

Die prognostisch ungünstige Entwicklung einer Hypoglykämie führt zu Kaltschweißigkeit, Tachykardie und Bewusstseinstörung bzw. -verlust.

Lebensbedrohliche Komplikationen treten bei einem Hämoglobinwert unter 5 mg / dL auf. Dies betrifft insbesondere Patienten, deren Hb-Wert schnell abfällt, sodass Kompensationsmechanismen des Organismus nicht greifen können. Leicht kann es dann zu einer durch Hypovolämie und Mikrozirkulationsstörungen bedingten Herzinsuffizienz kommen. Weitere Folgen können ein akutes Nierenversagen sowie neurologische Ausfälle sein, welche zu Verwirrtheit und Unruhe bis hin zum Koma führen. Letztlich kann eine Malaria-Infektion und insbesondere eine schwere Malaria-Anämie unbehandelt rasch zum Tod führen.

Des Weiteren führt eine chronische Anämie bei Kindern auf lange Sicht zur Beeinträchtigung von Wachstum und Entwicklung (Walker 2007).

1.4.5 Diagnostik

An erster Stelle sollte der Nachweis einer Plasmodieninfektion mit Hilfe des „Dicken Tropfens“ stehen. Sind zunächst keine Parasiten in diesem Ausstrich zu finden, sollte die Untersuchung mehrfach in acht- bis zwölfstündigen Abständen wiederholt werden (WHO 2000; WHO 2000; Manson 2002; Miller 2002). Einen weiteren Hinweis auf eine aktuelle, aber auch auf eine abgelaufene Infektion erhält man durch lichtmikroskopische Untersuchung eines Blutbilds auf Malariapigment. Dieses findet sich in neutrophilen Granulozyten und Monozyten. (Metzger, Mordmuller et al. 1995)

Eine Anämie wird durch das maschinelle oder lichtmikroskopische Anfertigen eines Blutbildes nachgewiesen. Dabei wird sich bei Vorliegen einer Anämie ein erniedrigter Hb-Wert und eine erniedrigte Erythrozytenzahl finden. Die Anämie bei Malaria ist meist hypochrom und normozytär. Zur weiteren Diagnostik sollte, wie auch bei anderen Anämieformen, eine Retikulozytenzählung durchgeführt werden. Damit kann die Anämie als hyper-, normo- oder hyporegeneratorisch eingeteilt werden (Wintrobe, Greer et al. 2004; Mertelsmann, Berger et al. 2006). Bei der schweren Malaria-Anämie sind die Retikulozytenzahlen in den meisten Fällen nicht adäquat erhöht (Menendez, Fleming et al. 2000). Weiterhin fallen im Blutbild bei komplizierten Verläufen erhöhte Leukozytenzahlen auf. Zu den Thrombozytenwerten lassen sich keine einheitlichen Aussagen treffen, vielen Autoren ist aber eine Thrombopenie im Zusammenhang mit einer Malaria bzw. Malaria-Anämie aufgefallen (Abdalla 1990).

Im Serum finden sich regelmäßig erhöhte Werte von Kreatinin, Bilirubin und Eiweiß. Bei komplizierter Malaria liegt außerdem oft eine Azidose vor, die sich in einem erniedrigten pH-Wert und erhöhten Laktatwerten zeigt. Der Blutzucker ist häufig niedrig (Hendrickse and al. 1971; Marsh and al. 1995; Murphy and Breman 2001).

1.4.6 Therapie

Die symptomatische Behandlung einer schweren Anämie mit Bluttransfusionen gilt in den westlichen Industrienationen als ein sicheres, einfaches und erfolgreiches Behandlungskonzept. Im tropischen Afrika ist dies jedoch durch den hohen personellen und technischen Aufwand in der Regel nur schwer möglich. Die zunehmende Prävalenz von HIV, HBV und HCV stellt besonders in Ländern, in denen Malaria endemisch ist, einen weiteren erschwerenden Faktor dar. Bestenfalls werden nur sehr anämische Patienten mit einem Hb < 4g/dl transfundiert (WHO 2000).

Zur Therapie der Malaria tropica siehe 1.1.9.

1.5 Hypothese und Fragestellung

Die schwere Malaria-Anämie als eine der beiden schwerwiegendsten Komplikationen der Malaria tropica wird durch verschiedene Faktoren in ihrer Entstehung begünstigt. Neben der Hämolyse sind die gesteigerte Erythrophagozytose und supprimierte Erythropoese die maßgeblich beteiligten Pathomechanismen. Insbesondere die Untersuchung der Neubildung der Erythrozyten in einem klar definierten Patientenkollektiv mithilfe klinischer, zellbiologischer, immunologischer, molekularer und biochemischer Methoden sowie die genaue Charakterisierung der Interferenz mit *P. falciparum* tragen zur Erstellung eines Modells zur Pathogenese der schweren Malaria-Anämie bei.

In der vorliegenden Arbeit soll v.a. mit zellbiologischen Methoden deskriptiv die Erythropoese bei Malaria untersucht werden. Weiterhin wird besonderes Augenmerk auf den Zusammenhang mit Epo- und Eisenwerten im Serum der Patienten gelegt. Auch zytologisch wurde das Knochenmark beurteilt und somit versucht, sich unter Hinzunahme hämatologischer Basisparameter wie insbesondere der Retikulozytenzahlen ein deskriptives Gesamtbild über die Erythropoese bei Malaria zu verschaffen.

Dabei sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Lässt sich das Ausmaß der Anämie bei der schweren Malaria-Anämie allein durch die Parasitendichte im Blut erklären?
2. Ist die Erythropoese bei Malaria-Anämie gesteigert oder supprimiert?
3. Welche Faktoren nehmen Einfluss auf die Erythropoese bei der schweren Malaria-Anämie?
4. Lässt sich die Erythropoese durch Zugabe bestimmter Zytokine beeinflussen?
5. Könnte sich – wenn vorhanden – ein solcher Effekt therapeutisch nutzen lassen?

2. Studie, Patienten und Methoden

2.1 Klinische Studie

Mit dem Ziel des besseren Verständnisses der bisher lediglich unzulänglich bekannten Pathogenese der schweren Malaria-Anämie wurde von November 2003 bis August 2005 eine klinische Studie in der Medical Research Unit des Albert-Schweitzer-Hospitals durchgeführt.

2.1.1 Studiendesign

Bei der genannten Studie handelt es sich um eine longitudinale, prospektive klinische Studie, bei welcher die eingeschlossenen Patienten dem Alter entsprechend drei vergleichbaren Gruppen (A, B, C) zugeordnet wurden (age matched triplets). Die Zuordnung in die drei Gruppen erfolgte entsprechend dem Hb-Wert bei Aufnahme in die Studie: Zu Gruppe A wurden Kinder mit einem Hb-Wert ≤ 5 g/dL zugeordnet. Gruppe B umfasste Patienten mit einem Hb-Wert > 5 aber < 10 g/dL. In Gruppe C wurden Patienten mit einem Hb-Wert ≥ 10 g/dL aufgenommen.

2.1.2 Studienort

Gabun liegt im westlichen Zentralafrika auf Höhe des Äquators, angrenzend im Norden an Kamerun und Äquatorialguinea sowie Kongo im Südosten. Die westliche Grenze bildet eine etwa 800 Kilometer lange Küstenlinie entlang des Atlantischen Ozeans. Auf einer Fläche von ungefähr 268000 Quadratkilometern leben 1,36 Millionen Menschen, davon die Mehrzahl in und um die Landeshauptstadt Libreville (? 2007).

Lambaréné ist mit etwa 24000 Einwohnern Hauptstadt der Provinz Moyen Ogooué. Der Ort liegt 50 Kilometer südlich des Äquators und 180 Kilometer landeinwärts der Hauptstadt Libreville. Das Zentrum Lambaréné's liegt auf einer Insel im Fluss Ogooué. Zu beiden Ufern des Flusses erstrecken sich Ortsteile. Nahe dem Ortsteil Adouma am nördlichen Ufer liegt das Gelände des Albert-Schweitzer-Krankenhauses. Das Krankenhaus wurde 1913 von Albert Schweitzer und seiner Frau Helene gegründet und seitdem immer wieder erweitert. Heute ist es aufgeteilt in Abteilungen für Chirurgie, Gynäkologie und Geburtshilfe, Innere Medizin, Psychiatrie, Pädiatrie und Zahnmedizin. Regelmäßig finden augenärztliche und neurologische Sprechstunden statt, zu denen die entsprechenden Ärzte aus der Hauptstadt anreisen. 1981

wurde ein Forschungslabor eröffnet, in dem die vorliegende Studie von November 2003 bis August 2005 durchgeführt wurde.

Lambaréné liegt umgeben von großen Flächen eines sehr artenreichen tropischen Regenwaldes, unterbrochen von kleinen Ackerflächen. Das Klima ist tropisch mit einer Durchschnittstemperatur von 27 °C und einer durchschnittlichen Luftfeuchtigkeit von 80-90 % ohne wesentliche saisonale Schwankungen. Die Niederschläge während einer „langen“ Regenzeit von Januar bis Mai und einer „kurzen“ Regenzeit von Oktober bis Dezember führen zu einer durchschnittlichen Regenmenge von 380 mm pro Monat. In der Trockenzeit von Juni bis September liegt die durchschnittliche Niederschlagsmenge lediglich bei 35 mm pro Monat. Insgesamt beträgt die jährliche Niederschlagsmenge somit mehr als 3000mm (Quammen 2001; ? 2007).

Der wichtigste Malariavektor in der Umgebung ist die *Anopheles gambiae*-Mücke. Die Region ist hyperendemisch für *Plasmodium falciparum*. Die Prävalenz von Malariaerkrankungen wurde als zwischen 30 und 60% liegend angegeben, wobei es keine wesentlichen saisonalen Schwankungen gibt („stabile Malaria“).

Bei 92% aller Malariainfektionen handelt es sich um Infektionen mit *Plasmodium falciparum*, die restlichen 8% stellen Misch- und Monoinfektionen mit *Plasmodium malariae* und *Plasmodium ovale* dar (Wildling, Winkler et al. 1995).

2.1.3 Patienten

Der größte Teil der Patienten des Albert-Schweitzer-Hospitals kommt aus Lambaréné und Umgebung. Der gute Ruf des Krankenhauses zieht aber auch Patienten aus allen übrigen Landesteilen an. Sämtliche Kinder mit Verdacht auf Malaria werden zunächst in der Abteilung für Pädiatrie untersucht und dann zur weiteren Diagnostik an das Forschungslabor des Krankenhauses überwiesen. Hier findet dann eine Blutentnahme zur Anfertigung eines „Dicken Tropfens“ statt, welcher nach Anfärbung und Trocknung an Ort und Stelle begutachtet wird. Aktuell wird im Albert-Schweitzer-Krankenhaus bei etwa 2500 Patienten p.a. eine Malaria diagnostiziert. Darunter finden sich auch 50 bis 100 Kinder, die an einer schweren Malaria-Anämie erkrankt sind. Das Durchschnittsalter dieser Patienten beträgt etwa drei Jahre

2.1.4 Studienprotokoll

Jeder Patient mit schwerer Malaria-Anämie wurde einer Gruppe („A“) zugeordnet. Jedem Patienten der Gruppe A wurde dann altersentsprechend ein Patient mit milder Malaria-Anämie (Gruppe B) und ein Patient mit Malaria aber ohne Diagnose einer Anämie (Gruppe C) zugeordnet. Die Patienten dieser drei Gruppen wurden während zweier Monate verfolgt und im Durchschnitt alle zwei Wochen wiedergesehen und untersucht.

2.1.4.1 Einschluss- und Ausschlusskriterien sowie Gruppeneinteilung

Von November 2003 bis August 2005 wurden etwa 4000 Kinder mit Verdacht auf Malaria gesehen. Von diesen wurden 495 mit gesicherter Malaria auf weitere Einschluss- und Ausschlusskriterien geprüft. 91 Patienten wurden schließlich in die Studie aufgenommen, nachdem sie folgende Kriterien erfüllten:

- Schriftliche Einverständniserklärung eines Elternteils oder eines Erziehungsberechtigten
- Parasitologisch nachgewiesene Monoinfektion mit *Plasmodium falciparum*
- Alter zwischen 1 und 6 Jahren
- Parasitämie von $> 1000 / \mu\text{L}$
- $\text{MCV} > 65 \text{ fL}$
- HbAA oder HbAS
- Leukozyten $< 15000 / \mu\text{L}$
- Ausschluss anderer schwerer Infektionskrankheiten
- Wohnort bis 100 Kilometer vom HAS entfernt

Zusätzliche Kriterien für den Einschluss in Gruppe A (schwere Malaria-Anämie)

- Schwere normochrome und normozytäre Anämie mit einem $\text{Hb} \leq 5 \text{ g/dL}$

Zusätzliche Kriterien für den Einschluss in Gruppe B (milde Malaria-Anämie)

- Übereinstimmung des Alters mit einem Kind der Gruppe A
- $\text{Hb} > 5$ und $\leq 10 \text{ g/dL}$
- Thrombozyten $> 30000 / \mu\text{L}$
- Laktat $< 3 \text{ mM}$
- Glukose $> 50 \text{ mg/dL}$
- Keine Zeichen einer komplizierten Malaria nach der WHO-Definition (WHO 2000; Slutsker 2001)

Zusätzliche Einschlusskriterien für die Gruppe C (Malariaerkrankung ohne Anämie)

- Übereinstimmung des Alters mit einem Kind aus Gruppe A
- Hb > 10 g/dL
- Thrombozyten > 50000 / μ L
- Laktat < 3 mM
- Glucose > 50 mg/dL
- Anteil an hämoglobinhaltigen neutrophilen Granulozyten < 2%
- Keine Zeichen einer komplizierten Malaria nach der WHO-Definition

Folgende Kriterien waren ein Grund zum Ausschluss aus der Studie:

- Sichelzellanämie oder α -Thalassämie
- Unterernährung
- Bluttransfusion im vergangenen Monat
- Komplikationen außer Anämie und Hyperparasitämie
- Infektionen mit Helminthen (insbesondere Filarien), Bakterien oder Viren (HIV, HBV, HCV)
- Andere schwere systemische Erkrankungen, z.B. Blutungskomplikationen

2.1.4.2 Diagnostik

Die Malaria und die schwere Malariaanämie wurden bei den Studienpatienten mit Hilfe der Anamnese, der klinischen Symptomatik und verschiedener etablierter Laboruntersuchungen diagnostiziert.

Sie werden im Folgenden aufgezählt und sind im Einleitungs- bzw. Methodenteil genau dargestellt. Ihre zeitliche Abfolge ist aus Tabelle 1 ersichtlich.

Klinische Untersuchungen:

- Körperliche Untersuchung (z.B. Inspektion von Haut und Schleimhäuten, Palpation von Leber und Milz, Auskultation von Herz und Lunge)
- Erhebung der Vitalparameter: Körpertemperatur, Blutdruck, Atem- und Herzfrequenz
- Sonographie der Milz

Laboruntersuchungen:

- „Dicker Tropfen“
- Blutausschrieb

- Blutbild (manuell und mit Cell-Dyn 3000)

Zusätzlich erfasste Basisparameter bei Aufnahme (Tag 0) sind die Bestimmung der Blutgruppen (mit Anti-A, Anti-B und Anti-D Antisera), die Hb-Elektrophorese (Azetat-Zellulose-Elektrophorese (Lell, May et al. 1999), zur Bestimmung des Hämoglobinphänotyps) und die Plasmaeisenkonzentration.

Außerdem wurden zum Ausschluss anderer Anämieursachen virologische Blutuntersuchungen (HIV, HBV, HCV, Parvovirus B19), Urin- (Schistosoma haematobium, Bakterien) und Stuhlanalysen (Wurmerkrankungen, okkultes Blut) durchgeführt.

2.1.4.3 Therapie

Alle Patienten wurden mit einer viertägigen Kombinationstherapie aus Chinin und Clindamycin behandelt, welche im Albert-Schweitzer-Krankenhaus von der Kinderklinik empfohlen wird und effektiv und sicher ist. (Kremsner, Radloff et al. 1995)

Patienten der Gruppe A bekamen zunächst eine intravenöse Startdosis von 12 mg Chinin pro Kilogramm Körpergewicht in 5% Glukoselösung über vier Stunden. Nach einem vierstündigen Intervall wurde Chinin in niedrigerer Dosierung (8mg/kg Körpergewicht) mit Clindamycin (5 mg/kg Körpergewicht) in 5% Glukose kombiniert gegeben, was bei insgesamt zwölf Dosen mit einem jeweiligen Intervall von acht Stunden wiederholt wurde.

