

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

DISSERTATION

Die *Immature Platelet Fraction* bei neonataler Thrombozytopenie

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Judith Paetzold

aus Dresden

Datum der Promotion: 05.06.2016

Salus aegroti suprema lex

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Zusammenfassung	7
2 Einleitung	11
2.1 Megakaryopoiese und Thrombozytopoiese	11
2.2 Neonatale Thrombozytopenien.....	13
2.3 Retikulierte Thrombozyten und die <i>Immature Platelet Fraction</i>	23
2.4 Thrombozytentransfusion bei Früh- und Neugeborenen.....	27
2.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	30
3 Material und Methoden	32
3.1 Patientenkollektiv und Blutproben	32
3.2 Das hämatologische Analysegerät Sysmex XE-2100	35
3.3 Messung der Thrombozytenzahl	36
3.4 Messung der retikulierten Thrombozyten.....	39
3.5 Statistische Analysen	41
4 Ergebnisse	44
4.1 Patientenkollektiv und Auswertung der Blutbildanalysen	44
4.2 Häufigkeit und Charakteristiken der Thrombozytopenien bei Früh- und Neugeborenen auf der neonatologischen Intensivstation	45
4.3 Epidemiologische Analysen	47
4.4 Thrombozytenwerte und die <i>Immature Platelet Fraction</i> im Verlauf der ersten Lebenswoche bei thombozytopenen und nicht-thrombozytopenen Früh- und Neugeborenen	50
4.5 Die <i>Immature Platelet Fraction</i> zur Prädiktion eines Sturzes der Thrombozytenzahl > 50/nl am Folgetag.....	57
5 Diskussion	59
5.1 Häufigkeit der neonatalen Thrombozytopenie	59

5.2	Die inverse Korrelation zwischen Thrombozytenzahl und der <i>Immature Platelet Fraction</i>	62
5.3	Die Bedeutung der Studienergebnisse für das klinische Management der neonatalen Thrombozytopenie.....	65
6	Literaturverzeichnis	69
7	Eidesstattliche Versicherung	81
8	Curriculum Vitae	83
9	Veröffentlichungen aus dieser Arbeit	85
10	Danksagung	87

Abkürzungsverzeichnis

BFU-Meg	megakaryozytäre <i>Burst Forming Unit</i>
CAMT	kongenitale amegakaryozytäre Thrombozytopenie (<i>congenital amegakaryocytic thrombocytopenia</i>)
CFU-Meg	megakaryozytäre <i>Colony Forming Unit</i>
c-MPL	humaner Rezeptor für Thrombopoietin (<i>cloned myeloproliferative leukemia virus oncogene</i>)
CMV	Cytomegalievirus
DIC	disseminierte intravasale Koagulopathie (<i>disseminated intravascular coagulation</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELBW	<i>Extremely Low Birth Weight</i> (Geburtsgewicht < 1000 g)
GM-CSF	<i>Granulocyte/Monocyte Colony Stimulating Factor</i>
HFPF	<i>High-Fluorescent Platelet Fraction</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSV	Herpes Simplex Virus
ICH	Intrakranielle Hämorrhagie
IL	Interleukin
IPF	<i>Immature Platelet Fraction</i>
IPF%	<i>Immature Platelet Fraction</i> bezogen auf die Thrombozytenzahl
ITP	Immunthrombozytopenie
IVH	Intraventrikuläre Hämorrhagie
LBW	<i>Low Birth Weight</i> (Geburtsgewicht < 2500 g)
MPV	Mittleres Thrombozytenvolumen (<i>mean platelet volume</i>)
NAIT	Neonatale Alloimmunthrombozytopenie
NEC	Nekrotisierende Enterokolitis (<i>necrotizing enterocolitis</i>)

p.c.	<i>post conceptionem</i>
PL	unterer Diskriminator
p.m.	<i>post menstruationem</i>
PRP	<i>Platelet Rich Plasma</i>
PU	oberer Diskriminator
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RP	Retikulierte Thrombozyten
RR	Relatives Risiko
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SIH	Schwangerschaftsinduzierte Hypertonie
SSW	Schwangerschaftswoche post menstruationem
TAR	<i>Thrombocytopenia Absent-Radius Syndrome</i>
TO	Thiazol-Orange
THPO	humanes Thrombopoietin
TRALI	Transfusions-assoziierte akute Lungeninsuffizienz
VLBW	<i>Very Low Birth Weight</i> (Geburtsgewicht < 1500 g)

1 Zusammenfassung

Eine Thrombozytopenie ist beim gesunden Neugeborenen selten. Die hohe Inzidenz beim kranken Früh- oder Neugeborenen sowie das damit verbundene erhöhte Blutungsrisiko und mögliche Spätfolgen unterstreichen jedoch die Notwendigkeit, auf diesem Gebiet neue Möglichkeiten für das Management zu schaffen. Ziel dieser Arbeit war es, die unreife Thrombozytenfraktion, *Immature Platelet Fraction* (IPF), als nicht-invasiv messbaren, diagnostischen Parameter der Aktivität der Megakaryopoese bei Früh- und Neugeborenen zu untersuchen und Normwerte zu etablieren. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine erhöhte IPF einem Thrombozytenanstieg vorausgeht und eine Aussage zum Thrombozytopenieverlauf am Folgetag machen kann.

In die Untersuchung wurden 612 Neugeborene der Intensiv- und Intensivüberwachungsstationen eingeschlossen (49 % Frühgeborene; 6 % ELBW-Frühgeborene (Geburtsgewicht < 1000 g); 10,5 % VLBW-Frühgeborene (Geburtsgewicht < 1500 g)). Um Analysen und Berechnungen anhand der 1339 Thrombozytenwerte und 1045 IPF%-Werte durchführen zu können, erfolgte die Einteilung in eine Thrombozytopenie-Gruppe (n = 156, innerhalb der ersten Lebenswoche mindestens einmalig eine Thrombozytenzahl < 150/nl) und eine Kontrollgruppe (n = 456, Thrombozyten im Normbereich von 150-450/nl).

Die Ribonukleinsäure (RNA) in den Zellen der unreifen Thrombozyten lässt sich anfärben, so dass die markierten Zellen durchflusszytometrisch quantifiziert werden können. Das Analysegerät XE-2100 (Sysmex) kann aufgrund unterschiedlicher Fluoreszenzintensität zwischen reifen und unreifen Zellfraktionen unterscheiden und gewährleistet durch eine standardisierte automatische Messmethode reproduzierbare Ergebnisse.

26 % der Früh- und Neugeborenen des Patientenkollektivs zeigten in der ersten Lebenswoche eine Thrombozytopenie, 17 % am Tag der Geburt. Von einer *early-onset* Thrombozytopenie (erstmaliges Auftreten bis 72 Stunden postpartal) waren 21 % betroffen.

Das Geburtsgewicht bzw. Gestationsalter der thrombozytopenen Früh- und Neugeborenen war signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (Median 2158 g *versus* 2805 g bzw. 37+1 SSW *versus* 35+1 SSW, jeweils $p < 0,001$).

Diese Arbeit zeigt erstmals, dass die ermittelten IPF-Normwerte bei nicht-thrombozytopenen Früh- und Neugeborenen (4,1 % (95%-Konfidenzintervall 0,7-7,9 %)) in der ersten Lebenswoche höher sind als für Erwachsene beschrieben. Die IPF%-Mittelwerte der thrombozytopenen Gruppe waren im Verlauf der ersten Lebenswoche stets signifikant höher als

Zusammenfassung

die der Referenzgruppe. Mit zunehmender Schwere der Thrombozytopenie ergab sich ein signifikanter IPF%-Anstieg. Hinsichtlich der prädiktiven Funktion der IPF konnte gezeigt werden, dass bei einer IPF $\geq 8\%$ ein Thrombozytensturz $> 50/\text{nl}$ am Folgetag äußerst unwahrscheinlich ist. Bei IPF%-Werten $< 8\%$ ergibt sich ein 4,7-fach erhöhtes relatives Risiko für einen Thrombozytensturz. Anhand der IPF kann durch die schnelle Einschätzung des zu erwartenden Verlaufs das Management der neonatalen Thrombozytopenie sowie die Indikationsstellung zur Gabe von Thrombozytenkonzentraten verbessert werden. Dies ist mittels randomisierter Studien auch prospektiv zu belegen.

Abstract

Thrombocytopenia is rare in healthy neonates. However, the high incidence of thrombocytopenia in sick preterm/term neonates and the related higher bleeding risk and putative long-term consequences emphasize the necessity for new management tools. The study aim was to examine the *Immature Platelet Fraction* (IPF) as a non-invasive measurable, diagnostic parameter for the megakaryopoietic activity in neonates and to establish reference values. We hypothesized, that a higher IPF precedes a rise in platelet counts and the course of thrombocytopenia can be evaluated.

This study included 612 neonates admitted to the intensive care units (49 % preterm newborns; 6 % ELBW-, 10.5 % VLBW preterm newborns). For analysis/calculations with the included 1339 specimens and 1045 IPF% values, neonates were divided into a thrombocytopenia group (n = 156, at least once a platelet count < 150/nl during the first week of life) and control group (n = 456, platelet counts within the reference range of 150-450/nl).

The ribonucleic acid (RNA) in the cells of immature blood platelets can be stained and quantified by flow cytometry. The analyzer XE-2100 (Sysmex) can distinguish between mature and immature cell fractions through different fluorescence intensity and provides reproducible results through its standardized and automatic measuring.

26 % of the preterm/term neonates in this study exhibited a thrombocytopenia within their first week of life, 17 % at the day of birth. 21 % showed an *early-onset* thrombocytopenia (occurrence within the first 72 hours after birth).

Birth weight and gestational age of thrombocytopenic preterm/term neonates was significantly lower compared to the control group (median 2158 g *versus* 2805 g; 37+1 weeks of gestation *versus* 35+1 weeks of gestation, both $p < 0.001$).