Die Behandlung der Patienten aus den Gruppen B und C entsprach der oben beschriebenen, allerdings wurde die Therapie wenn möglich nach zwei Tagen auf eine orale Gabe umgestellt. Als supportive Therapie wurde nach WHO-Richtlinien (WHO 2000) bei Hb-Werten unter 4 g/dL und/oder schweren Anämiesymptomen (Dyspnoe, Bewusstseinstörung) eine Vollbluttransfusion von zunächst 10 mL/kg Körpergewicht gegeben. Für die rasche Versorgung der Patienten mit Vollbluttransfusionen wurde ein Blutbank angelegt. Spender wurden auf HIV, HBV, HCV, Treponemen, Filarien und Malaria untersucht. Vor der Transfusion erfolgte eine Kreuzprobe.

Alle Patienten wurden nach Beendigung der Malariatherapie mit Mebendazol behandelt.

Fieber über 38,5° Celsius wurde mit physikalischen Maßnahmen und/oder mit Ibuprofen behandelt (Brandts, Ndjave et al. 1997). In Einzelfällen wurde bei starkem Erbrechen Metoclopramid als Suppositorium verwendet. Bei einem Patienten musste wegen bekannter Fieberkrämpfe einmalig Diazepam eingesetzt werden.

2.1.4.4 Probengewinnung

Bei allen Patienten wurden am Aufnahmetag (Tag 0) und allen darauf folgenden Behandlungs- und Follow-up-Tagen etwa 2 ml peripheren Blutes abgenommen.

Bei Einverständnis der Erziehungsberechtigten und wenn der Zustand des betreffenden Kindes es zuließ, wurde außerdem an Tag 0 und an Tag 56 eine Knochenmarkspunktion durchgeführt, bei der 10 mL Knochenmark aspiriert und eine Knochenmarksstanze entnommen wurden.

2.1.4.5 Follow Up

Nach erfolgreicher Behandlung und Entlassung wurden die Patienten in regelmäßigen Abständen einbestellt bzw. aufgesucht, um sie nach dem unten aufgeführten Schema klinisch und laboranalytisch zu untersuchen. Nach einem krankheitsfreien Intervall von acht Wochen wurden die Patienten zum Abschluss nochmals knochenmarkpunktiert und es wurden alle Aufnahmeuntersuchungen nochmals durchgeführt.

Tag	0	1	2	3	4	5	14	28	56
Therapie:									
Chinin und Clindamycin i.v./p.o.	X	x	x	x					
Supportive Behandlung	(x)	(x)	(x)	(x)	(x)	(x)			
Anamnese:									
Fieber und/oder Malaria in den letzten drei Monaten	X								
Klinik:									
Ausführliche Untersuchung, Temperatur, RR, HF, AF	X	x	x	x	x	x	x	x	x
Sonographie der Milz	X								x
Laboruntersuchungen:									
Parasitämie	X	x	x	x	x	x	x	x	x
Hämatologische Basisparameter	X	x	x	x	x	x	x	x	x
Hämolyseparameter	X		x			x			x
Knochenmarkspunktion	X								x
Erythropoetin, sTfR	X		x			x			x
Durchflusszytometrische Analysen	X	x	x			x	x		x
Virologie	X								x
Zytokine	X					x			x
Genotypisierung der Patienten									x
Genotypisierung der Parasiten	X								
Urinanalyse	X	x	x	x	x	x			x
Stuhlmikroskopie	X	x							
CRP	X		x			x			x

Tab. 1: Follow Up

2.2 Material

2.2.1 Geräte

Biologisches Mikroskop CX31, Olympus, Japan

Inverses Mikroskop Diavert, Leitz, Deutschland

Durchflusszytometer CyFlow® SL, Partec, Deutschland

Automatisches Hämatologiegerät Cell-Dyn 3000, Abbott Laboratories, USA

Sterile Werkbank The LabGard™ 425, NuAire Corporation, Plymouth, USA

Zentrifuge EBA 12, Hettich Zentrifugen, Deutschland

Zentrifuge Rotanta / AP, Hettich Zentrifugen, Deutschland

Pipetboy acu, Integra Biosciences, Schweiz

Pipetten Labmate™ L20, L200, L1000, Abimed, Deutschland

Pipetten Proline 0,5-10 µl, 5-50 µl, Carl Roth GmbH, Deutschland

Reagenzglasmixer Vortex 7-2020, neoLab, Deutschland

Schüttel- und Mischgerät Titramax 100, Heidolph Instruments, Deutschland

Neubauer improved-Zählkammer, LaborOptik, Deutschland

Roche Modula P, Roche Diagnostics

Photometer, Tecan, Deutschland

2.2.2 Verbrauchsmaterialien

Falcon Blue Max™ Tubes 15 / 50 ml, Becton Dickinson Labware, USA

Falcon Cell Strainer (70 / 100 µm), Becton Dickinson Labware, USA

Serologische Pipetten 5 / 10 / 25 ml, Costar Corporation, USA

Pipettenspitzen 10 / 200 / 1000 µl, Sarstedt, Deutschland

Objektträger geschnitten Mattrand, Langenbrinck, Deutschland

FACS-Tubes, Sarstedt, Deutschland

Probengefäße 1,5 ml, Eppendorf, Deutschland

Erythropoetin Elisa Kit, IBL, Deutschland

Fe-Kit, Roche Diagnostics, Deutschland

2.2.3 Chemikalien

Phosphate-Buffered-Saline-Tablets, Sigma, USA

Fetales Kälberserum FCS, Sigma Cell culture, USA

Bovines Serumalbumin BSA (Fraction V, $\geq 96\%$), Sigma, USA
Biocoll Separating Solution, Biochrom AG, Deutschland
RPMI 1640 Medium + L-Glutamin, Gibco, GB
Brilliantkresylblau-Färbelösung, Merck, Deutschland
May-Grünwald-Färbelösung, Merck, Deutschland
Methylzellulose, Stem Cell Technologies, USA
Giemsa-Stammlösung, Merck, Deutschland
Phosphatpuffer nach Weise (Titrisol®)

2.2.4 Zusätze

Zvad-fmk
Anti-TNF-alpha
IL-10

2.2.5 Patientenproben

Es wurden Proben peripheren Venenblutes, Knochenmarkaspirate und Knochenmarkstanzen untersucht. Diese stammen von 91 Malariapatienten im Alter von 1 bis 6 Jahren, die von Dezember 2003 bis August 2005 im Rahmen einer klinischen Studie zur Untersuchung der Pathogenese der schweren Anämie bei *Plasmodium falciparum*-Malaria am Albert-Schweitzer-Krankenhaus in Lambaréné, Gabun behandelt wurden. Die wesentlichen Patientenmerkmale sind in Tab. 2 dargestellt.

2.3 Methoden

2.3.1 Dicker Tropfen

Der Dicke Tropfen ist eine Anreicherungsverfahren, mit welcher sich auch ein geringer Parasitenbefall erfassen lässt (Kremsner, Zotter et al. 1988; WHO 1991).

Nach sorgfältiger Reinigung mit Ethanol wurde eine Fingerbeere des Patienten mit einer Einmallinganzette angestochen. Der erste Tropfen Kapillarblut wurde verworfen. Vom zweiten Kapillarblutstropfen wurden 10 μL abpipettiert und auf einer 18 x 10 mm großen Fläche eines Objektträgers mithilfe einer Schablone gleichmäßig verteilt. Nach der Trocknung erfolgte eine Giemsa-Färbung. Bei dieser Färbemethode wurde die Giemsa-Stammlösung mit

Phosphatpuffer nach Weise im Verhältnis 1:5 gemischt. Diese Lösung wurde durch einen Papierfilter filtriert und die Dicken Tropfen wurden in dieser Lösung in einer Färbeküvette für 20 Minuten gefärbt. Durch die Färbung ohne vorherige Fixierung werden die Erythrozyten hämolysiert, wodurch die Parasiten zurückbleiben und so im Mikroskop bei 1000facher Vergrößerung sichtbar werden. Nach vorsichtigem Abspülen und erneuter Trocknung waren die Dicken Tropfen fertig zur Auszählung. In 500 Ölimmersionsfeldern wurden die Parasiten gezählt. Bei sehr hohen Parasitämien wurden weniger Gesichtsfelder gezählt und auf 500 extrapoliert. Die erhaltene Zahl entspricht der Parasitenzahl pro μL . Die Detektionsgrenze lag bei einem Parasiten pro μL .

2.3.2 Blutausstrich

Der Blutausstrich wird zur Auszählung eines Differentialblutbildes oder zur

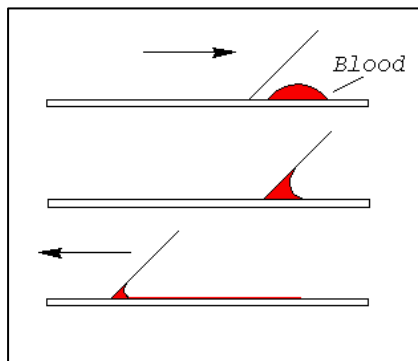


Abb. 7: Anfertigung des Ausstrichs

Retikulozytenzählung nach der sogenannten Reiß-Quetsch-Methode angefertigt. Es werden maximal 5 μL Patientenblut auf das Ende eines Objektträgers gegeben und mit Hilfe eines zweiten Objektträgers so dünn wie möglich ausgestrichen. Dazu hält man den zweiten Objektträger in einem Winkel von etwa 45° und bewegt

ihn langsam auf den Blutstropfen zu bis dieser sich gleichmäßig am Objektträgerende verteilt. Nun wird der obere Objektträger ohne Änderung des Ausstrichwinkels

zum anderen Ende des eigentlichen Probenträgers geschoben (siehe Abb. 1 (GreatScopes 2006; Mertelsmann, Berger et al. 2006)). So wird das Patientenblut gleichmäßig und dünn ausgestrichen und kann nach Trocknung fixiert und, wenn nötig, für weitere Analysen gefärbt werden.

2.3.3 Blutbild

Mit Hilfe eines Blutbildes können die im Blut enthaltenen Zellen differenziert werden. Dazu gehört eine Aufschlüsselung und Quantifizierung von Erythrozyten, Leukozyten (und deren Unterformen für das sogenannte Differentialblutbild) sowie Thrombozyten.

Ein Blutbild kann maschinell, aber auch manuell, also lichtmikroskopisch erstellt werden.

Für die manuelle Methode wird ein Blutausschrieb benötigt, welcher nach oben beschriebener Methode angefertigt wird. Dieser wird nach Trocknung für 3 Minuten mit Methanol (70%) fixiert. Anschließend erfolgt die Färbung nach Pappenheim. Dies ist eine Folge zweier Einzelfärbungen. Zunächst erfolgt eine Färbung mit May-Grünwald-Lösung. Nach kurzer Spülung mit destilliertem Wasser wird der Objektträger für 20 Minuten in eine Giemsa-Färbelösung gegeben. Nun wird nochmals mit destilliertem Wasser gespült. Sobald der Objektträger luftgetrocknet ist, kann das Differentialblutbild mikroskopisch ausgezählt werden.

Zusätzlich zur manuellen Methode kann das Blutbild auch durchflusszytometrisch, also maschinell, bestimmt werden. Dies erlaubt neben einer optischen Zählung der Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten und der Anfertigung eines Differentialblutbildes auch die Bestimmung von Hämoglobin, Hämatokrit, MCV, MCH, MCHC, Erythrozytenverteilungsbreite (RDW), mittlerem Thrombozytenvolumen, Thrombokrit, Thrombozytenverteilungsbreite (PDW).

2.3.4 Retikulozytenzählung

Retikulozyten lassen sich in einer sogenannten Supravitalfärbung mit 0,5% Brilliantkresylblau anfärben. Dabei werden RNA-Reste in den Retikulozyten angefärbt, durch deren Quantifizierung auch auf das Alter eines Retikulozyten geschlossen werden kann. Je mehr rRNA sich anfärbt, desto jünger ist die Zelle. Für die Färbung werden 30 µl peripheres Patientenblut für 30 Minuten mit 30µl Färbelösung inkubiert. Anschließend fertigt man vom angefärbten Blut einen Ausstrich an, in dem die Retikulozyten lichtmikroskopisch ausgezählt werden. Die Retikulozytenzahlen können dann sowohl als absoluter Wert als auch als Retikulozytenindex dargestellt werden.

2.3.5 Knochenmarkpunktion

Die Knochenmarkpunktion erfolgte gemäß dem Studienprotokoll an Tag 0 und an Tag 56 nach separater schriftlicher Einverständniserklärung eines Elternteiles oder Erziehungsberechtigten. Bei Kindern jeden Alters wurde die Punktion mit einer Jamshidinadel (spezielle Hohladel) in Lokalanästhesie der Haut und der Knochenhaut mit Scandicain, unter Sedierung mit Dormicum (Wirkstoff Midazolam, Firma Roche) und unter Kontrolle der Sauerstoffsättigung des Blutes mit einem Pulsoxymeter der Firma Siemens

durchgeführt. Stets wurde als Punktionsstelle die Beckenschaufel, speziell die Spina iliaca posterior superior gewählt. Die Punktion wurde in Bauchlage durchgeführt. Um Infektionen des Wundgebiets zu verhindern, wurden die Punktionen unter sterilen Bedingungen mit Einmaltüchern, Einmalhandschuhen sowie Einmal-Jamshidinadeln durchgeführt. Nach ausreichender Lokalanästhesie von Haut und Knochenhaut wurde zunächst mit einem sterilen Skalpell eine Stichinzision der Haut durchgeführt. Danach wurde mit langsamen Drehbewegungen die Jamshidinadel durch die Pars compacta des Knochens in den Markraum vorgeschoben.

Es wurden zunächst 2-3 ml Knochenmark in eine Spritze ohne Zusatz aspiriert und schnell in eine EDTA-Monovette gefüllt, welche kurz geschwenkt wurde zur Vermeidung einer frühzeitigen Koagulation. In eine mit 5000 I.E. Liquemin gefüllten Spritze wurden ca. 5 mL Knochenmark aspiriert. Diese Spritze wurde steril verschlossen und ebenfalls kurz geschwenkt. Des Weiteren wurde ein etwa ein bis zwei Zentimeter langer Stanzzylinder entnommen, welcher in Formalin fixiert wurde.

2.3.6 Knochenmarkausstriche

Das EDTA-Knochenmark wurde in ein Uhrglasschälchen gegeben und geschwenkt. Mit einer Pasteurpipette wurden einige Tropfen des bröckchenhaltigen Markes aufgenommen und jeweils ein Tropfen auf einen Objektträger gegeben. Mit der Quetschmethode mithilfe eines zweiten Objektträgers wurde der Ausstrich angefertigt. Alle Ausstriche wurden in Methanol 70% fixiert und luftgetrocknet. Je ein Ausstrich wurde nach Giemsa und einer nach Pappenheim gefärbt. Nach der oben bereits beschriebenen Methode wurde auch aus dem Knochenmark ein Dicker Tropfen angefertigt und nach Giemsa gefärbt.

2.3.7 Gradientenzentrifugation zur Zellseparation

Aus dem gewonnenen Knochenmark werden zu weiteren Untersuchungen, v.a. zur Untersuchung des klonalen Wachstums in speziellen Medien, mononukleäre Zellen isoliert. Dies geschieht über eine Gradientenzentrifugation.

Zunächst wird das mit Heparin antikoagulierte Knochenmark über einen sterilen Falcon Cellstrainer-Filter in ein 50-mL-Röhrchen filtriert. Dann erfolgt eine Zentrifugation bei 300 g für fünf Minuten zur Separation des Knochenmarkplasmas von zellulären Bestandteilen. Das Knochenmarkplasma wird abpipettiert und bei -80° Celsius asserviert. Die zurückbleibenden zellulären Bestandteile werden mit PBS-Lösung auf ein Volumen von 35 mL verdünnt und

diese Suspension vorsichtig in ein neues Röhrchen über darin vorhandene 15 mL Biocoll-Lösung geschichtet. Dieses wird dann bei 400 g (1500 RPM) für 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Dabei sammeln sich mononukleäre Zellen ihrer Dichte entsprechend in einer weißlichen Interphase, welche sich zwischen einem Überstand aus Plasma sowie Thrombozyten und der darunter liegenden Biocoll-Lösung befindet. Ein Zellpellet aus Erythrozyten und Granulozyten mit höherer Dichte findet sich am Boden des Röhrchens. Anschließend wird die zellreiche Interphase mit einer TSK-Supra-Nadel vorsichtig entnommen und in PBS-Lösung zweimal gewaschen (jeweils bei 300 g für fünf Minuten). Zuletzt wird das nun entstandene Zellpellet in Medium (RPMI, 10% FCS) aufgenommen. Die Zellzahl in der Suspension wird nach Anfärbung mit Türks-Lösung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter einem Inversen Mikroskop bestimmt. Nun können für weitere Experimente genau definierte Zellzahlen entnommen und verwendet werden.