This study shows for the first time that the established IPF reference range for non-thrombocytopenic preterm/term neonates (4.1 % (95%-confidence interval 0.7-7.9 %)) in the first week of life is significantly higher than for adults. An increasing severity of thrombocytopenia resulted in a significant rise of IPF%-values. Analyzing the predictive function, we could show that $IPF \geq 8 \%$ resulted very unlikely in a severe drop of platelets > 50/nl on the following day. IPF%-values < 8 % showed a 4.7-times higher relative risk for a severe drop. Through its quick and reliable evaluation during the course of thrombocytopenia, IPF can improve the management of neonatal thrombocytopenia and help deciding about the requirement of platelet transfusion. This issue should also be addressed in prospective studies.

Zusammenfassung

2 Einleitung

2.1 Megakaryopoiese und Thrombozytopoiese

Für das Verständnis der in dieser Arbeit untersuchten Fraktion der retikulierten Thrombozyten (*Immature Platelet Fraction*, IPF) soll vorab in die Thematik der Megakaryo- und Thrombozytopoiese und ihre Besonderheiten beim Früh- und Neugeborenen eingeführt werden. Die pluripotente hämatopoietische Stammzelle bildet den Ursprung der Megakaryopoiese. Sie ist zur Teilung und damit zur Generierung weiterer Stammzellen fähig (Selbsterneuerung). Aus ihr gehen die verschiedenen hämatopoietischen Zellreihen hervor. Die weitere Differenzierung und Proliferation der Stammzelle wird unter anderem durch Zytokine und hämatopoietische Wachstumsfaktoren beeinflusst, die an spezifischen Oberflächenrezeptoren binden.¹ In der Megakaryopoiese, die zur Freisetzung der Thrombozyten führt, gehören dazu der Stammzellfaktor (SCF) sowie die Interleukine- (IL-) 3, -6, -11, der *granulocyte/monocyte Colony Stimulating Factor* (GM-CSF) und das Thrombopoietin (THPO). Der Einfluss dieser hämatopoietischen Faktoren führt zur Entwicklung myeloischer Progenitorzellen. Aus diesen entstehen im Verlauf megakaryozytäre *Burst Forming Unit* (BFU-Meg) und *Colony Forming Unit* (CFU-Meg) Vorläuferzellen. Aus dieser Zellpopulation geht wiederum der Promegakaryoblast als erste morphologisch identifizierbare blastäre Vorläuferzelle der Megakaryopoiese hervor. In dieser Phase nimmt der Einfluss der Zytokine SCF, GM-CSF und IL-3 ab. Im Gegenzug gewinnt THPO zunehmend an Bedeutung. Es bindet an seinen spezifischen Rezeptor c-MPL und ist letztlich der potenteste Stimulator für die Proliferation und Reifung der linienspezifischen Vorläuferzellen und der Megakaryozyten.^{2, 3} An die Promegakaryoblasten schließt sich die Entstehung des Megakaryoblasten an. Dieser entwickelt sich weiter zum Promegakaryozyten, welcher die unmittelbare Vorläuferzelle des reifen Megakaryozyten ist. Die Megakaryozytenreifung ist ein Prozess, der durch einen starken Anstieg der Ploidie (= Anzahl der Chromosomensätze) gekennzeichnet ist, verursacht durch mehrfache Verdopplung des Chromosomensatzes ohne anschließende Zellteilung, so dass große Zellen mit einem vielfach erhöhten Chromosomensatz (8N-64N) entstehen.^{1,3}

Im Verlauf der Differenzierung der Megakaryozyten entsteht ein komplexes internes Membransystem, das miteinander verbundene Zisternen und Kanäle herausbildet. Es dient als Membranvorrat für die nachfolgende rasche Ausstülpung der pseudopodienartigen Fortsätze der Megakaryozyten, die Prothrombozyten genannt werden. Durch apoptotische Prozesse wird die

Einleitung

Entwicklung von Prothrombozyten aus Megakaryozyten eingeleitet.⁴ Diese Prozesse müssen im Differenzierungsablauf teilweise auch gehemmt werden, damit die Bildung von Prothrombozyten und die Freisetzung von reifen Thrombozyten ermöglicht werden kann.⁵ Das Zytoskelett von Megakaryozyten, welches aus Mikrotubuli, Aktin und Spektrin besteht, gilt als Motor für die Thrombozytenproduktion.^{6, 7} Die Bildung von Prothrombozyten ist von der Funktion der Mikrotubuli abhängig,⁸ welche der Verlängerung der Prothrombozyten dienen.⁶ Da sie sich zum Großteil an der Spitze der Prothrombozyten befinden, erfolgt von dort die Ausbildung der reifen Thrombozyten.⁸ Die Rho GTPase „RhoA“ ist für die regelrechte Entwicklung der Megakaryozyten und die Bildung der Prothrombozyten notwendig.⁹ Andere Rho GTPasen (RACGAP1 und CDC42) haben für die Stabilisierung der Mikrotubuli eine wichtige regulierende Funktion.¹⁰ Ausgehend von den Ausläufern der reifen Megakaryozyten kommt es zur Abschnürung und somit zur Entstehung der Thrombozyten. Der Vorgang beginnt, wenn eine Stelle des Zytoplasmas der Megakaryozyten erodiert. Zu diesem Zeitpunkt besteht der Großteil des Zytoplasmas des Megakaryozyten aus zahlreichen Prothrombozyten, die ihre Größe und endgültige Form herausbilden. Schließlich kommt es zur Freisetzung der Prothrombozyten aus dem Zytoplasma und der verbleibende Zellkörper des Megakaryozyten zwischen den Prothrombozyten löst sich auf.⁸ Nach Etablierung der medullären Megakaryopoese sind die dünnen Zytoplasmafortsätze in der subendothelialen Schicht der Knochenmarksinus gelegen, wodurch die direkte Abgabe der Thrombozyten vom Knochenmark in die Blutzirkulation ermöglicht wird. Die abgetrennten Zytoplasmaareale und Membrananteile enthalten alle für die Funktion der Thrombozyten nötigen Zellorganellen.¹¹

Während der Embryonalperiode, ab einem Gestationsalter von fünf Wochen *post conceptionem* (p.c.), lässt sich die Megakaryopoese erstmals im Dottersack nachweisen. Die Leber ist ab dem zweiten Monat Hauptbildungsort der Megakaryozyten und ab dem fünften Monat beginnt die Megakaryopoese im Knochenmark.¹² Die hepatische Phase ist bis zur Geburt weitgehend abgeschlossen.¹

Neonatale und adulte Megakaryozyten unterscheiden sich deutlich voneinander: Neonatale Megakaryozyten haben eine geringere Ploidie als adulte Zellen.¹³ Zudem sind sie signifikant kleiner als bei Erwachsenen, wodurch vermutlich weniger neue Thrombozyten aus einem Megakaryozyten entstehen.¹⁴ Unter physiologischen Umständen können die Vorläuferzellen neonataler Megakaryozyten diesen Nachteil durch ein erhöhtes Proliferationspotential

Einleitung

kompensieren, weshalb die normale Thrombozytenzahl ab Geburt wie beim Erwachsenen bei 150-450/nl liegt.¹⁵ Trotz der geringen Ploidie handelt es sich bei den kleinen Megakaryozyten um ausgereifte Zellen. Die schnelle Reifung ist mit einer hohen Expression des für die Megakaryopoese essentiellen Transkriptionsfaktors GATA-1 und einer Hochregulierung von THPO-Signalwegen durch das Enzym mTOR assoziiert. Neonatale Megakaryozytenvorläuferzellen reagieren sensitiver auf THPO als adulte.¹⁶ Niedrigste Konzentrationen (1 ng/ml) sind für die Proliferation neonataler Megakaryozyten ausreichend. Bei adulten Megakaryozyten können diese Konzentrationen *in vitro* kein Überleben der Zellen ermöglichen. THPO führte bei adulten Megakaryozyten *in vitro* zur Erhöhung der Ploidie, bei neonatalen Megakaryozyten konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden. Es wird vielmehr eine Hemmung dieses Prozesses vermutet.¹⁷

Im Mausmodell wurde die Thrombozytopoese im Rahmen der neonatalen Entwicklung untersucht. Der Übergang von fetaler zu adulter Megakaryopoese war innerhalb der ersten zwei Lebenswochen abgeschlossen. In dieser Phase nimmt die Größe der Megakaryozyten in allen drei hämatopoietischen Organen (Leber, Milz, Knochenmark) stetig zu. Auch das Blutvolumen nahm in diesem Zeitraum im Mausmodell um das 5,5-fache zu. Die Thrombozytenzahlen waren in der ersten Lebenswoche gleichbleibend und verdoppelten sich nahezu am Ende der zweiten Lebenswoche. Hinsichtlich der Thrombozytenproduktionsrate wurden keine Unterschiede festgestellt. Es konnte aber nachgewiesen werden, dass neonatale Thrombozyten vorübergehend eine signifikant längere Überlebensdauer (um 25 %) in der Blutzirkulation als adulte Thrombozyten haben. Bei Mäusen erklärt dies die höheren Thrombozytenzahlen am Ende der zweiten Lebenswoche. Das verlängerte Überleben wird durch anti- und pro-apoptische Proteine der Bcl-2-Familie reguliert.¹⁸ Bisherige Studien betonten vor allem die Besonderheit des erhöhten Proliferationspotentials neonataler Megakaryozyten. Nach zuletzt genannter Studie sollte auch die potenziell verlängerte Überlebensdauer neonataler Thrombozyten, die zumindest bei Mäusen nachgewiesen werden konnte, für weitere Betrachtungen berücksichtigt werden.

2.2 Neonatale Thrombozytopenien

Bei Früh- und Neugeborenen, wie auch bei größeren Kindern oder bei Erwachsenen, spricht man *per definitionem* von einer Thrombozytopenie ab einer Thrombozytenzahl < 150/nl. Thrombozytenzahlen zwischen 149-101/nl werden als milde Thrombozytopenie, zwischen 100-50/nl als moderate Form und < 50/nl als schwere Thrombozytopenie bewertet.¹⁹⁻²¹ Obwohl

Einleitung

Frühgeborene mit einem Gestationsalter < 26 SSW etwas niedrigere durchschnittliche Thrombozytenwerte als reife Neugeborene aufweisen,²² wird – wie in der überwiegenden Anzahl der Literatur²³⁻²⁶ – in der vorliegenden Arbeit die Definition der Thrombozytopenie mit $< 150/\text{nl}$ beibehalten.