2.3.8 Klonales Wachstum in Methylcellulose (Colony Assay)

Aus dem an Tag 0 gewonnenen Knochenmarkspirat werden wie folgt Zellkulturen angelegt: Nachdem eine Gradientenzentrifugation zur Zellseparation durchgeführt ist, die Zellen in Medium aufgenommen sind und die Zellzahl bestimmt ist, werden pro Zellkulturschale $12,5 * 10^3$ Zellen in 1 mL Methylcellulose eingesetzt. Es werden insgesamt fünf Duplikate mit jeweils 1 mL Methylcellulose angesetzt. Beim ersten Duplikat wird die oben genannte Zellzahl * 3 in 30 μ L cell suspension solution aufgenommen. Für alle weiteren Duplikate werden die Zellen zunächst in 30 μ L autologes Knochenmarkplasma aufgenommen. Ein Duplikat wird so belassen, einem werden 3 μ L anti-TNF (10 μ g/mL), einem 3 μ L IL-10 und dem letzten 3 μ L zvad-fmk (40 μ molare Lösung) zugegeben. Die Zellen in den Kulturschalen werden 12 Tage bei 37 °C und 5% CO² inkubiert.

Analog zur Beschreibung oben werden aus den an Tag 56 gewonnenen Knochenmarkspiraten die Zellen separiert und in Medium aufgenommen. Es werden wiederum Duplikate angesetzt, diesmal allerdings nur drei: Beim ersten werden die Zellen erneut in 30 μ L cell suspension solution aufgenommen. Dem zweiten Duplikat werden 30 μ L autologes Knochenmarkplasma von Tag 56 zugesetzt. Dem dritten Duplikat wird bei – 80 °C konserviertes autologes Knochenmarkplasma von Tag 0 zugesetzt.

Alle Methoden der Zellkultur werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die Unterscheidung der verschiedenen Kolonien und damit die Quantifizierung ist nur morphologisch möglich. Es wurden folgende Kriterien zur Unterscheidung der Kolonien verwendet (Nissen-Druey, Tichelli et al. 2005; Nissen-Druey, Tichelli, et al. 2005):

<u>Kolonie</u>	<u>Zellzahl</u>	<u>Cluster</u>	<u>morphologische Besonderheiten</u>
BFU-E	50 bis 200	einzelne o. mehrere	düsterrot, oft mehrfach geclustert
CFU-E	8 bis 50	einzelne	hellere rote Farbe
CFU-GM	mehr als 50	einzelne	farblos
CFU-GEMM	mehr als 50	einzelne	"spiegeleiförmig" mit germinativem Zentrum

Tab. 2: Zählkriterien Colony Assays

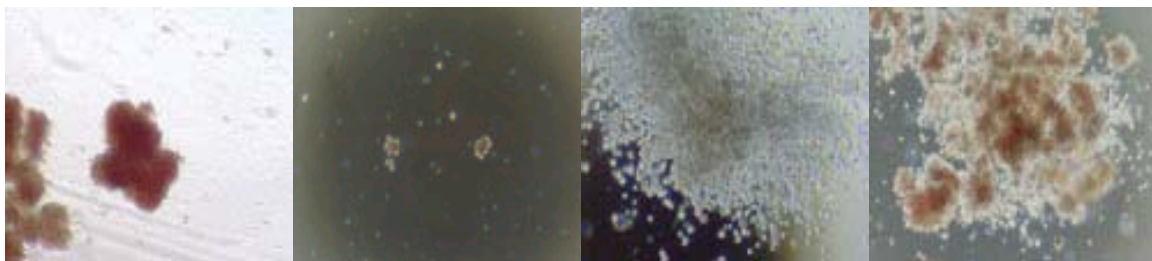


Abb. 8: Unterschiedliche Kolonieformen im Vergleich (Quelle: R&D Systems,)

BFU-E

CFU-E

CFU-GM

CFU-GEMM

2.3.9 Erythropoetin-Bestimmung

Die Bestimmung der Epo-Spiegel wurde mittels ELISA-Kits der Firma IBL, Hamburg, durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen Sandwich-ELISA, bei dem Epo zunächst durch einen Kaninchen-Epo-Antikörper an eine Festphase gebunden wird. Nach einem Waschschrift bindet sich ein zweiter, mit Biotin konjugierter Kaninchen-Epo-Ak an das bereits gebundene Epo. Nach einer weiteren Inkubation mit einem Anti-Biotin-Ak und einem Chromogen entsteht eine gelbliche Färbung, welche der Konzentration an Epo proportional ist. Somit kann die Epo-Konzentration photometrisch bestimmt werden. Dabei wurde ein Photometer der Firma Tecan verwendet.

2.3.10 Eisen-Bestimmung

Für die Bestimmung der Eisenwerte im Serum wird zunächst Fe^{3+} aus dem Transferrin-Komplex mittels einer Säure gelöst. Dann wird durch Zusatz von Ascorbat Fe^{3+} zu Fe^{2+}

reduziert. Die Fe^{2+} -Ionen reagieren schließlich mit einem Farbkomplex, sodass die Farbintensität photometrisch bestimmt werden kann.

Dazu wurden Reagenzien der Firma Roche Diagnostics und das Gerät „Roche Modula P“ verwendet.

2.3.11 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme JMP und StatView. Zum Vergleich zweier Gruppen mit ungleicher Varianz diente der *Mann-Whitney-U-Test* (quantitative Variablen). Mittelwerte der einzelnen Gruppen wurden mit der *Analysis of Variance* (ANOVA) verglichen. Zur Korrelation klinischer und laboranalytischer Parameter wurde die bivariate Korrelation nach Pearson durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Allgemeines

Wie oben beschrieben wurden die 91 Patienten in Abhängigkeit von ihren Hb-Werten (oder so ähnlich) drei verschiedenen Gruppen zugeteilt. Diese Gruppen wurden untereinander bezüglich der Parasitämie, des Hb- und Retikulozyten-Verlaufs sowie der Epo- und Eisenwerte verglichen.

Mit den an Tag 0 und an Tag 56 gewonnenen Knochenmarkaspiraten wurden deskriptive Untersuchungen zur Erythropoese mit Hilfe der sogenannten Colony Assays durchgeführt.

Die wichtigen Patientenmerkmale sind in der untenstehenden Tabelle aufgeführt. Nach Entnahme und Gradientenzentrifugation der Zellen wurden diese in einem halbfesten, speziellen Nährboden unter Zugabe verschiedener Zusätze für 12 Tage kultiviert und anschließend nach definierten Kriterien ausgezählt. Somit wurde eine möglichst hohe Vergleichbarkeit erzielt.

Außerdem wurde die Koloniebildung mit verschiedenen Zusätzen analysiert. Ein Vergleich der Koloniebildung an Tag 0 und an Tag 56 wurde durchgeführt.

Weiterhin wurde zytologisch und histologisch die Erythropoese untersucht und auch hierbei Vergleiche der Gruppen untereinander und Vergleiche Tag 0 – Tag 56 durchgeführt und analysiert.

3.2. Flussdiagramm der Studie

In 20 Monaten (Dezember 2003 bis August 2005) wurden 91 Patienten in die SMA-Studie aufgenommen. Diese wurden nach einem age-matched-triplet-Design in Abhängigkeit des Ausprägungsgrads der Anämie drei Gruppen zugeteilt. Die Gesamtzahl der untersuchten Patienten und die Ausschlussgründe für die nicht aufgenommenen Patienten sind in Abbildung 8 dargestellt.

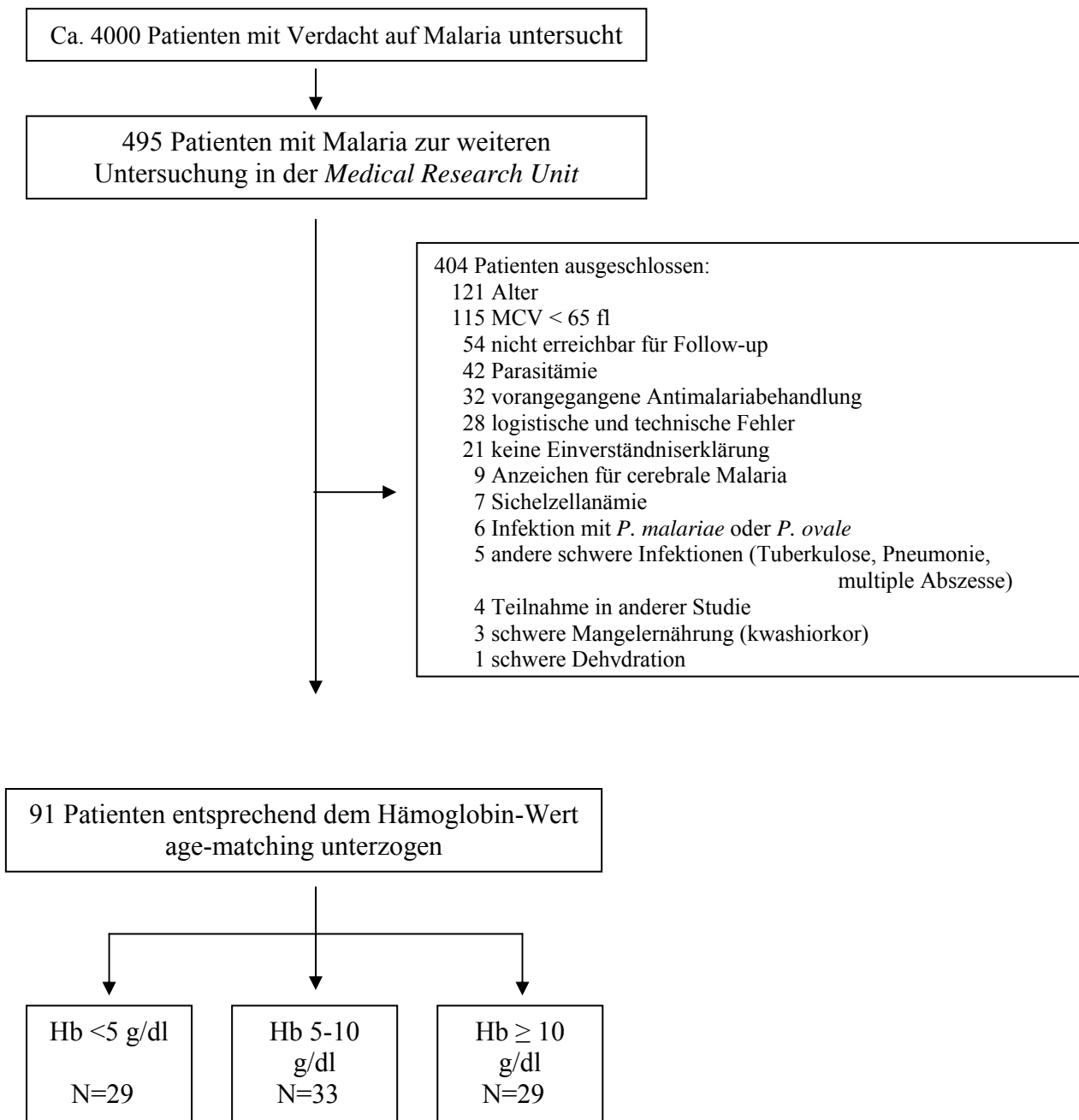


Abbildung 8: Von etwa 4000 untersuchten Patienten gelangten aufgrund der strengen Ausschlusskriterien nur 495 in die engere Auswahl für die SMA-Studie. Davon wurden wiederum 91 Patienten entsprechend ihres Hb-Wertes den Gruppen A, B und C zugeteilt.

3.3 Patientencharakteristika

Am Aufnahmetag (Tag 0) wurden bei allen 91 Patienten die klinischen, parasitologischen und laboranalytischen Charakteristika ermittelt. In Tabelle 3 sind sie, wenn nicht anders gekennzeichnet, als Durchschnittswert für die Gruppen A, B und C dargestellt. Ein

signifikanter Unterschied wurde bei $p \leq 0,05$ angenommen und zeigte sich für die markierten (*, **, ***) Parameter.

	Gruppe A Hb ≤ 5 g/dL n=29	Gruppe B Hb 5 - 10 g/dL n=33	Gruppe C Hb ≥ 10 g/dL n=29
Patientencharakteristika			
Männlich / weiblich	15/14	16/17	14/15
Durchschnittsalter in Monaten (SD)	32 (16,5)	36 (17,0)	39 (18,0)
Körpergewicht (kg)*	11,9 (3,6)	12,9 (3,0)	14,1 (3,2)
Körpergröße (cm)	88 (12)	90 (12)	95 (14)
Kopfumfang (cm)	48,0 (2,6)	48,6 (2,4)	49,1 (2,2)
Thoraxumfang (cm)	51,4 (5,2)	52,3 (3,4)	52,8 (3,5)
Oberarmumfang (cm)	16,1 (4,5)	16,7 (4,1)	17,4 (5,2)
Symptome			
Rektaltemperatur (°C)	38,1 (1,1)	38,1 (1,3)	38,4 (1,0)
Herzfrequenz (Schläge / min.)	137 (20)	137 (22)	131 (18)
Systolischer Blutdruck (mmHg)	88 (12)	89 (11)	94 (10)
Atemfrequenz (pro min)	43 (14)	40 (11)	36 (12)
Milz (cm unter Rippenbogen)**	3,0 (1,9)	1,7 (1,3)	1,0 (1,3)
Leber (cm unter Rippenbogen)	1,8 (1,3)	1,4 (1,6)	1,0 (1,2)
Ikterus, n (%)	12 (41)	9 (27)	6 (21)
Multiorgan dysfunction score**	16,2 (3,0)	14,2 (1,8)	12,5 (1,3)
Parasitämie (μl)			
geometrisches Mittel (Bereich)	21.921 (1.060-1.000.000)	26.248 (1.800-700.000)	18.738 (1.500-100.000)
hämatologische Daten			
Hämoglobin (g/dL) **	4,4 (0,7)	7,7 (1,4)	10,5 (0,5)
Hämatokrit (%)**	12,9 (2,5)	22,9 (4,1)	30,4 (2,4)
Erythrozytenzahl ($\times 10^{12}/L$)**	1,8 (0,4)	3,2 (0,6)	4,2 (0,4)
MCV (fL)	74 (6,1)	73 (5,2)	72 (5,7)
MCH (pg)	26 (3,8)	25 (2,5)	25 (2,1)
MCHC (g/dL)	34 (2,5)	34 (2,0)	34 (1,4)
Erythrozytenverteilungsbreite (%)	18,4 (2,7)	17,5 (2,2)	17,5 (2,4)
Leukozytenzahl ($\times 10^9/L$)	12,0 (10,6)	8,6 (3,7)	8,5 (3,5)
Thrombozytenzahl ($\times 10^9/L$)	165 (113)	156 (87)	194 (95)
Retikulozyten (μ L)			
geometrisches Mittel (Bereich)	92556 (8240-667590)	73135 (25600-330750)	72319 (27090-147220)
HbAS / HbAA	1 / 28	3 / 30	4 / 25
biochemische Daten			
Blutglucose (g/dL)	78 (32)	79 (31)	82 (30)
Laktat (mmol/L)**	4,6 (4,2)	2,9 (1,3)	2,2 (0,6)

Werte als Durchschnitt dargestellt (SD), wenn nicht anderweitig bezeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,0001$, *** $p < 0,01$.

Tab. 3: Klinische, parasitologische und laboranalytische Charakteristika bei Aufnahme (Tag 0)

3.4 Untersuchung peripheren Venen Blutes

Das peripheren Venen Blut der Patienten der Gruppen A, B und C wurde auf Unterschiede im Verlauf von Parasitämie, Hämoglobin, Retikulozyten und Epo-Spiegel unter Malariatherapie

untersucht. Dafür wurden die Messwerte der drei Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test für quantitative Werte mit ungleicher Varianz verglichen. Ein signifikanter Unterschied wurde bei $p \leq 0,05$ angenommen.

3.4.1 Parasitämie

Zwischen den drei Gruppen A, B und C lagen keine signifikanten Unterschiede der durchschnittliche Parasiteneliminationszeit und des Eliminationsverlaufs vor. (siehe Abb. und Tab.).