Die Etablierung von hämatologischen Referenzwerten ist bei Früh- und Neugeborenen nur erschwert möglich, da bei unkompliziertem klinischen Status in der Regel kein Blutbild analysiert wird und zusätzliche bzw. klinisch nicht-indizierte Venenpunktionen ethisch nicht begründet werden können. Tabelle I fasst die Datenlage zu Referenzwerten für die Thrombozytenzahl bei Früh- und Neugeborenen zusammen. Dabei wird nach der untersuchten Patientenpopulation (Feten, *preterm* und *term* Neugeborene) und nach der Art der Blutentnahme (Chordozentese, postnatal gewonnenes Nabelschnurblut oder venöse Punktion) unterschieden.

Van den Hof *et al.* konnten anhand von 229 fetalen Blutproben aus der Nabelschnur (Chordozentese) eine mittlere Thrombozytenzahl von $187 \pm 47/\text{nl}$ in der 15. SSW p.c. messen. Im Verlauf der intrauterinen Entwicklung stiegen diese Werte an und erreichten am Entbindungstermin Werte von $274 \pm 47/\text{nl}$.²² Andere Studien bestätigen diese Ergebnisse, wonach im zweiten Trimenon Normwerte zwischen 150-450/nl erreicht werden.²⁷⁻²⁹ Sainio *et al.* untersuchten Thrombozytenzahlen im postnatal entnommenem Nabelschnurblut bei einer großen Patientenpopulation von 4489 *term* geborenen Neugeborenen (Gestationsalter ≥ 37 Wochen). Dabei wurde ein mittlerer Thrombozytenwert von $308 \pm 69/\text{nl}$ ermittelt.²⁴ Wiedmeier *et al.* zogen für ihre Studie Thrombozytenwerte von 47291 sowohl *preterm* als auch *term* Neugeborenen heran (Gestationsalter von 22-42 Wochen). Sie zeigten, dass bei einem höheren Gestationsalter die Thrombozytenzahl bei Geburt auch höher war. *Preterm* Neugeborene, die mit einem Gestationsalter ≤ 32 Wochen geboren wurden, hatten auf der 5. Perzentile einen Thrombozytenwert von 104/nl. Für die *preterm* bzw. *term* Neugeborenen mit einem Gestationsalter ≥ 32 Wochen lag dieser Wert bei 123/nl.³⁰

Die Untersuchung von Wiedmeier *et al.* zeigt, dass die normale Thrombozytenzahl bei extrem unreifen Frühgeborenen (≤ 32 SSW) niedriger sein kann. Im Gegensatz zu den fetalen Blutproben kann jedoch bei sehr unreifen Frühgeborenen insbesondere durch beginnende proinflammatorische Prozesse eine weitere Variable vorliegen, welche die Thrombozytenzahl verändert.

Einleitung

Tabelle I. Übersicht publizierter Referenzwerte für fetale und neonatale Thrombozytenzahlen

Untersuchungszeitpunkt	Thrombozytenwert (Mittelwert \pm SD)	Thrombozytenwert (5. und 95. Perzentile)	Patientenpopulation; Fallzahl	Art der Blutentnahme	Autoren, Jahr
Fetal	187 \pm 47/nl 274 \pm 47/nl		229 Feten der 15. bis 40. SSW	Chordozentese (im Rahmen pränataler Diagnostik)	Van den Hof <i>et al.</i> , 1990
Neonatal	308 \pm 69/nl		4489 <i>term</i> Neugeborene	postnatale Punktion der Nabelschnur	Sainio <i>et al.</i> , 2000
		5. Perzentile 104/nl (Gestationsalter \leq 32 Wochen) 5. Perzentile 123/nl (Gestationsalter $>$ 32 Wochen) 95. Perzentile 650/nl (postnatale Periode <i>preterm</i> Neugeborener) 95. Perzentile 750/nl (innerhalb der ersten 90 Lebenstage <i>term</i> Neugeborener)	47291 <i>term</i> und <i>preterm</i> Neugeborene	Venöse Punktion	Wiedmeier <i>et al.</i> , 2008

Ähnlich wie die Literaturangaben zu Thrombozyten-Normwerten variieren auch die Angaben zur Inzidenz der neonatalen Thrombozytopenie in Abhängigkeit von der untersuchten Patientenpopulation (Tabelle II). Dreyfus *et al.* untersuchten eine nicht-selektierte

Einleitung

Patientenpopulation von 5632 Früh- und Neugeborenen in einer prospektiv angelegten Multicenterstudie. Sie fanden eine Inzidenz der Thrombozytopenie (Thrombozytenzahl < 150/nl) von 0,9 % für Neugeborene am ersten Lebenstag.²³ Sainio *et al.* errechneten für reife Neugeborene (n = 4489) eine Inzidenz von 2 % (95%-Konfidenzintervall 1,5-2,3 %) am Tag der Geburt. Von einer schweren Thrombozytopenie mit Thrombozytenwerten < 50/nl sind bei Geburt nur 0,24 % aller Neugeborenen betroffen.²⁴ Die Inzidenz der Thrombozytopenie bei Neugeborenen, die auf einer Intensivstation aufgenommen wurden, ist jedoch mit 22-35 % wesentlich höher.^{31, 32} Dabei hatten 20 % der thrombozytopenischen Neugeborenen (n = 807) auf einer Intensivstation Thrombozytenwerte < 50/nl.³²

Christensen *et al.* untersuchten 284 Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht < 1000 g (ELBW) und fanden bei 73 % der ELBW eine Thrombozytopenie, 23 % zeigten eine milde Form, 38 % wiesen Thrombozytenzahlen \leq 50/nl auf.²¹ Somit tritt eine Thrombozytopenie bei ELBW Frühgeborenen doppelt so häufig auf wie bei reifen Neugeborenen, die auf einer neonatologischen Intensivstation aufgenommen werden.

Tabelle II. Studien zur Inzidenz der neonatalen Thrombozytopenie

	Inzidenz	n, untersuchte Patientenpopulation	Autoren	Jahr
Untersuchungen bei Neugeborenen	0,9 %	5632 <i>term</i> und <i>preterm</i> Neugeborene	Dreyfus <i>et al.</i>	1997
	2 %	4489 <i>term</i> Neugeborene	Sainio <i>et al.</i>	2000
Untersuchungen bei Neugeborenen, die auf der neonatalen Intensivstation aufgenommen wurden	35 %	367 <i>term</i> und <i>preterm</i> Neugeborene	Mehta <i>et al.</i>	1980
	22 %	807 <i>term</i> und <i>preterm</i> Neugeborene	Castle <i>et al.</i>	1986
	73 %	284 ELBW <i>preterm</i> Neugeborene	Christensen <i>et al.</i>	2006

Einleitung

Die hohe Inzidenz der Thrombozytopenie bei Früh- und Neugeborenen, die auf einer neonatologischen Intensivstation behandelt werden, unterstreicht die Wichtigkeit, neue Methoden im klinischen Alltag zu etablieren, um eine verbesserte Diagnostik und ein effektives Management der Thrombozytopenie zu erreichen.

Für eine Thrombozytopenie bei Früh- und Neugeborenen gibt es ein breites Ursachenspektrum. Prinzipiell kann man folgende Konstellationen unterscheiden:

- 1) eine Thrombozytopenie aufgrund einer erniedrigten Megakaryopoese in Knochenmark bzw. Leber
- 2) eine Thrombozytopenie aufgrund eines erhöhten Thrombozytenverbrauchs
- 3) eine Kombination dieser Ursachen.

Grundlegend sollte geklärt werden, ob primär eine maternale/plazentare oder fetale/neonatale Ursache zugrunde liegt.³³

Eine Einteilung nach dem Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens der Thrombozytopenie gibt oftmals wichtige Hinweise zur Pathophysiologie der Thrombozytopenie und ermöglicht die Einleitung einer effizienteren Strategie für das Management und eine eventuelle Transfusionsbehandlung. Bei Früh- und Neugeborenen unterscheidet man zwischen einer *early-onset* Thrombozytopenie (erstmaliges Auftreten ≤ 72 Stunden postnatal) und einer *late-onset* Thrombozytopenie (erstmaliges Auftreten > 72 Stunden postnatal).