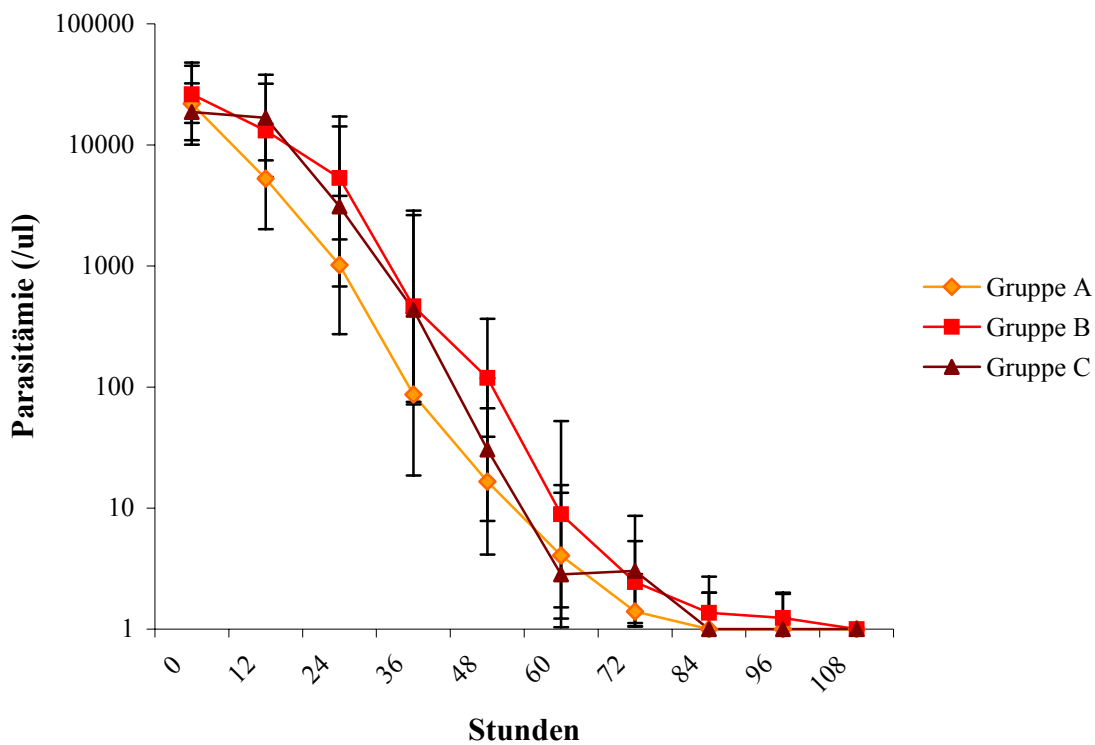


Abb. 9: Verlauf von Parasitämie und Parasiteneliminationszeit

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C
N	29	33	29
durchschnittliche Parasiteneliminationszeit in Stunden	63,8	69,8	65,4

Tab. 4: Die durchschnittliche Parasiteneliminationszeit unterschied sich in den drei Gruppen nicht.

3.4.2 Hämoglobin

Gemäß der Gruppenzuteilung unterschieden sich bei Aufnahme die Hb-Werte. In der Gruppe C blieben sie bis zum Ende des Follow up an Tag 56 konstant. Die Werte der Gruppen A und B stiegen bis zum Tag 56 kontinuierlich an. Zum Ende des Follow Ups lagen die Werte aller drei Gruppen im Normalbereich.

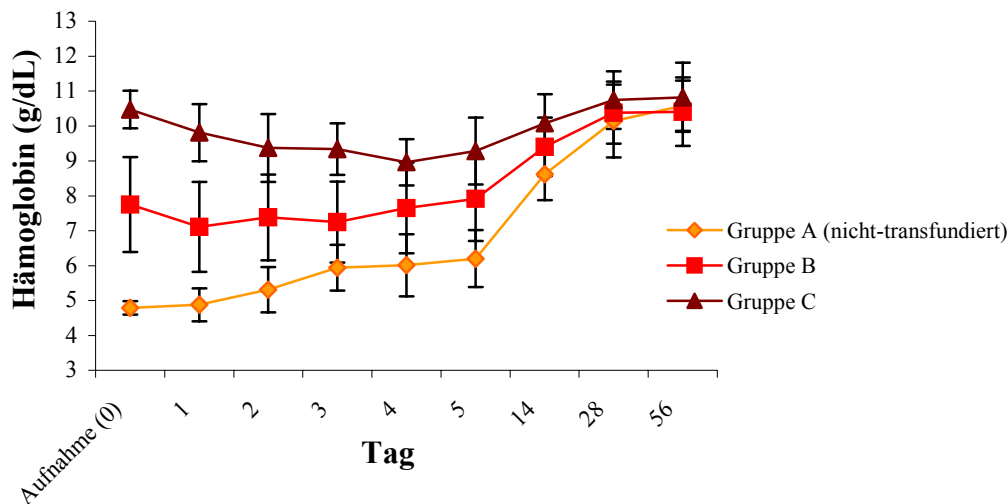


Abb. 10: Der Ausgangs-Hb-Wert der nicht-transfunden Patienten bei Aufnahme (Tag 0) unterschied sich entsprechend der Gruppenaufteilung. Messwerte sind als Mittelwert dargestellt

3.4.3 Retikulozyten

Am Aufnahmetag unterschieden sich die absoluten Retikulozytenzahlen (Anzahl der Retikulozyten pro μl Blut) im peripheren venösen Blut von Patienten der drei Gruppen nicht. In den Gruppen A und B stiegen sie in den darauffolgenden Tagen unter Malariatherapie an. An Tag 1, 2, 3, 4, 5 und 14 lagen die Werte der Gruppe A jeweils signifikant höher als die der Gruppe B und die der Gruppe B wiederum signifikant höher als die der Gruppe C. An Tag 28 und 56 waren die Retikulozytenwerte abgefallen und unterschieden sich nicht mehr signifikant zwischen den drei Gruppen. (siehe Abb. 6 und Tab 5).

Tag		Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Kommentar
0	N	26	33	28	n.s.
	Retikulozyten (/µl)	92555,83	73135,07	72319,5	
1	N	27	28	27	A>B>C
	Retikulozyten (/µl)	103822,3	83989,28	54755,85	
2	N	27	32	27	A>B>C
	Retikulozyten (/µl)	127795,5	90308,61	58164,4	
3	N	24	21	23	A>B>C
	Retikulozyten (/µl)	186574,9	104230,3	56795,43	
4	N	24	18	17	A>B>C
	Retikulozyten (/µl)	270699,2	160850,7	51483,99	
5	N	26	29	28	A>B>C
	Retikulozyten (/µl)	332029	212743,8	84925,36	
14	N	27	30	24	A>B>C
	Retikulozyten (/µl)	215209,5	121404,6	124785,5	
28	N	21	26	22	n.s.
	Retikulozyten (/µl)	54363,6	59200,55	58279,03	
56	N	23	29	24	n.s.
	Retikulozyten (/µl)	58468,16	59434,72	50131,32	

Tab. 6: Verlauf der absoluten Retikulozytenzahlen vom Aufnahmetag bis zum Abschluß des Follow Up

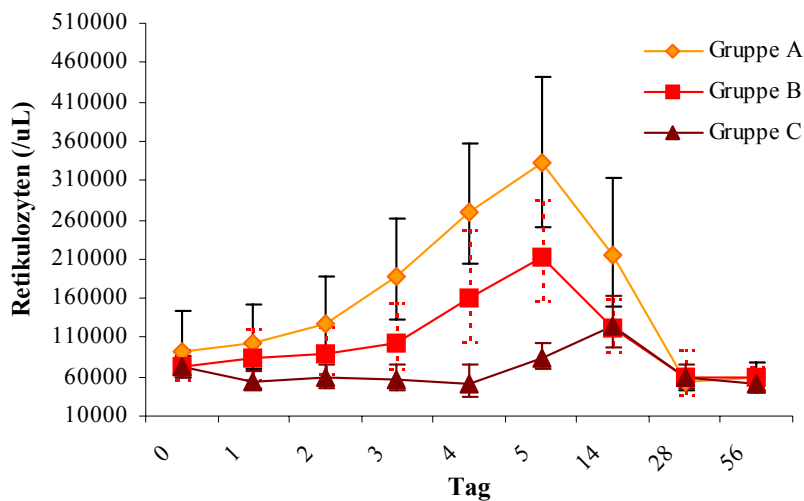


Abb. 11: Die absolute Retikulozytenzahl im peripheren Blut von Patienten der Gruppen A, B und C. Darstellung als geometrisches Mittel bei einem 95%igen Konfidenzintervall.

3.4.4 Erythropoetin-Spiegel

An d0 waren die Erythropoetin-Werte der drei Patientengruppen signifikant verschieden. Die Epo-Werte der Patienten aus Gruppe A lagen signifikant höher als die der Gruppe B. Ebenso lagen die Werte der Gruppe B signifikant höher als die der Gruppe C. Im Verlauf nahmen die Werte in Gruppe A und B ab und erreichten bei Ende des Follow Up an Tag 56 den Wert der

Gruppe C, welcher konstant verlief. Signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen gab es zu diesen Zeitpunkten nicht mehr. Dies lässt sich sowohl für die Darstellung aller Patienten, sowie für die gesonderte Darstellung der nicht transfundierten Patienten sagen.

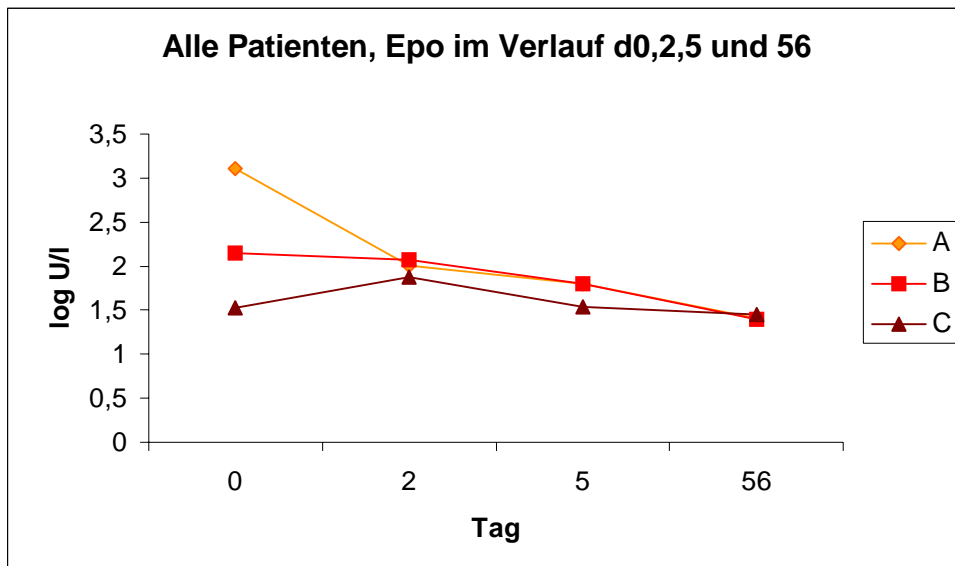


Abb. 12 : Epo-Werte aller Patienten im Verlauf. Darstellung der logarithmierten Mittelwerte der Gruppen A, B und C

	Wilcoxon	Anova
Epo d0	< 0,0001	< 0,0001
Epo d2	0,34	0,46
Epo d5	0,11	0,18
Epo d56	0,93	0,91

Tab. 8: P-Werte für den Epo-Verlauf aller Patienten an Tag 0, Tag 2, Tag 5 und Tag 56. Berechnung mit Wilcoxon-Test bzw. Anova

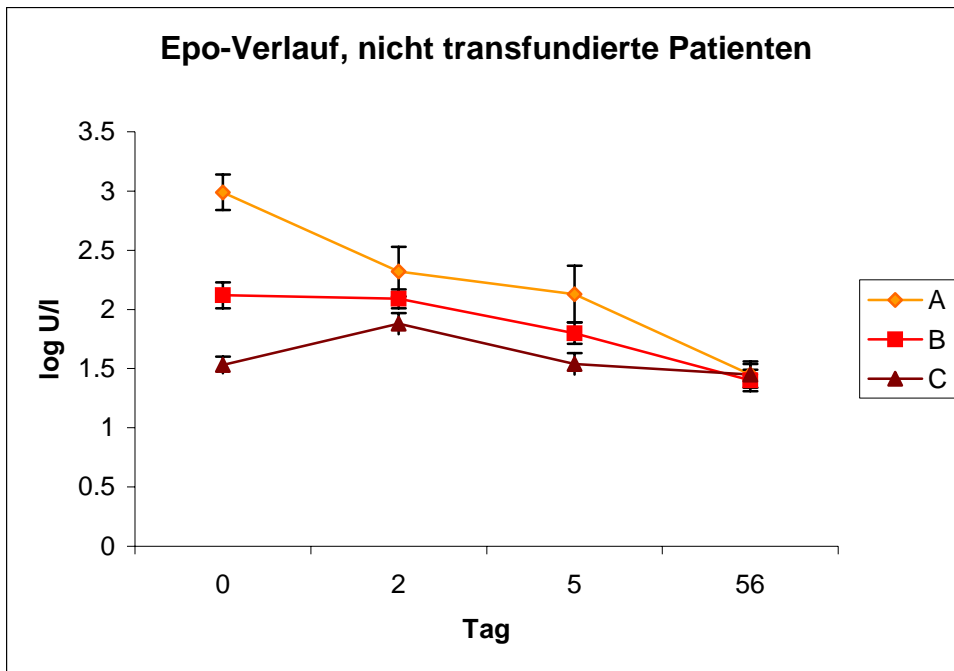


Abb 13: Verlauf der Epo-Werte der nicht transfundierten Patienten. Darstellung als logarithmierte Mittelwerte.

	Wilcoxon	Anova
Epo d0	< 0,0001	< 0,0001
Epo d2	0,07	0,12
Epo d5	0,02	0,008
Epo d56	0,98	0,91

Tab 10: P-Werte für den Epo-Verlauf der nicht transfundierten Patienten an Tag 0, Tag 2, Tag 5 und Tag 56. Berechnung mit Wilcoxon-Test bzw. Anova

3.4.5 Eisenstoffwechsel

Am Tag der Aufnahme zeigten sich bei Patienten der Gruppe A signifikant höhere Eisenwerte als bei Patienten der Gruppe B und C. Zum Ende des Follow Ups an Tag 56 lag kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen mehr vor.

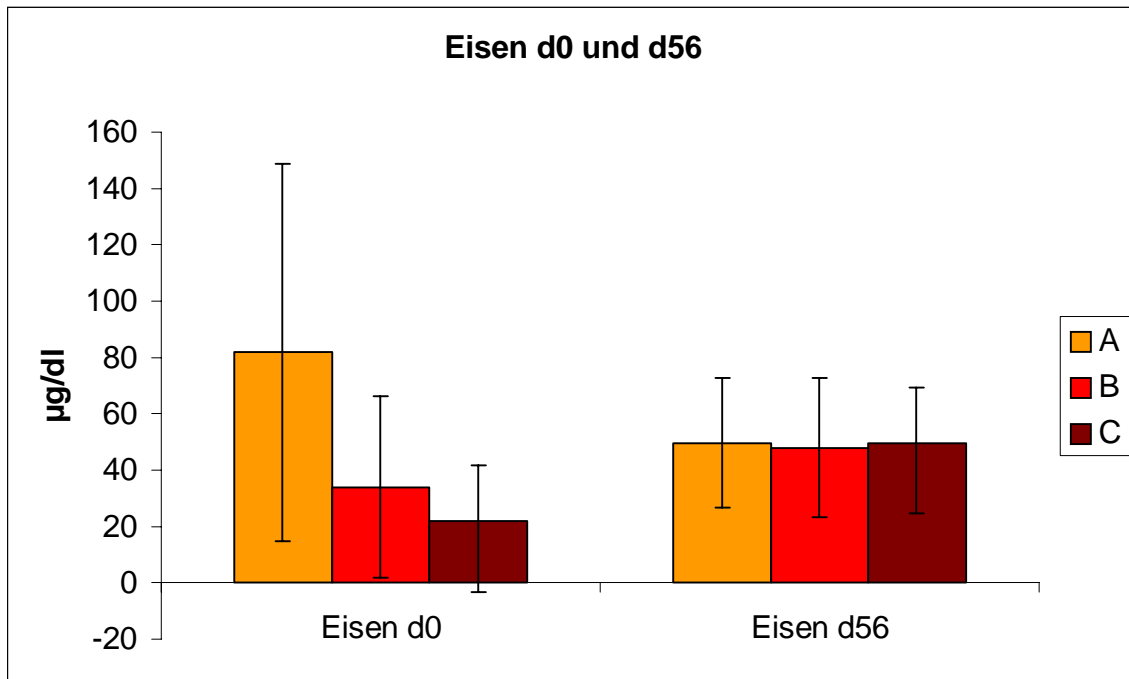


Abb. 14: Eisenwerte Tag 0 und Tag 56 in Gruppe A, B und C. Darstellung der Mittelwerte und der Standardabweichung in einem 95% Konfidenzintervall

Als weitere Eisenstoffwechselfparameter wurden Transferrin, Ferritin und sTfR bestimmt (Daten in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt). Bei allen Patienten der Gruppe A waren die Transferrinwerte normal und das Ferritin stark erhöht (Akute-Phase-Protein). Die Werte des sTfR waren normal. Laborchemisch fand sich somit kein Hinweis auf eine vorbestehende Eisenmangelanämie als Erklärung für die Anämie und die hohen Epo-Werte bei Patienten der Gruppe A an d0.