Bei der *early-onset* Form (Tabelle III) sind vor allem maternale Gründe, wie Präeklampsie/Eklampsie, Plazentainsuffizienz, HELLP-Syndrom, schwangerschaftsinduzierte Hypertonie (SIH) oder ein maternaler Diabetes mellitus ursächlich. In diesen Fällen besteht die Thrombozytopenie meist schon pränatal und betrifft dann insbesondere *preterm* geborene Neugeborene.³² Sie ist typischerweise nur mild bis moderat ausgeprägt, innerhalb weniger Tage selbst-limitierend und bedarf meist keiner weiteren Diagnostik und Behandlung. Dies setzt voraus, dass die Thrombozytopenie früh erkannt wird, milde ausgeprägt ist, sich das Neugeborene als sonst klinisch unauffällig präsentiert und erhöhte Entzündungsparameter ausgeschlossen wurden,^{34, 35} so dass kein erhöhtes Risiko für einen Sturz der Thrombozytenzahl anzunehmen ist. Man geht davon aus, dass der Thrombozytopenie, die mit oben genannten Schwangerschaftskomplikationen assoziiert ist, vor allem eine erniedrigte Thrombozytenproduktion zugrunde liegt. Die genauen pathophysiologischen Mechanismen sind diesbezüglich allerdings nicht vollständig geklärt.³⁶

Einleitung

Fallen die Thrombozyten innerhalb der ersten drei Tage jedoch unter einen Wert von 50/nl, so muss unmittelbar eine weitere Abklärung der Ursache erfolgen. Zeigt sich das Früh- bzw. Neugeborene in einem reduzierten Allgemeinzustand, muss rasch eine bakterielle Infektion bzw. eine Sepsis ausgeschlossen werden. Hier kommt es zu einem erhöhten Thrombozytenverbrauch. Auch eine perinatale Asphyxie, die mit einer disseminierten intravasalen Koagulopathie (DIC) assoziiert sein kann, kommt als Ursache einer schwer verlaufenden *early-onset* Thrombozytopenie in Betracht. Weiterhin müssen differentialdiagnostisch konnatale Infektionen bedacht werden. Hierbei spielen unter anderem die Erreger der TORCH-Gruppe (Toxoplasma gondii, Röteln-, Cytomegalie (CMV)-, Herpes (HSV)-Virus) eine Rolle,²⁰ wovon die CMV- und Toxoplasmose-Infektionen hervorzuheben sind. Ein Drittel der mit CMV infizierten thrombozytopenischen Neugeborenen haben eine Thrombozytenzahl < 50/nl, bei Toxoplasmose waren es ein Fünftel.³⁷ Auch das Humane Immundefizienz Virus (HIV) kann Ursache einer schweren Thrombozytopenie des Neugeborenen sein.²⁰

Die neonatale Alloimmunthrombozytopenie (NAIT, Inzidenz 1:1500) ist die wichtigste Differentialdiagnose der schweren Thrombozytopenie bei reifen Neugeborenen, die sich ansonsten als klinisch gesund präsentieren.³⁸ Ursächlich ist die Bildung und diaplazentare Passage maternaler Allo-Antikörper. Sie richten sich gegen paternal vererbte Antigene auf den Thrombozyten des Fetus.^{39, 40} Am häufigsten richten sich die Antikörper gegen die humanen Plättchenantigene (HPA) 1a und 5b.⁴¹ In der Neonatalperiode fallen 80 % der Neugeborenen mit einer NAIT durch petechiale Hautblutungen auf.⁴² Weitere klinische Zeichen sind Schleimhautblutungen, konjunktivale Blutungen, extra- und intrazerebrale Hämorrhagien sowie Blutungen im Gastrointestinal- oder Urogenitaltrakt.

Auch eine maternale Autoimmunthrombozytopenie (Inzidenz 1:5000) ist eine wichtige Differentialdiagnose. Bei dieser kommt es zu einer diaplazentaren Übertragung von mütterlichen Auto-Antikörpern, wobei die Mutter selbst an einer immunologisch bedingten Thrombozytopenie leidet. Die Analyse der maternalen Thrombozytenwerte ist demzufolge für die Diagnosestellung der neonatalen Thrombozytopenie besonders wichtig.⁴³ Die Thrombozytenzahlen des Neugeborenen sind zum Teil zunächst noch im unteren Normbereich, fallen aber typischerweise innerhalb des zweiten bis fünften Lebensstages auf ihren Tiefpunkt. Bei nur 14,3 % der Neugeborenen sinken die Werte auf < 50/nl, und üblicherweise erfolgt eine Normalisierung der Thrombozytenzahlen bis zur vierten Lebenswoche.^{44, 45} Bei etwa 14 % der Neugeborenen mit einer NAIT kommt es zu einer intrakraniellen Hämorrhagie (ICH), bei Neugeborenen mit maternaler Autoimmunthrombozytopenie beträgt die Inzidenz der

Einleitung

Hirnblutung jedoch $< 1\%$.⁴² Generell nimmt die NAIT einen schwerwiegenderen Verlauf als die neonatale Autoimmunthrombozytopenie.

Falls obige Diagnosen der *early-onset* Thrombozytopenie ausgeschlossen werden konnten, rücken die seltenen angeborenen/erblichen Ursachen in den Vordergrund. Veränderungen in Genen, die die Bildung, Struktur und Funktion von Thrombozyten regulieren, können zu schweren Funktionsstörungen von Thrombozyten und zur Thrombozytopenie führen. Hierbei können Thrombozytopenien, die mit einer normalen Thrombozytengröße einhergehen sowie Mikro- und Makrothrombozytopenien unterschieden werden.

Die kongenitale amegakaryozytäre Thrombozytopenie (CAMT), das Syndrom der Thrombozytopenie mit Radiusaplasie (TAR-Syndrom) sowie Chromosomenanomalien wie Trisomie 13, 18 und 21 zeichnen sich durch eine Thrombozytopenie mit einer normalen Thrombozytengröße aus. Die CAMT ist gut molekularbiologisch charakterisiert und je nach exakter molekularer Ursache durch einen wahrscheinlicheren Übergang in eine Panzytopenie gekennzeichnet. Der Grund hierfür ist eine gestörte Funktion des humanen Thrombopoietin-Rezeptors c-MPL aufgrund von Mutationen im *MPL*-Gen.^{46, 47}

Ferner gibt es die Mikrothrombozytopenien, unter welche das Wiskott-Aldrich-Syndrom einzuordnen ist. Hierbei lassen sich funktionelle und morphologische Veränderungen bei den Thrombozyten nachweisen. Bei der Erkrankung handelt es sich um ein X-chromosomal rezessiv vererbtes Krankheitsbild, welches mit Immundefekten, Thrombozytopenie, Ekzemen und einer Neigung zu Autoimmunerkrankungen und Lymphombildung einhergehen kann. Die Manifestation einer isolierten Thrombozytopenie ist vor allem in frühen Krankheitsstadien möglich. Im Rahmen der Erkrankung kann es zu schweren intestinalen und intrakraniellen Blutungen kommen.⁴⁷

Das Bernard-Soulier Syndrom gehört zu den Makrothrombozytopenien mit autosomal-rezessivem Erbgang und präsentiert sich mit deutlich erhöhter Blutungszeit aufgrund einer abnormen Thrombozytenfunktion in Kombination mit der Thrombozytopenie. Hintergrund ist ein Mangel oder eine Dysfunktion des Glykoprotein-Ib-V-IX-Komplexes, der bei der primären Hämostase eine entscheidende Rolle spielt. Die Thrombozytopenie ist typischerweise moderat ausgeprägt und die heterozygote Form in der Regel klinisch unauffällig.⁴⁷

Die *MYH9*-assoziierten Erkrankungen gehören ebenfalls zu den Makrothrombozytopenien. Dazu zählen die May-Hegglin Anomalie, das Fechtner-, Sebastian-, sowie das Epstein-Syndrom. Bei diesen Erkrankungen liegt eine Mutation im *MYH9*-Gen für die schwere Kette des Nicht-Muskel-Myosin IIA (NMMHC-IIA) vor. Mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen lässt sich

Einleitung

eine abnormale Verteilung des NMMHC-IIA in neutrophilen Granulozyten nachweisen. Diese autosomal-dominant vererbten Makrothrombozytopenien gehen mit verschiedenen Symptomkombinationen (Hörverlust, Nierenversagen, Glaukom) einher, die unterschiedlich schwer ausgeprägt sein können und sich zum Teil erst im Erwachsenenalter manifestieren.⁴⁷

Die Seltenheit erblich bedingter Thrombozytopenien und die große Vielfalt genetischer Ursachen und klinischer Erscheinungsbilder erschweren bzw. verzögern oft deren Diagnose. Oftmals gehen aber komplexe syndromale Erkrankungen mit einer Thrombozytopenie einher. Eine umfassende Anamnese, die mikroskopische Beurteilung von Blutaussstrichen und Bestimmung des mittleren Thrombozytenvolumens (MPV) machen eine erste Eingrenzung möglich. Erst nach Ausschöpfung dieser Maßnahmen wird eine Knochenmarkuntersuchung erwogen bzw. empfohlen.^{20, 47}

Einleitung

Tabelle III. Übersicht zur *early-onset* Thrombozytopenie (modifiziert nach Dame *et al.*)⁴⁵

Ausmaß	milde bis moderate Thrombozytopenie, selten schwer	
Verlauf	langsam, oft selbst-limitierend	
Pathophysiologie	v. a. gestörte/erniedrigte Thrombozytenproduktion	
Therapie	selten notwendig	
Ursachen	häufig	<p>maternal</p> <ul style="list-style-type: none"> • Präeklampsie/Eklampsie, Plazentainsuffizienz, HELLP-Syndrom, SIH, maternaler Gestationsdiabetes <p>bei schwerem Verlauf</p> <ul style="list-style-type: none"> • perinatal bakterielle Infektionen, Sepsis • Asphyxie, evtl. assoziiert mit DIC • konnatale, v. a. virale Infektionen • Immunthrombozytopenie
	selten	<p>angeboren/erblich (Auswahl)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Trisomie 13, 18, 21 • TAR-Syndrom • CAMT • Wiskott-Aldrich-Syndrom • Bernard-Soulier-Syndrom • <i>MYH9</i>-assoziierte Erkrankungen

Die *late-onset* Thrombozytopenie (Tabelle IV) entwickelt sich, vor allem beim *preterm* Neugeborenen, rasch und schreitet rapide fort. Ursächlich sind zumeist eine bakterielle Infektion, eine Pilzsepsis oder eine nekrotisierende Enterokolitis (NEC).²⁰ Infektionsbedingte Thrombozytopenien treten zu jedem Zeitpunkt der Neonatalperiode auf, sind aber die häufigste Ursache von *late-onset* Thrombozytopenien.⁴⁵ Die isolierte Thrombozytopenie geht dem klinischen Bild der Infektion/Sepsis oder NEC mitunter unmittelbar oder bis zu 24 Stunden voraus. Bei der *late-onset* Thrombozytopenie kommt es meist zu einem starken Abfall der Thrombozytenzahl, teils auf Werte < 50/nl. In diesem Fall geht man von einem erhöhten