3.5 Untersuchung des Knochenmarks

Das Koloniewachstum in halbfester Methylcellulose wurde untersucht. Des Weiteren wurden Knochenmarkausstriche zytologisch untersucht. Hierbei wurde auf den Anteil der Erythropoese an der Hämatopoese, auf den Anteil an Dyserythropoese an der Erythropoese, sowie auf den Anteil an malariapigmenthaltigen Zellen geachtet.

3.5.1 Koloniewachstum in Methylcellulose

Die Wirkung verschiedener Zusätze (anti-TNF α , IL10 und zvad-fmk) auf das klonale Wachstum von Kolonien in Methylcellulose wurde untersucht. Dabei war festzustellen, dass lediglich die Zugabe von am Aufnahmetag gewonnenem Knochenmark-Plasma die Koloniebildung beeinflusste. Patienten mit schwerer Malaria-Anämie bildeten im Vergleich zu Patienten aus den anderen beiden Gruppen etwa die 1,5fache Menge an Kolonien.

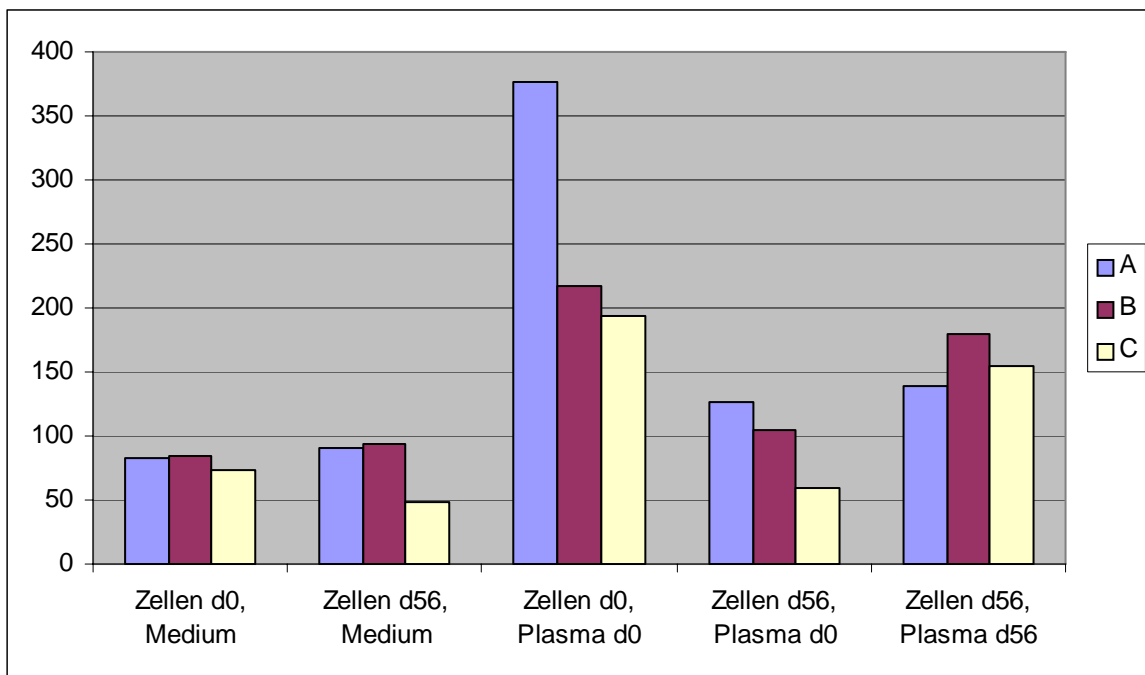


Abb. 15: Wachstum der Gesamtkolonien in den drei Gruppen A, B und C unter Zugabe verschiedener Zusätze. Darstellung als Mittelwerte der Absolutwerte.

Ebenfalls wurde das Koloniewachstum, besonders das der erythroiden Vorläufer, unter dem Zusatz verschiedener Zytokine sowie eines Caspase-Inhibitors untersucht.

Die Anteile der erythrozytären Kolonien an den Gesamtkolonien unterschied sich weder durch Zugabe der verschiedenen Zusätze noch zwischen den drei Patientengruppen (s. Abb.16)

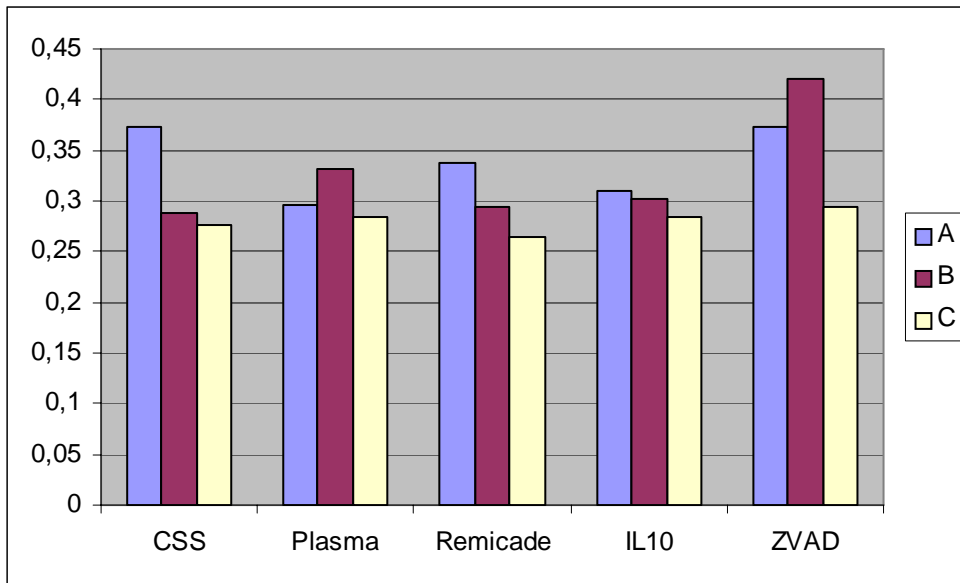


Abb. 16: Koloniewachstum unter Zugabe von Zytokinen bzw. Plasma oder Medium. Anteil der erythrozytären Kolonien an den Gesamtkolonien.

Ein Einfluss von anti-TNF α , IL-10 und zvad-fmk auf die Bildung der einzelnen Kolonieformen konnte in keiner der Gruppen nachgewiesen werden. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den gemittelten Absolutwerten der Einzelkolonien unter Zugabe der o.g. Zusätze. (s. Abb. 17 a und 17 b).

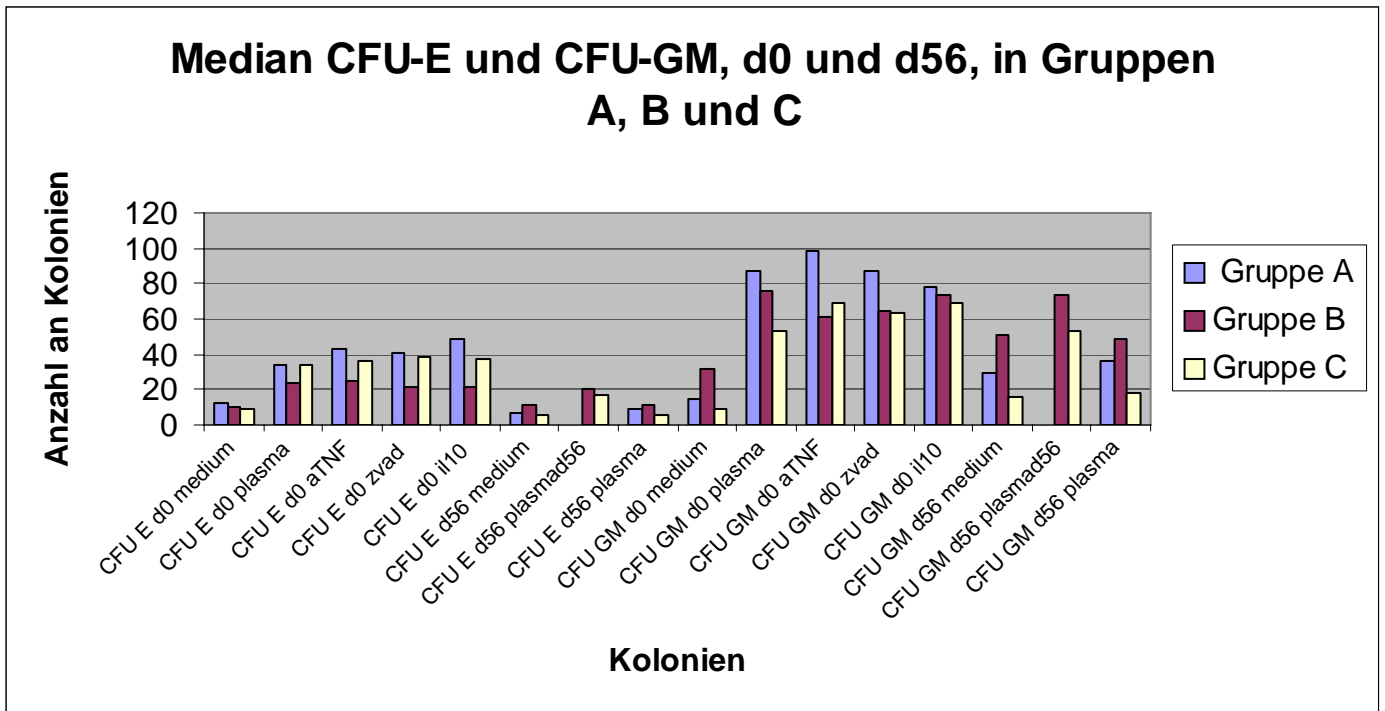


Abb. 17a

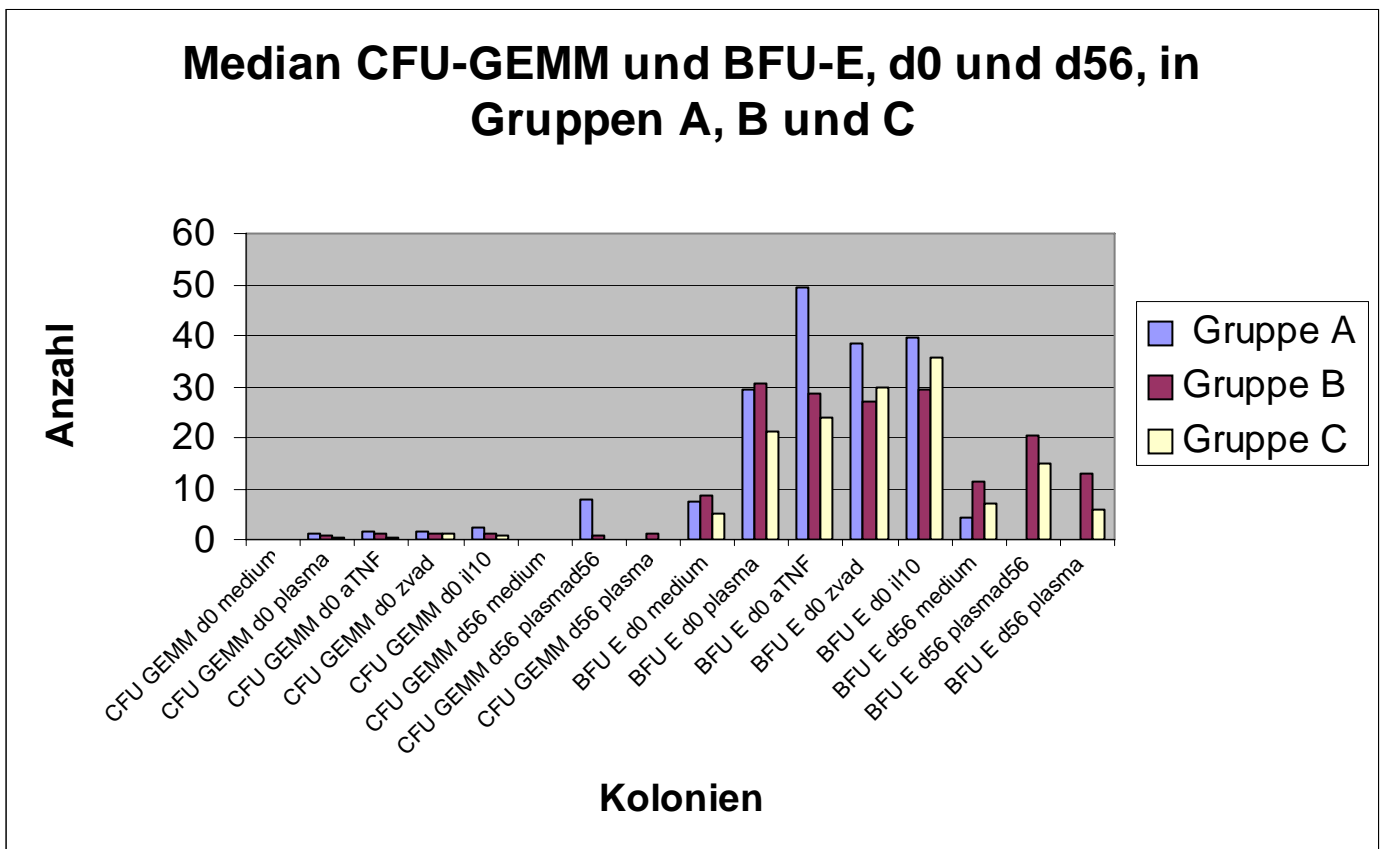


Abb. 17 b

Abb. 17 a und b: Median der Koloniezahlen der verschiedenen Koloniearten unter verschiedenen Zusätzen an Tag 0 und Tag 56.

Vergleicht man das Wachstum aller Kolonien ohne Berücksichtigung des Zeitpunkts unter Einfluss von Medium und Plasma, lässt sich ein unter Plasmapzusatz gesteigertes Wachstum aller Koloniereihen feststellen (s. Abb. 18)

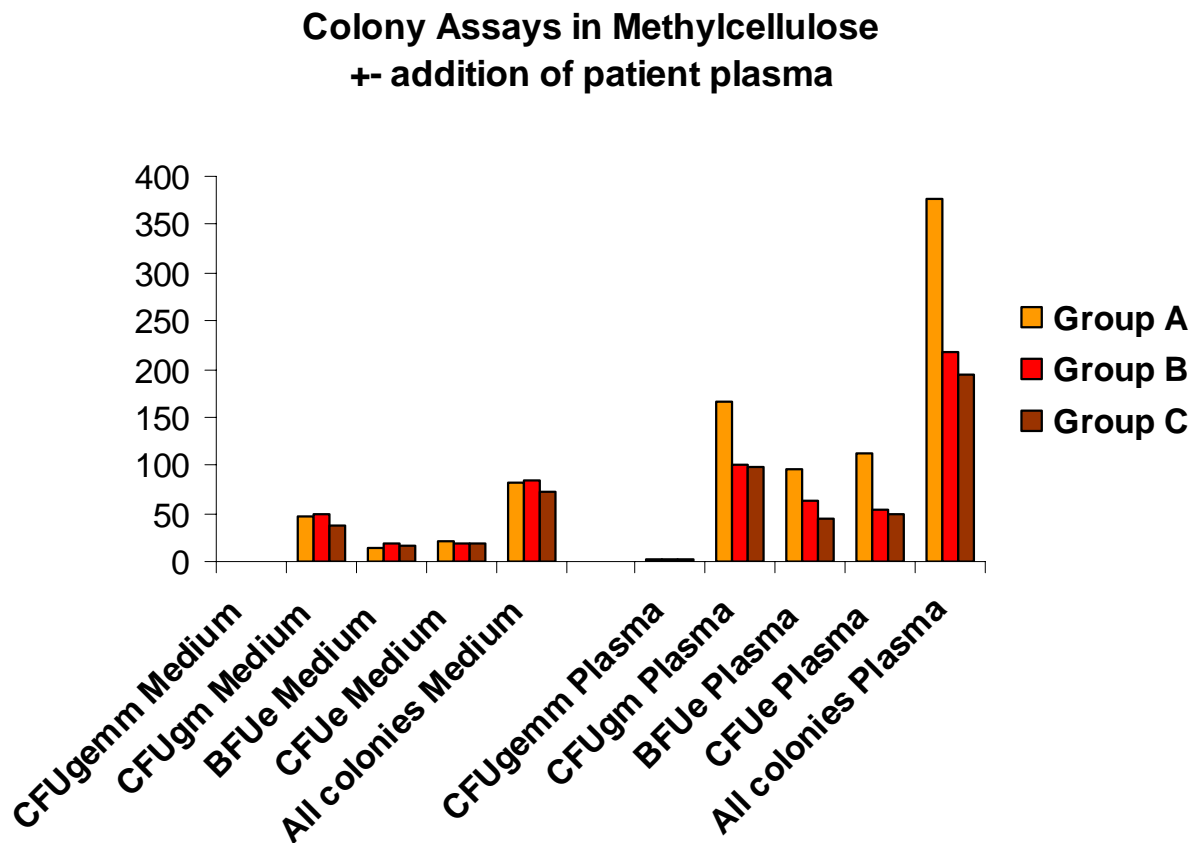


Abb. 18: Koloniewachstum im Vergleich von Zusatz Medium – Zusatz Plasma. Bei Plasma-Zugabe Steigerung des Wachstums aller Kolonielinien

3.5.2 Darstellung der Erythropoese in der Zytologie

Die aus Knochenmarkaspiraten angefertigten Ausstriche wurden mit unterschiedlichen Färbungen (Pappenheim-Färbung, Eisen-Färbung) auf verschiedene Merkmale untersucht, welche in untenstehender Tabelle 15 zusammengefasst sind.