Einleitung

Thrombozytenverbrauch aus, für den der akute Beginn der Thrombozytopenie typisch ist. Dieser kann zu lebensbedrohlichen Blutungen führen.^{34, 36} Unter Umständen liegt eine gleichzeitige Produktionsstörung vor. Das betrifft vor allem kranke *preterm* Neugeborene, bei denen sich die Megakaryopoese nach starker Stimulation erschöpfen kann oder die THPO-Synthese aufgrund einer eingeschränkten Leberfunktion inadäquat niedrig ist.^{33, 36} Die Produktionsstörung spiegelt sich in der nur langsamen Erholung der Thrombozytenwerte wider. Aufgrund des schweren Verlaufs der *late-onset* Thrombozytopenie werden Transfusionen hier deutlich häufiger als bei den *early-onset* Formen notwendig.^{43, 48}

Kommen eine bakterielle Infektion und NEC nicht als Ursache einer *late-onset* Thrombozytopenie in Betracht, muss differentialdiagnostisch an eine DIC, virale Infektion (v. a. HSV und CMV), Thrombose (v. a. bei zentralen Kathetern), an eine Medikamenten-induzierte Thrombozytopenie oder auch an eine spät diagnostizierte Immuntrombozytopenie (ITP) gedacht werden. Wenn alle anderen Differentialdiagnosen ausgeschlossen wurden, sollten auch bei der *late-onset* Thrombozytopenie die erblich bedingten/syndromalen Erkrankungen differentialdiagnostisch nicht vergessen werden.²⁰

Tabelle IV. Übersicht zur *late-onset* Thrombozytopenie (modifiziert nach Dame *et al.*)⁴⁵

Ausmaß	schwere Thrombozytopenie	
Verlauf	akuter Beginn, rasche Progredienz	
Pathophysiologie	v. a. erhöhter Thrombozytenverbrauch, teilweise mit gleichzeitig verminderter Produktion	
Therapie	häufig Thrombozytentransfusionen notwendig	
Ursachen	häufig	<ul style="list-style-type: none"> • bakterielle oder Pilzinfektion/Sepsis (DIC) • NEC
	selten	<ul style="list-style-type: none"> • konnatale virale Infektionen (v. a. CMV und HSV) • Thrombose (v. a. bei zentralen Kathetern) • Medikamenten-induzierte Thrombozytopenie • spät diagnostizierte ITP • angeborene Erkrankungen oder Syndrome (siehe <i>early-onset</i> Thrombozytopenie)

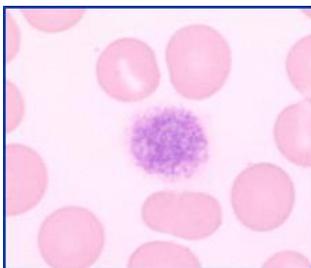
Einleitung

Die genaue Ursache einer neonatalen Thrombozytopenie bleibt oft ungeklärt. Mehrere krankheitsbestimmende Faktoren können zudem gleichzeitig auftreten, so dass der genaue Pathomechanismus der Thrombozytopenie schwierig zu identifizieren ist. Das liegt insbesondere auch daran, dass die Durchführung von Knochenmarkbiopsien zur Identifizierung dieser Mechanismen bei kranken Neonaten zu invasiv und technisch schwierig ist. Deshalb ist ein einfacher, für die Routinediagnostik valider Test sinnvoll, der es erlaubt, zwischen einer ungenügenden Thrombozytenproduktion bzw. einem erhöhten Thrombozytenverbrauch zu unterscheiden.

2.3 Retikulierte Thrombozyten und die *Immature Platelet Fraction*

Im Jahr 1969 wurden von Ingram *et al.* erstmals Thrombozyten mit Ribonukleinsäure (RNA)-Residuen nachgewiesen, nachdem bei Beagle-Hunden nach artifiziell hervorgerufenem akutem Blutverlust große Thrombozyten mit granuliertem Zytoplasma entdeckt wurden. Aufgrund des Nachweises des RNA-Gehalts wurden sie in Analogie zu den Retikulozyten, den Vorläuferzellen der Erythrozyten, retikulierte Thrombozyten (RP) genannt.⁴⁹

Abb. 1. Darstellung eines retikulierten Thrombozyten in der Lichtmikroskopie (100-fache Vergrößerung)



Quelle: PD Dr. Andreas Weimann, Labor Berlin, Charité - Universitätsmedizin Berlin und Vivantes GmbH.

Die neu produzierten, unreifen Thrombozyten werden aus der osteoblastischen Nische des Knochenmarks direkt in die periphere Zirkulation freigesetzt⁴⁹ und sind dort detektierbar. Innerhalb von 24 Stunden nach Freisetzung kommt es zum Abbau der intrazellulären RNA.^{50, 51} Die Anzahl retikulierter Thrombozyten korreliert direkt mit der Zahl der Megakaryozyten im Knochenmark und spiegelt damit die Produktionsrate von Thrombozyten wider.⁵²

Einleitung

Die retikulierten Thrombozyten werden in aktuellen Arbeiten (Tabelle V) zumeist als prozentualer Anteil an der Thrombozytengesamtzahl angegeben (RP% bzw. IPF%). Alternativ ist die Angabe der Absolutwerte pro nl möglich.

Seit der Erstbeschreibung 1969 stellten viele Arbeitsgruppen Untersuchungen zu den retikulierten Thrombozyten an (Tabelle V). Dabei kamen unterschiedliche Geräte und Methoden zur Anwendung, weshalb in der Fachliteratur verschiedene Termini verwendet werden: Retikulierte Thrombozyten (RP), hoch-fluoreszierende Thrombozytenfraktion (HFPF) oder Thiazol-Orange (TO)-positive Thrombozyten. Die Begriffe beziehen sich auf die Anfärbung der RNA in den unreifen Thrombozyten mit Thiazol-Orange und der dadurch zustande kommenden Fluoreszenz, wodurch eine Quantifizierung möglich wird. In der Vergangenheit beeinflussten viele störanfällige Parameter die Analysen. Robinson *et al.* erkannten, dass die Färbung von der Inkubationsdauer und Konzentration des Farbstoffes abhängt, da es zu einer unspezifischen Anfärbung von Granula in Thrombozyten kommen kann. Außerdem wurde gezeigt, dass unreife, größere Thrombozyten einen höheren Granula-Gehalt aufweisen.^{53, 54} Ault *et al.* minimierten in einer Versuchsanordnung den Anteil unspezifischer Anfärbungen, indem sie die Probe mit RNase und TO behandelten und eine andere Probe nur mit TO. Die Ergebnisse wurden dann voneinander subtrahiert, um ein akkurates Ergebnis über den Anteil der retikulierten Thrombozyten zu erhalten.⁵⁵ Thiazol-Orange ist heute aufgrund der Instabilität der RNA-Bindung nicht mehr als Standardfärbung gebräuchlich. Man verwendet gegenwärtig Oxazin-Polymethin-Farbstoff. Hinsichtlich der Untersuchungen der retikulierten Thrombozyten gibt es allerdings noch keinen international einheitlichen Standard für den Typ der zu verwendenden RNA-Färbung, seine Konzentration, die Probenpräparation, Inkubationszeit und Temperatur. Daraus ergeben sich Probleme bei der Interpretation der Ergebnisse der verschiedenen Studien, und es ist schwierig, bisher ermittelte Werte zu vergleichen. Nur bei Bestimmung in vollautomatisierten hämatologischen Analysegeräten, wie dem für diese Arbeit verwendeten Gerät XE-2100 (Sysmex, Kobe, Japan) kann eine Auswertung und Gegenüberstellung der Ergebnisse unterschiedlicher Arbeiten möglich werden. Arbeitsgruppen, die mit dieser standardisierten Methode bereits gearbeitet haben, nutzen den Begriff der *Immature Platelet Fraction* (IPF).

Wie aus Tabelle V ersichtlich wird, liegen physiologische RP%-Werte für Erwachsene zwischen $0,9 \pm 0,1$ % (Mittelwert \pm SD)⁵⁶ und $8,6 \pm 2,8$ % (Mittelwert \pm SD)⁵⁷. Eine Studie zur IPF% ermittelte aus 82 Blutproben von gesunden Erwachsenen Durchschnittswerte von $2 \pm 1,1$ %.⁵² Diese Daten wurden mit dem vollautomatischen hämatologischen Analysegerät XE-2100

Einleitung

(Sysmex, Kobe, Japan) erhoben. Wie aus Tabelle V zu entnehmen ist, differieren die publizierten IPF%-Werte anderer Arbeitsgruppen (im Gegensatz zu den RP%-Werten) kaum von diesem Wert. Bei gesunden Neugeborenen sind nur sehr begrenzt Untersuchungen durchgeführt und noch keine neonatalen IPF%-Referenzwerte etabliert worden.

Durch die Etablierung von IPF%-Normwerten bei Neugeborenen könnte zukünftig eine direkte und schnelle Einschätzung der neonatalen Thrombozytenproduktionsrate ermöglicht werden.