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	p
Tag 0				
<u>Pappenheim</u>				
Zellularität ¹	2	2	2	p=0,15
Erythropoese (% Hämatopoese)	55	30	25	p<0,0001
Dyserythropoese ² (0/1/2)	1 (1/14/5)	0 (15/9/2)	0 (16/3/2)	p<0,0001
Granulopoese ¹	2	2	2	p=0,33
Linksverschiebung j/n	7/11	6/16	4/15	p=0,48
Eosinophilie (% Granulozyten)	5	5	10	p=0,50
Megakaryopoese ¹	3	2	3	p=0,16
Makrophagen ¹	3	2	2	p=0,02
Kernphagozytose ²	0,5	0	0	n.s.
Pigment ² (0/1/2)	2 (0/3/14)	2 (2/6/13)	1 (4/6/7)	p=0,030
<u>Eisen</u>				
Speichereisen	3	2	2	p=0,005
0/1/2/3/4	1/1/7/5/5	2/9/9/4/0	4/6/7/2/2	
Sideroblasten	1,5	0	0	p=0,0002
0/1/2/3/4	3/7/8/2/0	14/7/4/0/0	15/2/2/0/0	
Eisenstoffwechsel ³ 1/2/3/4	2/4/9/4	11/3/10/0	10/1/9/0	p=0,01
Tag 56				
<u>Pappenheim</u>				
Zellularität p=1,0	alle 2	alle 2	alle 2	
Erythropoese p=0,60	20	20	20	
Dyserythropoese p=0,35	0	0	0	
0/1/2	6/1/0	16/0/0	9/1/0	
Granulopoese p=1,0	2	2	2	
Linksverschiebung y/n p=0,60	¾	5/12	2/8	
Eosinophile (%) p=0,16	8	15	9	
Megakaryopoese p=0,28	2	2	2	
Makrophagen p=0,34	2	2	2	
Kernphagozytose p=0,82	0	0	0	
Pigment p=0,048	2	1	1	
0/1/2	0/2/5	4/8/5	4/4/2	
<u>Eisen</u>				
Speichereisen p=0,27	2	1	1	
0/1/2/3/4	0/2/3/1/1	3/5/5/0/1	0/4/2/0/1	
Sideroblasten p=0,70	0	1	1	
0/1/2/3/4	4/2/0/1/0	7/4/6/0/0	3/5/2/0/0	
Eisenstoffwechsel p=0,19				
½/3/4	2/0/4/1	8/4/1/1	4/1/2/0	

Tab. 15.: Zusammenfassung der zytomorphologischen Merkmale der Knochenmarkspirate der Patienten aus Gruppe A, B und C (*Median, Wilcoxon, Kruskal-Wallis, Pearson test*)

n.s. nicht signifikant

¹ 0=„-“; 1=„-“; 2=normal; 3=„+“; 4=„++“

² 0=keine 1=„+“; 2=„++“

³ 1=leere Eisenspeicher, 2=normaler Gehalt, 3=Innerer Mangel, 4=Eisenüberladung

Zunächst wurde der Anteil der Erythropoese an der gesamten Hämatopoese beurteilt (s. Abb. 19). Es zeigt sich, dass bei den schwer anämischen Patienten der Gruppe A am Tag der Aufnahme (Tag 0) der Anteil der Erythropoese etwa doppelt so hoch ist wie bei Patienten der Gruppen B und C. An Tag 56 zeigt sich diesbezüglich kein Unterschied mehr zwischen den drei Patientengruppen.

Erythropoese in % der Hämatopoese in der KM-Zytologie in Gruppen A, B und C an Tag 0 und Tag 56

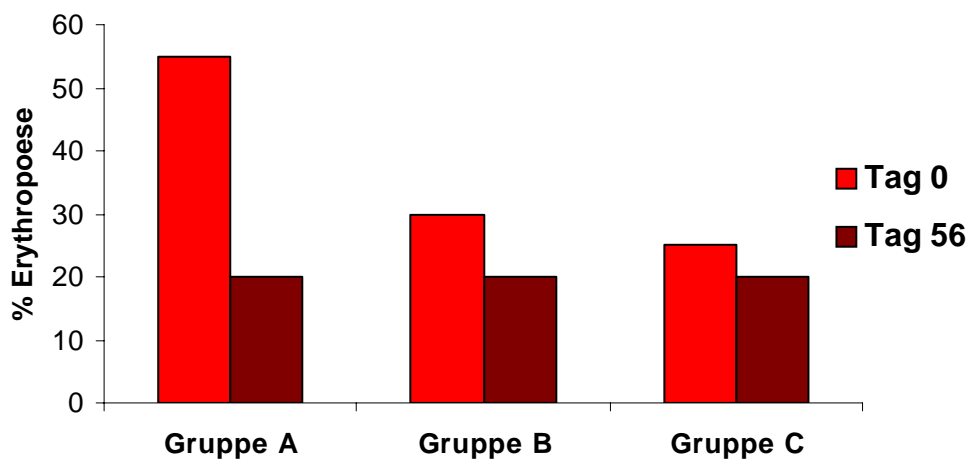


Abb. 19 : Anteil der Erythropoese an der Hämatopoese in % in den Gruppen A, B und C an Tag 0 und Tag 56

Weiterhin wurde der Anteil der Dyserythropoese an der gesamten Erythropoese in den verschiedenen Gruppen und zu verschiedenen Zeitpunkten beurteilt (Einteilung nach Büchner units). Hierbei lässt sich feststellen, dass zwar bei Patienten aller drei Gruppen am Aufnahmetag eine Dyserythropoese vorlag, diese ist bei Patienten der Gruppen B und C allerdings als geringgradig einzustufen. Die Patienten der Gruppe A hingegen zeigten größtenteils eine mäßig- bis schwergradige Dyserythropoese (s. Abb. 20).

Dyserythropoese in der KM-Zytologie in den Gruppen A, B und C an Tag 0 und Tag 56

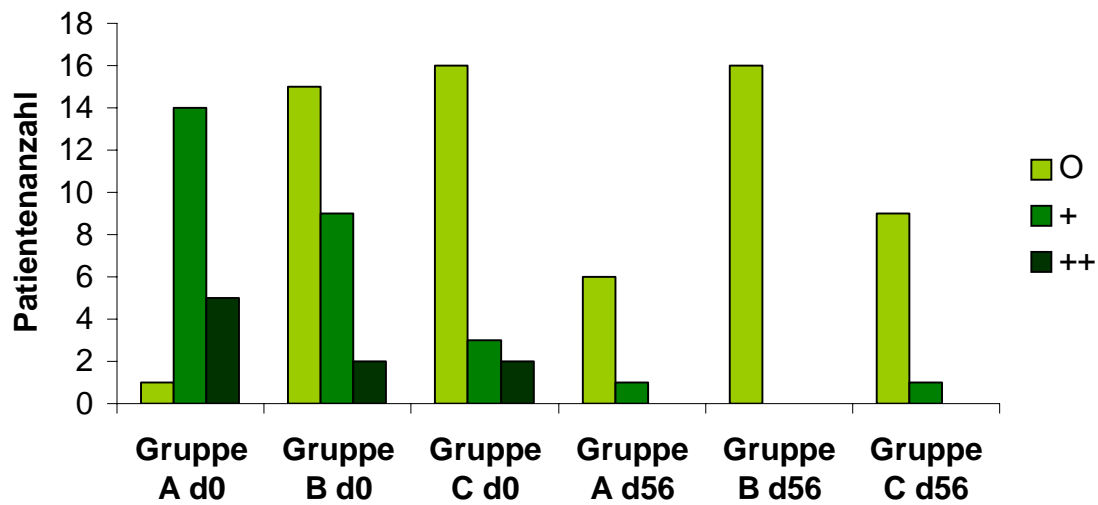


Abb. 20: Ausprägung und Anteil der Dyserythropoese in der KM-Zytologie in den Gruppen A, B und C an Tag 0 und Tag 56 (Zuordnung nach Büchner units)

Nach einem ähnlichen Schema wie oben beschrieben wurde der Anteil an malariapigmenthaltigen Zellen im Knochenmark untersucht und beurteilt (Einteilung in Rudat units). Auch hier ließen sich signifikanten Unterschieden zwischen den drei Gruppen am Aufnahmetag feststellen: Während im Knochenmark der Patienten aus den Gruppen B und C zwar auch zu einem geringen Grad pigmenthaltige Zellen zu finden waren, ist der Anteil der stark pigmenthaltigen Zellen bei Patienten der Gruppe A höher (s. Abb. 21).

Pigment in der KM-Zytologie an Tag0 und Tag 56 in den Gruppen A, B und C

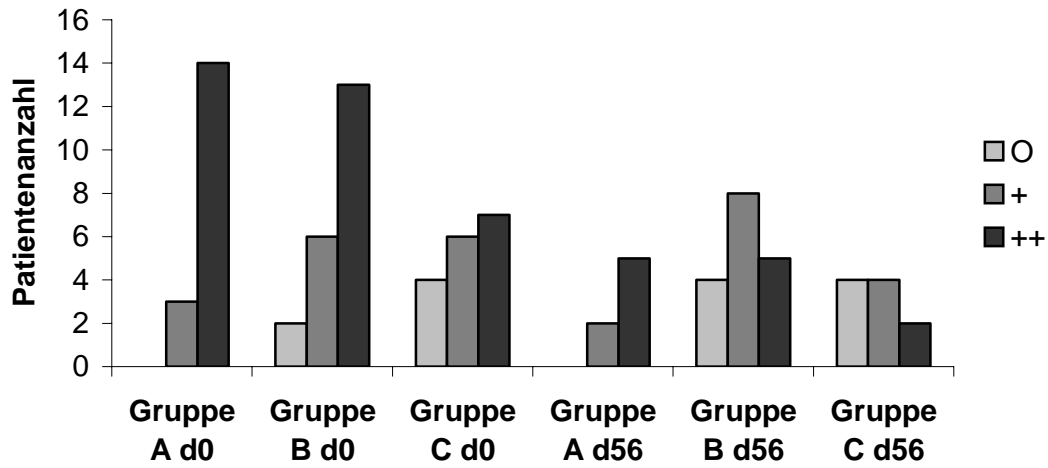


Abb. 21: Ausprägung und Anteil von Malariapigment in der KM-Zytologie in den Gruppen A, B und C an Tag 0 und Tag 56 (Zuordnung nach Rudat units)

4. Diskussion

Die Entstehung der Malaria-Anämie ist als ein multifaktoriell bedingtes Geschehen anzusehen. Drei Pathomechanismen scheinen im Wesentlichen daran beteiligt zu sein: Hämolyse, Erythrophagozytose und Dyserythropoese.

In zahlreichen Übersichtsarbeiten wird angenommen, dass allein Hämolyse und Phagozytose parasitierter Erythrozyten für das Ausmaß der Anämie verantwortlich sind (Hendrickse and al. 1971; Abdalla 1990; Jakeman, Saul et al. 1999; Menendez, Fleming et al. 2000; Ekvall, Arese et al. 2001; Manson 2002; Chang and Stevenson 2004; Mackintosh, Beeson et al. 2004). So wurde festgestellt, dass die Anämie mit der Parasitendichte im Blut und daraus resultierender Hämolyse und Phagozytose allein der parasitierten Erythrozyten korreliert (Ekvall, Premji et al. 2001). Andererseits wurde von einigen anderen Autoren beschrieben, dass die Parasitämie nur selten mit dem Ausmaß der Anämie korreliert (Abdalla 1990; Jakeman, Saul et al. 1999; Menendez, Fleming et al. 2000). Auch in der vorliegenden Studie ließ sich die Schwere der Anämie nicht durch die Parasitämie erklären, da sich weder bei der Parasitämie noch bei der Parasiteneliminationszeit signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen A, B und C fanden (s. Abb. 9).

Weiterhin kommt einer beeinträchtigten Erythropoese bei Malaria eine erhebliche Bedeutung bei der Entstehung der Malaria-Anämie zu. Ziel dieser Arbeit war, die Folgen einer Infektion mit *Plasmodium falciparum* für die Erythropoese genauer zu untersuchen. Dabei wurde mit Hilfe von Colony Assays auch der Einfluss verschiedener Zytokine auf die Erythropoese untersucht. Zytologisch wurde das Knochenmark beurteilt und im Hinblick auf die Zellularität, eine vorhandene Dyserythropoese sowie seinen Gehalt an Malaria-Pigment analysiert. Besonders bezüglich der Zellularität des Knochenmarks finden sich in der spärlichen Literatur widersprüchliche Aussagen. Zum Teil wird eine Hyperplasie der Erythropoese beschrieben (Abdalla 1990; Wickramasinghe and Abdalla 2000), in anderen Arbeiten wurde ein hypozelluläres Knochenmark mit einer verminderten Erythropoese gefunden (Jootar, Chaisiripoomkere et al. 1993).

Parasitämie und Parasiteneliminationszeit allein sind nicht für das Ausmaß der Malaria-Anämie verantwortlich

In der vorliegenden Arbeit wurde die Parasitämie und deren Verlauf vom Aufnahmetag bis zum Ende des Beobachtungszeitraums (Tag 56) untersucht. Es fanden sich diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen A, B und C. Somit lässt sich auch mit dieser Studie die lange geltende Annahme, allein die Parasitämie sei für das Ausmaß der Malaria-Anämie verantwortlich, widerlegen. Zwar spielen Hämolyse und Phagozytose parasitierter Zellen zweifellos eine Rolle, diese reicht aber nicht aus, um die teilweise sehr schweren Verläufe der Malaria-Anämie zu erklären. Auch Patienten mit verhältnismäßig geringer Parasitendichte im Blut litten unter einer schweren Anämie. Die Verweilzeit von Plasmodien im Blut ist ebenfalls nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie von untergeordneter Bedeutung für den Ausprägungsgrad der Anämie bei Malaria, da sich die Parasiteneliminationszeit zwischen den verschiedenen Gruppen nicht signifikant unterschied. Ein wichtiger Faktor für die Anämieentstehung dürfte aber eine Veränderung der Membraneigenschaften des gesamten Blutpools von Erythrozyten sein, welcher dazu führt, dass pro parasitiertem Erythrozyten noch durchschnittlich weitere 8,5 Erythrozyten phagozytiert werden, ohne dass sich in ihnen ein Malariaparasit befindet. (Jakeman, Saul et al. 1999; Waitumbi, Opollo et al. 2000) Auch hierdurch lassen sich aber die unterschiedliche Schwere der Anämie im untersuchten Patientenkollektiv bei eben annähernd gleicher Parasitämie bei Aufnahme in die Studie und annähernd gleicher Parasiteneliminationszeit nicht erklären. Es müssten bei nicht signifikant verschiedener Parasitendichte ja proportional gleichviele nichtparasitierte Erythrozyten in den drei Gruppen hämolysiert werden.

Retikulozytenzahlen steigen zeitgerecht und adäquat an

Betrachtet man den Verlauf der absoluten Retikulozytenzahlen, so finden sich bei Aufnahme keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen (s. Abb. 11). Die Retikulozytenzahlen liegen in den Gruppen B und C im Normalbereich für Kinder im Alter zwischen 12 Monaten und sechs Jahren (0,8-2,2 Prozent gemessen an der Erythrozytenzahl) (Thomas 2005; Sitzmann 2006). In der Gruppe A finden sich mit 4,5% bereits bei Aufnahme erhöhte Retikulozytenzahlen, allerdings ist die absolute Retikulozytenzahl nicht erhöht. In der Gruppe A würde man bei bestehender Anämie eine deutliche Erhöhung der absoluten

Retikulozytenwerte erwarten. Dies ist in der vorliegenden Studie nicht der Fall (Abb. 11). Wenn es sich um eine akute Anämie handelt, könnte man davon ausgehen, dass die Retikulozytenantwort noch nicht erfolgt ist. Bei einer bereits seit mehreren Tagen bestehenden Anämie wäre die Retikulozytenantwort als inadäquat zu bezeichnen.

Retikulozyten benötigen unter physiologischen Bedingungen etwa drei Tage bis zur Ausschwemmung ins periphere Blut. Nach sieben bis zehn Tagen ist bei Erkrankungen mit akutem Hb-Verlust oder akuter Hypoxie das Maximum des Retikulozytenanstiegs zu beobachten (Thomas 2005).

Das Maximum des Retikulozytenanstiegs wird bei Patienten der Gruppe A nach etwa fünf Tagen erreicht. Unter Berücksichtigung der o.g. Latenzzeiten und Normwerte für den Retikulozytenanstieg lässt sich somit feststellen, dass der Anstieg der Retikulozytenzahlen sowohl zeitgerecht als auch adäquat ist. Im Verlauf gleichen sich die Retikulozytenzahlen der schwer anämischen Patienten aber wieder denen der Gruppen B und C an und sind an Tag 28 und 56 schließlich im Normalbereich.

Probleme bereitet die Interpretation der bereits bei Aufnahme erhöhten Retikulozytenzahlen: Entweder bestand bereits vor Aufnahme eine möglicherweise chronische Anämie, durch die die erhöhten Retikulozytenzahlen erklärt werden könnten. Dieses sollte aber durch o.g. Ein- und Ausschlusskriterien weitgehend vermieden sein. Eine vorbestehende Eisenmangelanämie als verbreitetste Anämieform lässt sich mit großer Sicherheit ausschließen (s.u.).

Eine andere Möglichkeit wäre eine im kindlichen Knochenmark deutlich verkürzte Antwort auf eine akute schwere Anämie. Es ist bekannt, dass beispielsweise nach akuten Blutungen die übliche physiologische Latenzzeit bis zur Ausschwemmung der Retikulozyten ins periphere Blut verkürzt sein kann (Thomas 2005). Bis zu welchem Ausmaß dieses insbesondere im kindlichen Knochenmark möglich ist, ist nicht bekannt. Wenn also eine Malariainfektion bereits einige Tage vor Aufnahme aufgetreten ist und die Knochenmarkantwort bereits stattgefunden hat und deutlich verkürzt ist, könnte dies die bereits an Tag 0 erhöhten Retikulozytenzahlen erklären. Vorstellbar als Erklärung hierfür wäre aber auch ein direkter Einfluß von Malariaparasiten im Blut oder Knochenmark auf die Ausschwemmung von Retikulozyten. Dagegen sprechen im Wesentlichen normale Retikulozytenzahlen bei Patienten der Gruppen B und C, welche sich bezüglich der Parasitämie nicht unterscheiden (s.o.). Ein direkter Einfluß von Parasiten auf Retikulozyten und deren Ausschwemmung ist also dann nur bei Infektion der Patienten der Gruppe A durch einen besonders „virulenten“ Parasitenstrang möglich.

Eisenmangel und dessen Folgen können als Ursache für die schwerere Malaria-Anämie ausgeschlossen werden

Die Prävalenz einer Eisenmangelanämie in Afrika südlich der Sahara ist hoch (WHO 1996; WHO 2003; Walker 2007). Vor allem Ernährungsfaktoren und Wurminfektionen spielen in diesem Gebiet eine Rolle bei der Pathogenese des Eisenmangels. Es wäre daher denkbar, dass eine vorbestehende Eisenmangelanämie bei den Kindern der Gruppe A die schwere Anämie bei Malaria wenn auch nicht allein bedingt dann doch zumindest verstärkt. In der vorliegenden Studie lagen jedoch am Aufnahmetag bei schwer anämischen Kindern die Eisenwerte höher als bei Kindern der beiden anderen Gruppen. Dies könnte bedeuten, dass ein bereits vorbestehender Eisenmangel, also leere Eisenspeicher aber ohne Vorhandensein einer Anämie, vor einem starken Hb-Abfall bei Infektion mit *Plasmodium falciparum* „schützt“. Eine Hämoglobinsynthesestörung bei Eisenmangel stellt den Parasiten im Rahmen der Malariainfektion weniger Hämoglobin als „Nahrungsbestandteil“ zur Verfügung (Goldberg 2005; Min-Oo and Gros 2005). Somit wäre es für die Plasmodien wesentlich „wirtschaftlicher“, Infektionen bei Patienten ohne vorbestehenden Eisenmangel und damit ohne Prädisposition für eine Hb-Synthesestörung auszulösen.

Erythropoetin-Antwort

Normale Epo-Serumspiegel liegen bei Kindern zwischen 6 und 25 U/l. Epo-Serumspiegel können bei akuter Blutung, Hämolyse oder Hypoxie bereits innerhalb weniger Stunden stark ansteigen und erreichen nach 1-3 Tagen ein Maximum. In Gruppe C finden sich an Tag 0 im Mittel normale Epo-Serumspiegel (25 U/L). In Gruppe B sind sie bei Aufnahme moderat (140 U/L), in Gruppe A sehr deutlich erhöht (>1200 U/L). Dies ist sowohl für Patienten der Gruppe B als auch der Gruppe A bereits ein Maximalwert. Wie oben bereits diskutiert scheidet eine vorbestehende Eisenmangelanämie als Ursache der hohen Epo-Werte aus. Auch andere Anämieformen und -ursachen sollten mittels der Ein- und Ausschlußkriterien im Wesentlichen ausgeschlossen sein. Die in der Gruppe A und B hohen Epo-Werte sind somit am ehesten als Reaktion auf die akute Malaria-Anämie zu deuten. Von der Prämisse ausgehend, dass der Zeitpunkt der Infektion einige Tage vor Aufnahme in die Studie (also vor Tag 0) lag, lässt sich feststellen, dass die Latenzzeit bis zum Erreichen des Maximums der Epo-Serumspiegel den in der Literatur zu findenden Normalwerten entspricht. Geht man

davon aus, dass die Infektion erst an Tag 0 stattgefunden hat, könnten die bereits an diesem Tag maximalen Epo-Werte durch eine verkürzte Epo-Antwort erklärt werden.

Ebenso könnte die Ausbreitung der Plasmodien ein direkter Stimulus für die Epo-Ausschüttung sein. Die Parasiten profitieren, wie oben erwähnt, von Hämoglobin als Nahrungsgrundlage, würden also bei starkem Hb-Abfall die eigene Ausbreitung limitieren.

Das Wachstum erythropoetischer Progenitorkolonien wird durch eine Veränderung der Zell-Zell-Wechselwirkungen und den Einfluss des Knochenmarkplasmas bei P.falciparum-Infektion gesteigert

Vergleicht man das Wachstum von hämatopoetischen Kolonien in Methylcellulose unter Zugabe verschiedener Zusätze, so stellt man fest, dass lediglich die Zugabe von Plasma vom Aufnahmetag zu mononukleären Progenitor-Zellen das Koloniewachstum wesentlich beeinflusst. Der Zusatz von anti-TNF- α und IL-10, sowie eines Caspaseinhibitors, hier zvad-fmk, hat keinen signifikanten Anstieg der Koloniezahlen zur Folge.

Ein Einfluss der Zugabe von Knochenmarkplasma von Tag 0 oder Tag 56 zu Zellen von Tag 56 lässt sich nicht feststellen. Allerdings steigert das Knochenmarkplasma von Tag 0 das Wachstum von Zellen von Tag 0 insbesondere in der Gruppe A sehr deutlich, beeinflusst aber nicht aber die Koloniebildung von Zellen von Tag 56.

Einen eindeutigen Einfluss allein des Knochenmarkplasmas auf das Koloniewachstum kann man also weder für das Plasma von Tag 0 noch für das Plasma von Tag 56 formulieren. Dieses widerlegt die viel vertretene Annahme, dass sich bei akuter Malariainfektion im Knochenmarkplasma eine oder mehrere Substanzen befinden, die die Erythropoese supprimieren und damit verantwortlich für die Entstehung der schweren Malaria-Anämie sind. Im Gegenteil wird die Erythropoese durch eine Substanz im Knochenmarkplasma bei akuter Infektion gesteigert. Allerdings geschieht dies nicht allein durch den Einfluss des Knochenmarkplasmas. Aus oben Dargelegtem kann man lediglich folgern, dass zwischen den mononukleären erythropoetischen Vorläuferzellen zum Zeitpunkt der Malaria-Infektion eine Veränderung in den Zell-Zell-Wechselwirkungen bzw. Zelleigenschaften vorliegen muss, welche unter Einfluss bestimmter Faktoren im Knochenmarkplasma zu einer gesteigerten Erythropoese führt.

Anti-TNF- α , IL-10 und zvad-fmk haben keinen Einfluss auf die Erythropoese bei schwerer Malaria-Anämie

Die oben erwähnten Faktoren im Knochenmarkplasma, die zusammen mit Zell-Zell-Wechselwirkungen die Erythropoese bei Malaria steigern, scheinen weder TNF- α noch IL-10 zu sein. Durch Zugabe von IL-10 bzw. anti-TNF- α lässt sich der Effekt weder auslösen noch verstärken. Auch die Zugabe des Caspase-Inhibitors zvad-fmk zeigt keinen Einfluss auf die Erythropoese. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen verschiedener Studien, welche beispielsweise in einem Mausmodell durch Injektion von TNF- α eine Dyserythropoese auslösen konnten (May, Lell et al. 2000; Wickramasinghe and Abdalla 2000; McDevitt 2004). Weiterhin wurde bei Kindern mit schwerer Malaria-Anämie eine wesentlich höhere TNF-alpha/IL-10-Ratio gefunden als bei Kindern mit milderer Anämieverläufen. Dieses legt ebenfalls einen Einfluss dieser Zytokine auf die Erythropoese nah (McDevitt 2004). Die Zytokineinflüsse auf die Pathogenese der schweren Malaria-Anämie waren in der vorliegenden Studie mit verhältnismäßig großer Studienpopulation nicht reproduzierbar und somit wahrscheinlich auch nicht therapeutisch nutzbar. Dieses schließt aber natürlich keinesfalls den Einfluß anderer Substanzen auf die Erythropoese aus, die sich nach unseren Ergebnissen a.e. im Knochenmarkplasma bei akuter Malariainfektion nachweisen lassen müssten. Allerdings zeigte sich ja durch Zugabe von Knochenmarkplasma bei akuter Infektion zu Zellen vom Tag der akuten Infektion eine Steigerung der Erythropoese in vitro. Dies könnte als Gegenregulationsmechanismus gegen den Erythrozyten- und Hb-Verlust durch Hämolyse und Erythrophagozytose bei Malariainfektion werten.

Zytologisch findet sich bei schwerer Malaria-Anämie eine Hyperplasie der Erythropoese mit erhöhtem Anteil an dyserythropoietischen Zellen

Im Gegensatz zu den Aussagen einiger anderer Autoren, die eine supprimierte Erythropoese bei Malaria-Anämie beschreiben (Abdalla and Wickramasinghe 1988; Wickramasinghe and Abdalla 2000), konnte in der vorliegenden Studie eine gesteigerte Erythropoese im Vergleich zur gesamten Hämatopoese im Knochenmark gefunden werden. Gleichzeitig war besonders bei den schwer anämischen Patienten der Anteil von Dyserythropoese an der Erythropoese

auffallend hoch. Weiterhin fiel das Knochenmark von schwer anämischen Patienten der Gruppe A durch einen überdurchschnittlichen Gehalt an Malariapigment, also phagozytierten Plasmodienresiduen, auf. Es lässt sich also sagen, dass die Entwicklung einer schweren Malaria-Anämie unter anderem durch den hohen Anteil von Dyserythropoese trotz insgesamt vorliegender Hyperplasie der Erythropoese bedingt ist. Dabei scheint die Dyserythropoese auch mit einem höheren Anteil an Malariapigment im Knochenmark einherzugehen bzw. durch die dann als Malariapigment sichtbaren phagozytierten Parasiten bedingt zu sein.

Zusammenfassende Diskussion

Nach Zusammenschau der oben einzeln diskutierten Aspekte kann man sagen, dass die beeinträchtigte Erythropoese neben der Hämolyse und der Erythrophagozytose eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der schweren Malaria-Anämie spielt.

In der frühen Phase der Erythropoese scheint bei *P. falciparum*-Infektion eine Veränderung auf der Ebene der Zell-Zell-Interaktionen vorzuliegen, welche sich aber lediglich im Zusammenspiel mit einem veränderten Knochenmarkplasma steigernd auf die Erythropoese auswirkt. In diesem veränderten Knochenmarkplasma scheinen weder anti-TNF α noch IL-10 diesen Einfluss auf die Erythropoese zu haben, da bei Zusatz dieser Zytokine bzw. des Zytokinantikörpers keinerlei wachstumssteigernde oder wachstumsbeschleunigende Wirkung zu beobachten ist. Auch der unspezifische Caspase-Inhibitor zvad-fmk hat diesbezüglich keine Wirkung. Andererseits schließen diese Ergebnisse keinesfalls einen pathophysiologisch bedeutsamen Beitrag von anti-TNF α , IL-10 und zvad-fmk aus.

Besonders die späten Vorläuferzellen der Erythrozyten zeigen sich im Knochenmark als vermehrt und bei schwer anämischen Patienten in hohem Maße dyserythropoetisch. Passend zu der bereits am Aufnahmetag bestehenden Hyperplasie der Erythropoese finden sich im peripheren Blut der schwer anämischen Patienten zu diesem Zeitpunkt wie erwartet deutlich höhere relative Retikulozytenzahlen als bei Patienten der Gruppen B und C. Betrachtet man die absoluten Retikulozytenzahlen ist dieser Unterschied nicht mehr so deutlich. Die Retikulozytenzahlen steigen erst nach etwa zwei Tagen, also mit Abfall der Parasiten im Blut, weiter an. Dieser Anstieg ist am deutlichsten bei den schwer anämischen Patienten der Gruppe A zu beobachten, findet sich in geringerem Ausmaß aber auch bei den Patienten der Gruppe B. Der Retikulozytenanstieg selbst und auch die Zeit bis zum Maximum des Anstiegs

sind nach den vorliegenden Ergebnissen adäquat. Auch die Epo-Antwort auf die schwere Anämie ist wie zu erwarten schnell und adäquat für das Ausmaß der Anämie. Letztlich muss man also nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie folgern, dass zunächst alle physiologischen Regulationsmechanismen auf erythropoetischer Ebene, die als Reaktion auf eine Anämie dieses schweren Ausmaßes ablaufen, normal zu funktionieren scheinen. Das Schwere der Anämie ließe sich nach diesen Ergebnissen als auf Ebene der Erythropoese zunächst nicht erklären. Allerdings müsste man für die Entstehung der Malaria-Anämie noch die Möglichkeit in Betracht ziehen, dass zwar die physiologische Antwort auf die Erkrankung ungestört ablaufen kann, dass aber nach Ausschwemmung der Retikulozyten aus dem Knochenmark diese zerstört werden. Dies könnte ein direkter oder indirekter Parasiteneffekt sein. Beachtet man dabei aber die durchschnittlichen Steigerungen der Hb-Werte der schwer anämischen Patienten, so findet man diese mit 0,3 g/dL/Tag auch im Normalbereich (Thomas 2005). Insgesamt stellt man also fest, dass sich auf Ebene der Erythropoese kein Grund und also auch keine Beeinflussungsmöglichkeit für die schwere Malaria-Anämie findet.

Aus diesen Überlegungen ist zu folgern, dass somit wohl nicht eine beeinträchtigte Erythropoese oder verminderte Epo-Antwort, sondern eher die beiden anderen Faktoren Hämolyse und Erythrophagozytose eine größere Rolle bei der Pathogenese der schweren Malaria-Anämie spielen. Es wäre also von Nutzen, diese beiden Aspekte noch näher zu untersuchen. Hämolyseparameter wie Lactatdehydrogenase und Bilirubin im Serum sollten bestimmt werden, um einen Vergleich des Ausmaßes der Hämolyse in den drei Gruppen zu ermöglichen. Die Milzgröße als Hinweis auf einen vermehrten Abbau von Erythrozyten im retikuloendothelialen System wurde im Rahmen der Routineuntersuchungen zu Therapiebeginn und im Verlauf bestimmt und ergab signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen (s. Tab. 3). Daneben wären aber auch noch Untersuchungen zur Monozyten- bzw. Makrophagenaktivität und ein Vergleich zwischen den drei Gruppen interessant. Mit diesen weiteren Untersuchungen in Zusammenschau mit den Resultaten der vorliegenden Studie könnte man sich genauere Aussagen zur Pathogenese und vielleicht letztlich auch zur besseren Therapie der schweren Malaria-Anämie erhoffen.