Einleitung

Tabelle V. Vergleich von Studien zu RP%- bzw. IPF%-Normwerten

(IPF, *Immature Platelet Fraction*; RP, Retikulierte Thrombozyten; TO, Thiazol-Orange; HFPF, hochfluoreszierende Thrombozytenfraktion; n, Anzahl der untersuchten Patienten; k. A., keine Angaben)

	Ergebnisse (Mittelwert \pm SD)	n	Autoren	Jahr
Untersuchung bei gesunden Erwachsenen	IPF 3,4 %	50	Briggs <i>et al.</i>	2004
	IPF 3,3 %	129	Abe <i>et al.</i>	2006
	IPF $2 \pm 1,1$ %	82	Takami <i>et al.</i>	2007
	RP $8,6 \pm 2,8$ %	50	Kienast <i>et al.</i>	1990
	RP $0,9 \pm 0,1$ %	k. A.	Ault <i>et al.</i>	1993
	RP $2,9 \pm 2,2$ %	k. A.	Rinder <i>et al.</i>	1993
	RP $1,92 \pm 1,27$ %	21	Ogata <i>et al.</i>	1998
	RP $2,17 \pm 0,9$ %	40	Koike <i>et al.</i>	1998
	RP $7,9 \pm 2,9$ %	27	Saxon <i>et al.</i>	1998
	RP 6,4 %	22	Robinson <i>et al.</i>	2000
	TO-positive Thrombozyten $5,7 \pm 2,4$ %	30	Macchi <i>et al.</i>	2002
	RP $8,4 \pm 2,5$ %	k. A.	Guo <i>et al.</i>	2003
	RP $1,1 \pm 0,5$ %	10	Saxonhouse <i>et al.</i>	2004
	RP $0,99 \pm 0,32$ %	40	Wasiluk <i>et al.</i>	2005
	RP $6,13 \pm 3,09$ %	23	Salvagno <i>et al.</i>	2006
	HFPF 3,1 %	80	Kickler <i>et al.</i>	2006
	RP 5 %	71	Thomas-Kaskel <i>et al.</i>	2007
Untersuchung bei gesunden Kindern	IPF $2,7 \pm 1,3$ %	100	Strauß <i>et al.</i>	2010
Untersuchung bei gesunden Neugeborenen	RP $4 \pm 2,4$ %	39	Peterec <i>et al.</i>	1996
	RP $2,7 \pm 1,6$ %	37	Saxonhouse <i>et al.</i>	2004
	RP $1,65 \pm 0,95$ %	72	Wasiluk <i>et al.</i>	2005

2.4 Thrombozytentransfusion bei Früh- und Neugeborenen

Allgemein akzeptierte, evidenzbasierte Leitlinien zur Behandlung neonataler Thrombozytopenien existieren derzeit nicht. Zumeist werden Thrombozytenkonzentrate bei Neugeborenen prophylaktisch transfundiert.⁵⁸ Obwohl am häufigsten milde Ausprägungsformen der Thrombozytopenie vorliegen, werden dennoch 5-9 % aller thrombozytopenen Neugeborenen auf einer neonatologischen Intensivstation transfundiert, in 50 % der Fälle mehrfach.⁵⁹ Da ein Nutzen prophylaktischer Thrombozytentransfusionen zur Prävention von Blutungen bislang nicht nachgewiesen wurde,⁶⁰ wird die Indikation zur Verabreichung von Thrombozytenkonzentraten sehr variabel gestellt. Im Ländervergleich von Österreich, Deutschland und der Schweiz mit den USA und Kanada ergab sich für die Kliniken der deutschsprachigen europäischen Länder ein niedrigerer unterer Thrombozytengrenzwert, bei dem sich für eine Transfusion entschieden wurde. Des Weiteren waren dort häufiger hausinterne Richtlinien etabliert als in den USA (89 % *versus* 42 %).⁶¹ In der Literatur findet sich zum Thema nur eine multizentrische, kontrolliert randomisierte klinische Studie. In dieser wurden Frühgeborene mit einem Gestationsalter < 33+0 SSW und einem Geburtsgewicht von 500-1500 g eingeschlossen, die eine Thrombozytenzahl < 150/nl innerhalb der ersten 72 Stunden nach Geburt hatten. Es erfolgte die randomisierte Einteilung der Frühgeborenen in eine Kontrollgruppe (n = 74) und eine Behandlungsgruppe (n = 78). Letztere erhielt bis zu drei Thrombozytenkonzentrate, um eine Thrombozytenzahl > 150/nl bis zum siebten Lebenstag aufrecht zu erhalten. Die Kontrollgruppe erhielt keine Therapie solange die Thrombozytenzahlen nicht < 50/nl fielen oder eine Blutung auftrat. Andrew *et al.* kommen in ihrer Untersuchung zu dem Ergebnis, dass keine Risikoreduktion um ≥ 25 % für das Auftreten oder den Schweregrad einer ICH bei Frühgeborenen mit einer mild ausgeprägten Thrombozytopenie durch die frühe prophylaktische Gabe von Thrombozytenkonzentraten erreicht werden konnte.⁶⁰

Weiterhin wurde in einer prospektiven Beobachtungsstudie (PlaNet-1 *Trial*) das *Outcome* von Frühgeborenen (n = 169; medianes Gestationsalter 27+0 SSW, medianes Geburtsgewicht 822 g) mit einer schweren Thrombozytopenie (definiert als < 60/nl) im Hinblick auf das Auftreten von Blutungen und dem Nutzen von Thrombozytentransfusionen untersucht. 18 % der eingeschlossenen Patienten entwickelten keine Blutung, 73 % eine leichte Blutung (v. a. Hämaturie) und nur 9 % eine schwerwiegende Blutung (pulmonale Blutung, IVH °III/IV). Ein Drittel der Frühgeborenen hatte Thrombozytenzahlen < 20/nl, wovon 91 % keine schwerwiegende Blutung entwickelten. Bei Neugeborenen mit einer Blutung war das mediane

Einleitung

Gestationsalter im Vergleich zu den Neugeborenen ohne Blutungsereignis deutlich niedriger (27+0 SSW *versus* 33+0 SSW). Die meisten Thrombozytenkonzentrate wurden an Neugeborene mit einer leichten Blutung verabreicht. Man konnte weiterhin beobachten, dass eine wiederholte Gabe zu einem insgesamt geringeren Anstieg der Thrombozytenzahl führte. Das erstmalige Auftreten der Thrombozytopenie war in der Mehrheit der Fälle (43 %) mit einer Sepsis assoziiert. Die Todesfälle waren mit einem Multiorganversagen bei Sepsis, NEC oder perinatalen Asphyxie aufgrund eines hohen peripartalen Blutverlusts assoziiert und nicht Folge einer unkontrollierten Blutung in Verbindung mit einer Thrombozytopenie.⁵⁸

Bonifacio *et al.* sahen in ihrer Untersuchung einen Zusammenhang zwischen Mortalität und Thrombozytenzahl. So starben 16,7 % der Neugeborenen mit einer milden, 32,4 % mit einer moderaten und 45,8 % mit einer schweren Thrombozytopenie. In der Kontrollgruppe ohne Thrombozytopenie fand sich eine Mortalität von 1,4 %.¹⁹ Man muss allerdings kritisch bemerken, dass bei den Todesfällen auch in dieser Studie schwer erkrankte Neugeborene betroffen waren und diese Erkrankungen (Sepsis, NEC) typischerweise mit einer schweren Thrombozytopenie assoziiert sind. Bei der Erklärung für eine erhöhte Mortalitätsrate im Zusammenhang mit einer Thrombozytentransfusion zur Behandlung der schweren Thrombozytopenie¹⁹ muss die zugrunde liegende Erkrankung berücksichtigt werden.

Die Thrombozytopenie gilt als Risikofaktor für die Entwicklung einer intraventrikulären Hämorrhagie (IVH).⁶² Deshalb findet sich auch relativ konsistent die Empfehlung zur Thrombozytentransfusion bei einem Abfall der Thrombozytenzahl auf $< 20/\text{nl}$ bei klinisch stabilen Neugeborenen,⁴⁰ da ab diesem Wert das Blutungsrisiko deutlich ansteigt.⁶² Bei der Beurteilung des Risikos für eine Blutung ist die Thrombozytenzahl, wie obige Studien demonstrieren, allerdings nur einer von mehreren Parametern, der zur Einschätzung der Blutungswahrscheinlichkeit beiträgt. Folgende Faktoren sollten ebenso Berücksichtigung finden: der Verlauf der Thrombozytenwerte, die Ätiologie der Thrombozytopenie, die Thrombozytenfunktion, zugrunde liegende Erkrankungen, Gerinnungsstörungen, komplizierende Faktoren wie z.B. Fieber, Infektion, bereits vorhandene Blutungszeichen (z.B. Petechien) oder eine IVH sowie das Gestations- bzw. postnatale Alter und der klinische Gesamtzustand.⁶³

Term Neugeborene haben normalerweise ein geringes Risiko für eine IVH. Bei Neugeborenen mit sehr niedrigem Geburtsgewicht (VLBW), definiert als ein Gewicht < 1500 g, ergab sich jedoch eine Inzidenz von 20 % für eine IVH.⁶⁴ Dies begründet die Ausarbeitung risikoadaptierter Leitlinien für die Thrombozytopenie bei Früh- und Neugeborenen. In einer aktuellen Untersuchung zur Durchführung von prophylaktischen Thrombozytentransfusionen bei

Einleitung

Neugeborenen wird folgendes Prozedere empfohlen: Für VLBW-Frühgeborene mit einem Gestationsalter $< 34+0$ SSW ohne Blutungshinweise sollten Thrombozytenzahlen $> 20/\text{nl}$, bei Infektionsverdacht Thrombozytenzahlen $> 50/\text{nl}$ erreicht werden. Für ELBW-Frühgeborene (vor allem bei einem Geburtsgewicht < 800 g) sollten bei Infektionsverdacht oder einer Neutropenie Thrombozytenzahlen $> 80/\text{nl}$ und vor einer Therapie mit Indomethacin oder Ibuprofen Thrombozytenzahlen $> 100/\text{nl}$ angestrebt werden. Bei Verdacht auf oder bestehender NAIT sowie Blutungsgefahr sollten prophylaktisch Thrombozytenkonzentrate mit HPA-1a,-5b-negativen Thrombozyten bei reifen Neugeborenen gegeben werden, um Thrombozytenzahlen $> 30/\text{nl}$ aufrecht zu erhalten. Bei Frühgeborenen mit NAIT liegt der Zielwert bei $> 50/\text{nl}$. Fallen die Thrombozytenzahlen $< 30/\text{nl}$ oder tritt eine Blutung auf, können auch nicht-selektierte Thrombozyten transfundiert werden, wenn kompatible Thrombozyten nicht schnell verfügbar sind.^{41, 65}