5. Literaturverzeichnis

- Redaktion Weltalmanach (Hrsg.) (2007). Fischer Weltalmanach aktuell: Afrika, Fischer Verlag.
- Abdalla, S. H. (1990). "Hematopoiesis in human malaria." Blood Cells **16**(2-3): 401-16; discussion 417-9.
- Abdalla, S. H. and S. N. Wickramasinghe (1988). "A study of erythroid progenitor cells in the bone marrow of Gambian children with falciparum malaria." Clin Lab Haematol **10**(1): 33-40.
- Ambroise-Thomas, P. (2004). "Malaria: from genetic and molecular biology to disease control." J Soc Biol **198**(3): 181-185.
- Anstey, N., D. Granger, et al. (1999). "Nitric oxide, malaria and anemia: inverse relationship between nitric oxide production and hemoglobin concentration in asymptomatic malaria-exposed children." Am J Trop Med Hyg **61**(6): 249-252.
- Baer, A., E. Dessypris, et al. (1987). "Blunted erythropoietin response to anemia in rheumatoid arthritis." Br J Haematol **66**: 559-564.
- Banguero, H. (1984). "Socioeconomic factors associated with malaria in Colombia." Soc Sci Med **19**(10): 1099-104.
- Brandts, C. H., M. Ndjave, et al. (1997). "Effect of paracetamol on parasite clearance time in Plasmodium falciparum malaria." Lancet **350**(9079): 704-9.
- Brewster, D. (1990). "Neurological sequelae of malaria in childhood." Lancet **336**: 1039-1043.
- Burchard, G. D., P. Radloff, et al. (1995). "Increased erythropoietin production in children with severe malarial anemia." Am J Trop Med Hyg **53**(5): 547-51.
- Burgmann, H., S. Looareesuwan, et al. (1996). "Serum levels of erythropoietin in acute Plasmodium falciparum malaria." Am J Trop Med Hyg **54**(3): 280-3.
- Chang, K. and M. Stevenson (2004). "Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria." Int J Parasitol **34**(13-14): 1501-1516.
- Clark, I. A. and G. Chaudhri (1988). "Tumour necrosis factor may contribute to the anaemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis." Br J Haematol **70**(1): 99-103.
- Curry, J. and J. Trentin (1967). "Hematopoietic spleen colony studies. I: Growth and differentiation." Dev Biol **15**(395).
- Day, N. P., T. T. Hien, et al. (1999). "The prognostic and pathophysiologic role of pro- and anti-inflammatory cytokines in severe malaria." J Infect Dis **180**(4): 1288-97.
- Dodoo, D., F. Omer, et al. (2002). "Absolute levels and ratios of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to Plasmodium falciparum malaria." J Infect Dis **185**: 971-979.
- Dondorp, A. M., B. J. Angus, et al. (1999). "Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe falciparum malaria." Am J Trop Med Hyg **60**(5): 733-7.
- Ekvall, H., P. Arese, et al. (2001). "Acute haemolysis in childhood falciparum malaria." Trans R Soc Trop Med Hyg **95**(6): 611-7.
- Ekvall, H., Z. Premji, et al. (2001). "Hemoglobin concentration in children in a malaria holoendemic area is determined by cumulated Plasmodium falciparum parasite densities." Am J Trop Med Hyg **64**(1-2): 58-66.
- Faquin, W., T. Schneider, et al. (1992). "Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production." Blood **79**: 1987-1994.

- Fried, M., F. Nosten, et al. (1998). "Maternal antibodies block malaria." Nature **395**(6705): 851-2.
- Goldberg, D. (2005). "Hemoglobin degradation." Curr Top Microbiol Immunol(295): 275-291.
- GreatScopes, I. (2006). "Preparing a Blood Smear." 2006, from <http://www.greatscopes.com/act001.htm>.
- Gregory, C. and A. Eaves (1977). "Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro." Blood **49**(855).
- Gregory, C. and A. Eaves (1978). "Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties." Blood **51**(527).
- Hastings, I. (2007). "The anatomy of a malaria disaster: drug policy choice and mortality in African children." Lancet Infect Dis **EPub**.
- Hendrickse, R. and e. al. (1971). "Malaria in early childhood. ." Ann Trop Med Parasitol **65**(1): 1-20.
- Hoffman, R. (2000). Hematology: Basic Principles and Practice. Philadelphia, Churchill Livingstone.
- Jakeman, G. N., A. Saul, et al. (1999). "Anaemia of acute malaria infections in non-immune patients primarily results from destruction of uninfected erythrocytes." Parasitology **119**(Pt 2): 127-33.
- Jelkmann, W., H. Pagel, et al. (1992). "Monokines inhibiting erythropoietin production in human hepatoma cultures and in isolated perfused rat kidneys." Life Sci **50**: 301-308.
- Jootar, S., W. Chaisiripoomkere, et al. (1993). "Suppression of erythroid progenitor cells during malarial infection in Thai adults caused by serum inhibitor." Clin Lab Haematol **15**(2): 87-92.
- Jr, R. M. and S. Krantz (1991). "Inhibition of human erythroid colony forming units by gamma interferon can be corrected by recombinant human erythropoietin." Blood **78**: 2564-2567.
- Jr, R. M., N. Olsen, et al. (1989). "Treatment of the anemia of rheumatoid arthritis with recombinant human erythropoietin: clinical and in vitro studies." Arthritis Rheum **32**: 638-642.
- Korenromp, E. (2003). "Measurement of trends in childhood malaria mortality in Africa: an assessment of progress toward targets based on verbal autopsy." Lancet Infectious Diseases **3**(6): 349-358.
- Koury, M. J., S. T. Sawyer, et al. (2002). "New insights into erythropoiesis." Curr Opin Hematol **9**(2): 93-100.
- Krantz, S. (1991). "Erythropoietin." Blood **77**(419).
- Kremsner, P., G. Zotter, et al. (1988). "A comparative trial of three regimens for treating uncomplicated malaria in Acre, Brazil." J Infect Dis **158**: 1368-1371.
- Kremsner, P. G., P. Radloff, et al. (1995). "Quinine plus clindamycin improves chemotherapy of severe malaria in children." Antimicrob Agents Chemother **39**(7): 1603-5.
- Kurtzhals, J. A., V. Adabayeri, et al. (1998). "Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria." Lancet **351**(9118): 1768-72.
- Kwiatkowski, D. and C. Bate (1997). "The malarial fever response--pathogenesis, polymorphism and prospects for intervention." Ann Trop Med Parasitol **91**(5): 533-542.
- Ladhani, S. (2007). "Imported malaria in children: a review of clinical studies." Lancet Infect Dis **7**(5): 349-357.
- Lell, B., J. May, et al. (1999). "The role of red blood cell polymorphisms in resistance and susceptibility to malaria." Clin Infect Dis **28**(4): 794-9.

- Li, C., L. Sanni, et al. (2003). "Pathology of *P. chabaudi* infection and mortality in IL-10-deficient mice are ameliorated by anti-tumour necrosis alpha and exacerbated by anti-transforming growth factor beta antibodies." Infect Immun **71**: 4850-4856.
- Luckner, D., B. Lell, et al. (1998). "No influence of socioeconomic factors on severe malarial anaemia, hyperparasitaemia or reinfection." Trans R Soc Trop Med Hyg **92**(5): 478-81.
- Mackintosh, C., J. Beeson, et al. (2004). "Clinical features and pathogenesis of severe malaria." Trends Parasitol **20**(12): 597-603.
- Manson, P. (2002). Manson's Tropical Diseases. London, Saunders.
- Marsh, K. and e. al. (1995). "Indicators of life-threatening malaria in African children." N Engl J Med **332**(21): 1399-404.
- May, J., B. Lell, et al. (2000). "Plasma interleukin-10:Tumor necrosis factor (TNF)-alpha ratio is associated with TNF promoter variants and predicts malarial complications." J Infect Dis **182**(5): 1570-3.
- McDevitt, M. (2004). "The Anemia of Malaria Infection: Role of Inflammatory Cytokines." Current Hematological Reports?(3): 97-106.
- Menendez, C., A. F. Fleming, et al. (2000). "Malaria-related anaemia." Parasitol Today **16**(11): 469-76.
- Mertelsmann, R., D. Berger, et al. (2006). Das Rote Buch. Landsberg, Ecomed.
- Metzger, W. G., B. G. Mordmuller, et al. (1995). "Malaria pigment in leucocytes." Trans R Soc Trop Med Hyg **89**(6): 637-8.
- Miller, K., J. Schooley, et al. (1989). "Inhibition of erythropoiesis by a soluble factor in murine malaria." Exp Haematol **17**: 379-385.
- Miller, L. H. (2002). "The pathogenic basis of malaria." Nature(415): 673-679.
- Min-Oo, G. and P. Gros (2005). "Erythrocyte variants and the nature of their malaria protective effect." Cell Microbiol **7**(6): 753-763.
- Muhe, L. (2000). "Evaluation of clinical pallor in the identification and treatment of children with moderate and severe anemia." Trop Med Int Health **5**(11): 805-10.
- Murphy, S. and J. Breman (2001). "Gaps in the childhood malaria burden in Africa: cerebral malaria, neurological sequelae, anemia, respiratory distress hypoglycemia and complications of pregnancy." Am J Trop Med Hyg **64**(1-2 suppl): 57-67.
- Nissen-Druey, C., A. Tichelli, et al. (2005). Human Hematopoietic Colonies in Health and Disease. Basel, Karger Verlag.
- Nissen-Druey, C., A. Tichelli, et al. (2005). "Human Hematopoietic Colonies in Health and Disease." Acta Haematologica **113**(1): 5-96.
- Othoro, C., A. A. Lal, et al. (1999). "A low interleukin-10 tumor necrosis factor-alpha ratio is associated with malaria anemia in children residing in a holoendemic malaria region in western Kenya." J Infect Dis **179**(1): 279-82.
- Pasvol, G. (1977). "Effects of fetal hemoglobin on susceptibility of red cells to *Plasmodium falciparum*." Nature **270**: 171-173.
- Quammen, D. (2001). "The Green Abyss: Megatransect Trail." National Geographic Magazine.
- Sachs, J. (2001). Macroeconomics and health: investing in health for economic development. Report of the Commission on Macroeconomics and Health. Geneva, World Health Organisation.
- Schellenberg, D. (1999). "African children with malaria in an area of intense *Plasmodium falciparum* transmission: features on admission to the hospital and risk factors for death." Am J Trop Med Hyg **61**(3): 431-8.
- Sitzmann, F. (2006). Pädiatrie. Stuttgart, Thieme Duale Reihe.
- Slutsker, L. (2001). "The prevention and management of severe anemia in children in malaria-endemic regions of Africa." WHO, Geneva: 1-42.

- Smith, T., R. Leuenberger, et al. (2001). "Child mortality and malaria transmission intensity in Africa." Trends Parasitol **17**(3): 145-9.
- Stauffer, W. and P. Fischer (2003). "Diagnosis and treatment of malaria in children." Clin Infect Dis **37**(10): 1340-1348.
- Thomas, L. (2005). Labor und Diagnose Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik.
- Till, J. and E. McCulloch (1964). "A stochastic model of stem cell proliferation based on the growth of spleen colony forming cells." Proc Natl Acad Sci **51**(29).
- VanZant, G. and E. Goldwasser (1977). "Simultaneous effects of erythropoietin and colony-stimulating factor on bone marrow cells." Science **198**(733).
- VanZant, G. and E. Goldwasser (1979). "Competition between erythropoietin and colony-stimulating factor for target cells in mouse marrow." Blood **53**(946).
- Verhoef, H., C. E. West, et al. (2002). "Malarial anemia leads to adequately increased erythropoiesis in asymptomatic Kenyan children." Blood **100**(10): 3489-94.
- Waitumbi, J. N., M. O. Opollo, et al. (2000). "Red cell surface changes and erythrophagocytosis in children with severe plasmodium falciparum anemia." Blood **95**(4): 1481-6.
- Walker, S. (2007). "Child development: risk factors for adverse outcomes in developing countries." Lancet **369**(9556): 145-157.
- Weatherall, D. J. (1988). The anaemia of malaria. Malaria: Principles and practice of malariology. W. H. Wernsdorfer and I. McGregor. Edinburgh, London, Melbourne und New York, Churchill Livingstone. **1**: 735-51.
- Weatherall, D. J., L. H. Miller, et al. (2002). "Malaria and the red cell." Hematology (Am Soc Hematol Educ Program): 35-57.
- Weber, M. (1997). "Pallor as a clinical sign in children: an investigation in The Gambia." Bull World Health Organ **75**(suppl 1): 113-8.
- Wenisch, C., B. Parschalk, et al. (1995). "Elevated serum levels of IL-10 and IFN-gamma in patients with acute Plasmodium falciparum malaria." Clin Immunol Immunopathol **74**(1): 115-7.
- WHO (1991). Basic laboratory methods in medical parasitology. Geneva, WHO.
- WHO (1996). WHO report: Fostering Development. Geneva.
- WHO (2000). Management of Severe Malaria - A practical handbook. Geneva, World Health Organisation.
- WHO (2000). "Severe falciparum malaria." Trans R Soc Trop Med Hyg **94**(Suppl 1): S1-90.
- WHO (2003). "The world health report 2003: shaping the future " Geneva, World Health Organization.
- WHO (2005). "WHO 2005: World Malaria Report." WHO, Geneva.
- Wickramasinghe, S. (1987). "The bone marrow in human cerebral malaria: parasite sequestration within sinusoids." Br J Haematol **3**: 295-306.
- Wickramasinghe, S. N. and S. H. Abdalla (2000). "Blood and bone marrow changes in malaria." Baillieres Best Pract Res Clin Haematol **13**(2): 277-99.
- Wildling, E., S. Winkler, et al. (1995). "Malaria epidemiology in the province of Moyen Ogoov, Gabon." Trop Med Parasitol **46**(2): 77-82.
- Wintrobe, M., J. Greer, et al. (2004). Wintrobe's Clinical Hematology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei allen bedanken, die diese Arbeit ermöglicht und gefördert haben:

Herrn Dr. med. Christian Brandts danke ich für seine Begeisterung für dieses Projekt auch in manchmal schwierigen Situationen. Diese Begeisterung war oft genug Motivation für arbeitsreiche Tage und Nächte in Afrika. Weiterhin danke ich Herrn Dr. med. Brandts für seine intensive und kompetente fachliche sowie die persönliche Betreuung.

Frau Dr. med. Annika Rudat danke ich für die tagtäglich erfreuliche Zusammenarbeit nicht nur in Afrika. Ich danke insbesondere der Freundin Annika Rudat für eine wahrhaft unvergeßliche gemeinsame Zeit, für Verständnis und Rat, für Kritik und Lob besonders beim Lesen der Arbeit.

Herrn Univ.-Prof. Dr. W. E. Berdel danke ich für die unkomplizierte Übernahme der Funktion des 1. Gutachters und auch für die bisher immer ausgesprochen gute und lehrreiche Zeit in der Med. Klinik A. Frau PD Dr. C. Rössig danke ich für das 2. Gutachten.

Herrn Prof. Dr. Peter Kremsner und Herrn Dr. Saadou Issifou danke ich für die fachliche Betreuung und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in Lambaréné. Herrn Dr. med. Benjamin Mordmüller danke ich für die Organisation, die Motivation und die fruchtbaren Diskussionen. Herrn Rolf Fendel und Frau Andrea Kreidenweiss danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Meinen Eltern Reinhold Johannes und Maria Elisabeth Appelman danke ich dafür, dass sie mich vieles wagen ließen und mich dabei immer unterstützt haben. Meinen verstorbenen Vater trage ich immer in meinem Herzen.

Florian Holtbernd danke ich für die vielen, vielen verliebten Jahre und das Loslassen für Lambaréné.

Diese Arbeit wurde finanziell unterstützt durch ein Promotionsstipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes.

Lebenlauf

Name:	Iris Appelman
Geboren:	17.12.1979 in Münster
1986-1990:	Grundschule Kinderhaus West
1990-1999:	Geschwister-Scholl-Gymnasium Münster
davon:	
1996:	South Albany High School, Oregon, USA, Stipendium des Parlamentarischen Patenschaftsprogrammes des Deutschen Bundestages
1999:	Mar-Elias-College, Ibillin, Galiläa, Israel
04/2000:	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
2004:	Albert-Schweitzer-Krankenhaus, Laboratoire de Recherches, Promotionsstipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes
2005/2006:	Studium an der Université de Lausanne, Schweiz
11/2006:	Ärztliche Prüfung an der Westfälischen Wilhelms- Universität Münster
seit 2007:	Assistenzärztin, Medizinische Klinik A, Universitätsklinikum Münster