Der Benefit von Transfusionen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Grundsätzlich sollten Thrombozytenkonzentrate zurückhaltend transfundiert und die Indikation sorgsam gestellt werden, da es bei Transfusion zu einer Immunisierung gegen Thrombozytenantigene kommen kann.⁶⁶ Weitere Risiken sind die Entwicklung einer akuten oder verzögerten hämolytischen Transfusionsreaktion, einer febrilen, nicht-hämolytischen Transfusionsreaktion, einer allergischen Reaktion mit Urtikaria, einer Graft-versus-host-Reaktion, einer Transfusions-assoziierten akuten Lungeninsuffizienz (TRALI) sowie das Risiko von Infektionen (HIV, Hepatitis B und C, bakteriell).⁴⁰

Aus den zitierten Studien lässt sich resümieren, dass die Entscheidung zur Gabe von Thrombozytenkonzentraten multifaktoriell getriggert ist. Eine Untersuchung in kontrollierten, multizentrischen Studien ist notwendig, um eine definitive Aussage über die untere Grenze zur Indikation für die Thrombozytentransfusion treffen zu können. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt erfolgt die Randomisierung von Frühgeborenen ($n = 660$; $< 34+0$ SSW) mit Thrombozytenzahlen $< 50/\text{nl}$ für eine weitere kontrollierte Studie (PlaNet-2 Studie). Es soll das primäre *Outcome* der Frühgeborenen in Hinblick auf das Auftreten einer schwerwiegenden Blutung bis zum 28. Lebenstag nach Gabe von Thrombozytenkonzentraten bei Thrombozytenzahlen $< 50/\text{nl}$ versus $< 25/\text{nl}$ untersucht werden.⁶⁷

Ziel aller Untersuchungen ist die Reduktion von Mortalität und Blutungskomplikationen. Die Etablierung der IPF als Parameter zur Einschätzung der megakaryopoietischen Aktivität im Knochenmark könnte somit zur Verbesserung der Transfusionspraxis beitragen. Des Weiteren können die o.g. Risiken, denen das Neugeborene durch die Verabreichung von

Thrombozytenkonzentraten ausgesetzt ist, minimiert und somit das Management der neonatalen Thrombozytopenie optimiert werden.

2.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Inzidenz der neonatalen Thrombozytopenie von bis zu 35 % spiegelt die klinische Relevanz dieser Erkrankung wider. Ein zuverlässiger, einfach zu erhebender Parameter für die Beurteilung der Aktivität der Megakaryopoese wäre hilfreich, um die pathophysiologischen Mechanismen (Thrombozytopenie als Folge einer verminderten Produktion oder einer erhöhten peripheren Destruktion) und den Verlauf der Thrombozytopenie bei Neugeborenen besser und schneller beurteilen zu können. Dadurch rückt die Notwendigkeit einer invasiven Knochenmarkpunktion in den Hintergrund, es können ein gezielteres Management der neonatalen Thrombozytopenie erfolgen, eine Suppression der körpereigenen Thrombozytenproduktion sowie Komplikationen mit Spätfolgen vermieden werden. Die *Immature Platelet Fraction* könnte ein geeigneter Parameter zur nicht-invasiven Analyse der megakaryopoietischen Aktivität beim Früh- und Neugeborenen sein.

Bisherige Analysen bei Neugeborenen evaluierten die retikulierten Thrombozyten mit nicht standardisierter Methodik. Daraus ergaben sich stark variierende Ergebnisse. In dieser Arbeit sollen mit einer neuen, standardisierten Messmethode erstmals reproduzierbare IPF%-Normwerte für Neugeborene ermittelt werden. Diese Anforderung erfüllt das in dieser Arbeit eingesetzte vollautomatische Gerät XE-2100 von Sysmex.

Es wird die Hypothese aufgestellt, dass ein erhöhter IPF%-Wert einem Anstieg der Thrombozyten vorausgeht, da vermutet wird, dass ein Großteil der neonatalen Thrombozytopenien durch einen vermehrten Abbau der Thrombozyten verursacht wird. Außerdem wird angenommen, dass eine inverse Korrelation zwischen Thrombozytenwert und IPF% besteht. Zur Beurteilung der megakaryopoietischen Proliferationsaktivität sollen in dieser Arbeit die Thrombozytenwerte und die IPF% von thrombozytopenen und nicht-thrombozytopenen Neugeborenen im Verlauf der ersten Lebenswoche untersucht werden. Es soll auch geprüft werden, ob der IPF%-Wert am ersten Lebenstag prädiktiv Auskunft über die Entstehung oder den Verlauf einer Thrombozytopenie geben kann. Möglicherweise kann die Indikationsstellung zur Thrombozytentransfusion auf der Grundlage der aktuellen Thrombozytopenieserate verbessert und der Einsatz von Thrombozytenkonzentraten verringert

Einleitung

werden. Diese Erkenntnisse können in hohem Masse zur Verbesserung des Monitorings und der Behandlung der neonatalen Thrombozytopenie beitragen.

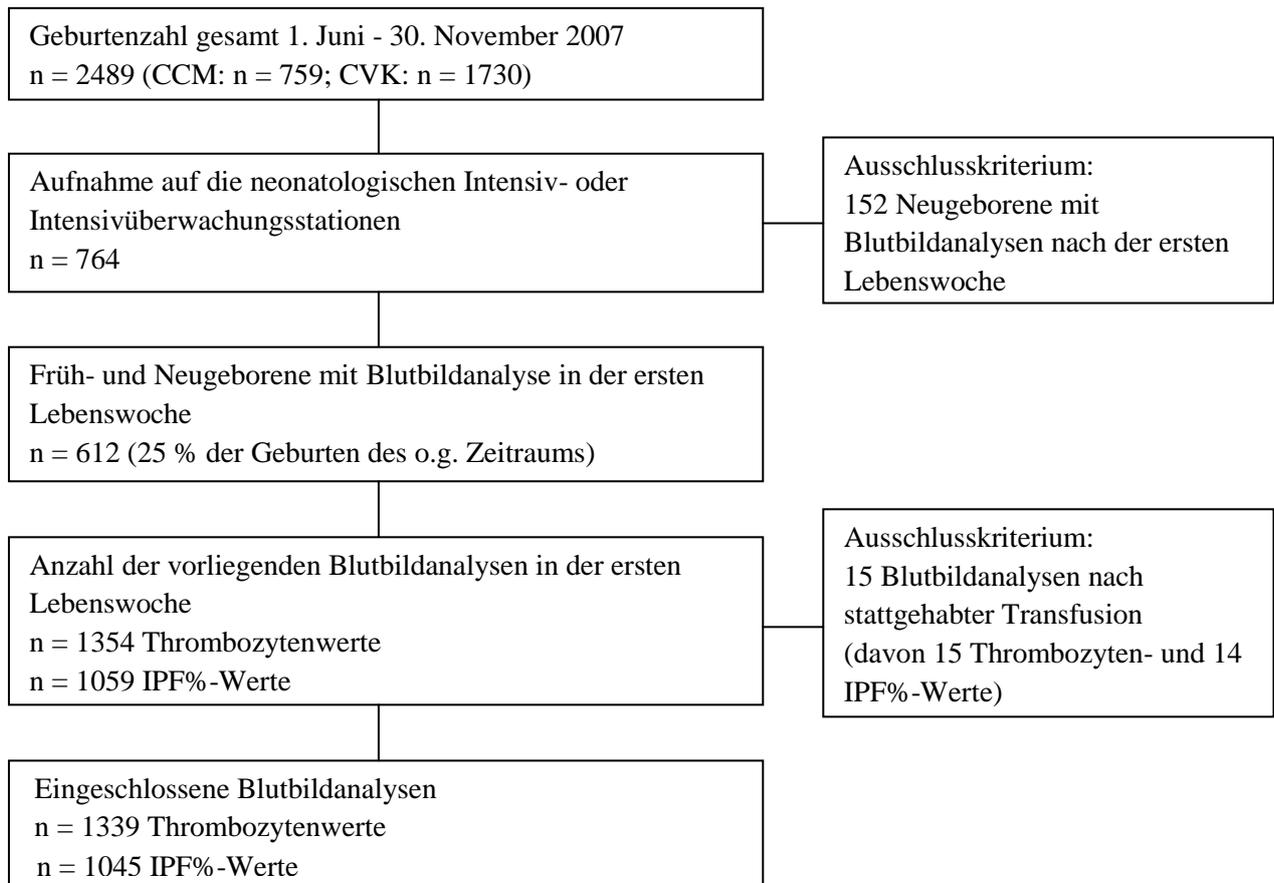
3 Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv und Blutproben

In diese retrospektive Studie wurden 612 intensivmedizinisch überwachte Früh- und Neugeborene eingeschlossen, die im Zeitraum von Juni bis November 2007 an der Charité - Universitätsmedizin Berlin geboren wurden (neonatologische Intensiv- und Intensivüberwachungsstationen der Standorte Charité Campus Mitte (CCM), Stationen 107i, 108i und Campus Virchow Klinikum (CVK), Stationen 32i, 40i). Zu diesem Zeitpunkt wurden die Kliniken unabhängig voneinander geleitet. Es wurden sowohl Frühgeborene (Gestationsalter $< 37+0$ SSW) als auch reife Neugeborene einbezogen (Gestationsalter $\geq 37+0$ SSW). Die Angaben zum Gestationsalter beziehen sich auf vollendete Schwangerschaftswochen (SSW) + Schwangerschaftstage *post menstruationem* (p.m.). Hinsichtlich des Geburtsgewichts wurden alle Gewichtsklassen (ELBW, VLBW, LBW, *low birth weight*, mit einem Geburtsgewicht < 2500 g und Gewicht ≥ 2500 g) berücksichtigt. Einschlusskriterium war mindestens eine Blutbildanalyse innerhalb der ersten sieben Lebenstage.

Ausschlusskriterium für die Auswertung der Blutparameter war eine vorherige Transfusion von Thrombozytenkonzentrat ($n = 4$), weil dadurch die IPF möglicherweise verändert wurde.⁶⁸ Die Blutbildanalysen, die Neugeborene vor einer Transfusion erhielten, wurden jedoch bei der Auswertung berücksichtigt. Neugeborene, die während der ersten Lebenswoche mindestens einmalig einen erhöhten Thrombozytenwert ($> 450/\text{nl}$) hatten, blieben außerdem in den Auswertungen unberücksichtigt. Von insgesamt 1354 Thrombozytenwerten wurden daher 1339 in die Auswertungen einbezogen. In 1059 Fällen wurde neben der Thrombozytenzahl auch die IPF% bestimmt, wovon 1045 IPF%-Werte eingeschlossen wurden.

Abb. 2. Studiendesign



Das Patientenkollektiv wurde in zwei Gruppen eingeteilt: die Früh- und Neugeborenen, deren Thrombozytenzahl innerhalb der ersten Lebenswoche wenigstens einmal $< 150/\text{nl}$ war, wurde als Thrombozytopenie-Gruppe ($n = 156$) zusammengefasst. Die eingangs beschriebene Unterscheidung einer milden ($149-101/\text{nl}$), einer moderaten ($100-50/\text{nl}$) bzw. schweren ($< 50/\text{nl}$) Form der Thrombozytopenie wurde angewandt. Zur Kontrollgruppe zählten alle Früh- und Neugeborenen ($n = 456$), die in den ersten sieben Lebenstagen Thrombozytenzahlen ausschließlich im Referenzbereich von $150-450/\text{nl}$ hatten.

Da die Bestimmung der IPF nicht zur klinischen Routinediagnostik gehörte, wurde sie nicht mit jedem Blutbild gemessen. Bei Vorliegen von mehr als einer Blutbilduntersuchung pro Tag wurde der erste Thrombozytenwert des Tages mit dem dazugehörigen Wert der IPF für die Auswertung verwendet. Die in der Studie analysierten hämatologischen Parameter wurden dem System der elektronischen Klinikdatenbank Expertviewer® (Sysmex, Kobe, Japan) entnommen.

Die IPF wird normalerweise als prozentualer Anteil an den Thrombozytenwerten (IPF%) angegeben und ist als hämatologischer Parameter anerkannt. Für die Auswertung der IPF-Werte

Material und Methoden

wurden auch in dieser Studie primär die prozentualen Angaben verwendet, die absoluten Zahlen wurden jedoch zur Vervollständigung der Darstellung ergänzt.

Die Blutentnahmen bei den Früh- und Neugeborenen erfolgten ausschließlich aufgrund einer klinischen Indikation, ohne zusätzlichen Verlust von Blutvolumen aus Studienzwecken. Die Blutentnahmen erfolgten durch venöse oder arterielle Punktion oder über zentralvenöse oder arterielle Verweilkatheter. Eine kapilläre Blutentnahme wurde ausgeschlossen, da hierbei durch Entnahmefehler (Reiben oder Drücken am Entnahmeort als Risikofaktor für eine Hämolyse und stärkere Vermengung mit Interstitialflüssigkeit) oft unzuverlässige Werte resultieren.⁶⁹ Die verwendeten Blutröhrchen (Produkt-Nr. 077058, Gefäßbezeichnung GK 150 Standrand) von der Firma Kabe (Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland) enthalten als Antikoagulanzen Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA). Sie wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt und innerhalb von 1-3 Stunden im Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie (Standort CVK) mit dem vollautomatischen Blutanalysegerät von Sysmex der Serie XE-2100 (Sysmex, Kobe, Japan) ausgewertet. Briggs *et al.* zeigten in ihren Untersuchungen, dass eine Lagerung bis zu zwei Tage nach Blutentnahme bei Raumtemperatur die IPF nicht verändert.⁷⁰

Abb. 3. Detailinformationen zum Patientenkollektiv

Gesamtzahl der Studienpatienten	n = 612
Anzahl der Früh- und Neugeborenen mit Thrombozytopenie	n = 156 (26 %)
Anzahl Frühgeborener (< 37+0 SSW)	n = 298 (49 %)
Anzahl ELBW-Frühgeborener (< 1000 g)	n = 37 (6 %)
Anzahl VLBW-Frühgeborener (< 1500 g)	n = 64 (10,5 %)
Anzahl weiblicher Früh- und Neugeborener	n = 261 (43 %)

Neben den Thrombozytenzahlen und IPF-Werten wurden das Gestationsalter, chronologische Alter sowie Geburtsgewicht und Geschlecht der Neugeborenen bei der Auswertung berücksichtigt. Tabelle VI. gibt die wesentlichen demographischen Basisinformationen über die Thrombozytopenie- und Kontrollgruppe wieder.

Material und Methoden

Tabelle VI. Gestationsalter, Geburtsgewicht und Geschlechterverteilung des Patientenkollektivs (Anzahl, Median bzw. Range)

	Thrombozytopenie-Gruppe n = 156	Kontrollgruppe n = 456
Geburtsgewicht [g]		
Median	2158	2805
Range	(400 - 4650)	(660 - 4840)
Gestationsalter [SSW]		
Median	35+1	37+1
Range	(23+2 - 44+0)	(23+2 - 42+2)
Geschlecht		
weiblich	57 (37 %)	204 (45 %)

Da in dieser Arbeit neben den hämatologischen Parametern ausschließlich epidemiologische Daten berücksichtigt wurden, bedurfte es entsprechend §15 der Berufsordnung für Ärzte keiner besonderen Genehmigung durch die Ethikkommission. Der Verwendung ausschließlich nicht-patientenbezogener Daten wurde durch die Unterschrift der Erziehungsberechtigten in dem Behandlungsvertrag zwischen dem Patienten und der Charité - Universitätsmedizin Berlin zugestimmt. Dieses Vorgehen wurde am 06.10.2008 von dem Koordinationszentrum für klinische Studien der Charité genehmigt. Alle Angaben zu Name und Geburtsdatum wurden bei den Auswertungen anonymisiert.

3.2 Das hämatologische Analysegerät Sysmex XE-2100

Das Blutanalysegerät XE-2100 mit erweiterter Software für die IPF-Bestimmung (XE-IPF Master, Sysmex) nutzt Vollblut und arbeitet von der Aspiration der Blutprobe bis zur Befunderstellung komplett automatisch. Je nach Programmeinstellung erfolgt ein Durchlauf von 113-150 Proben pro Stunde mit bis zu 76 Einzelmesswerten pro Probe in ca. einer Minute.⁷¹

Das Gerät kann die unmittelbaren hämatopoietischen Vorläuferzellen von Erythrozyten und Thrombozyten detektieren.

3.3 Messung der Thrombozytenzahl

Die Thrombozytenzahl kann durch drei verschiedene Messmethoden ermittelt werden.

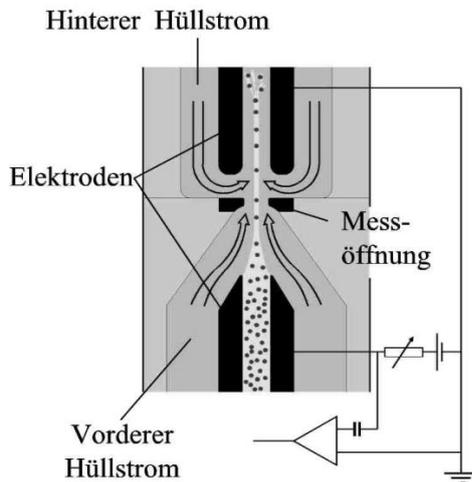
Bei der Phasenkontrastmikroskopie wird die Thrombozytenzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Unter dem Mikroskop gezählte Thrombozytenzahlen sind in der Regel signifikant höher als bei automatischer Bestimmung in Blutanalysegeräten. Andererseits unterliegt die automatische Methode deutlich geringeren Schwankungen und ist weniger zeitaufwendig als eine manuelle Zählung.^{72, 73} Drei Fehlerarten lassen sich beim manuell mikroskopisch angefertigten Blutbild benennen: der Verteilungsfehler aufgrund ungleicher Verteilung von Zellen in der Zählkammer, der Fehler einer subjektiven Interpretation durch den Untersucher sowie der statistische Fehler aufgrund einer geringen Anzahl differenzierter Zellen.⁷¹

Beim Vergleich von optischer Zählung mittels Streulicht/Fluoreszenz im Durchflusszytometer und Impedanz-basierter Thrombozytenzählung zeigte sich eine einwandfreie Korrelation der Methoden anhand von Messungen bei thrombozytopenen Patienten.⁷⁴ Das Blutanalysegerät XE-2100 kann sowohl durchflusszytometrisch optische Thrombozytenzählungen als auch Impedanzmessungen durch hydrodynamische Fokussierung durchführen. Das Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

Für die Impedanz-Zellzählung wird Vollblut zusammen mit Verdünnungsreagenz (isotone Kochsalzlösung) in einer Mischkammer verdünnt. Ein definiertes Volumen dieser Verdünnung wird in die Messkammer eingespritzt und durch eine Kapillaröffnung gesaugt, die einen Durchmesser von 60 µm besitzt. Der vordere Hüllstrom („Frontsheath-Flow“) dient der hydrodynamischen Fokussierung des zentralen Probenstromes. Er bewirkt eine extreme Erhöhung der Flussgeschwindigkeit und damit eine Beschleunigung der Blutzellen im Probenstrom. Dadurch werden die Zellen aus dem Zellverband gelöst und gelangen einzeln durch die Messöffnung. Der hintere Hüllstrom („Backsheath-Flow“) ist erforderlich, um eine Rezirkulation von Blutzellen, die die Messöffnung passiert haben, zu verhindern. Das Verfahren gewährleistet, dass auch bei sehr hohen Zellkonzentrationen ein genaues Zählergebnis erzielt wird. Gleichzeitig wird durch die hydrodynamische Fokussierung die Messöffnung permanent gespült, womit Verstopfungen minimiert werden. Zwischen einer internen und einer externen Elektrode wird eine Spannung von ca. 200 V angelegt. Wenn die Zellen durch die Messöffnung treten, erzeugen sie eine elektrische Widerstandsänderung. Diese wird als elektrischer Impuls gemessen und verhält sich proportional zur Zellzahl. Die Größe jedes analysierten Impulses

(Amplitudenänderung) ist direkt proportional zur jeweiligen Größe der Zelle, die die Messöffnung in diesem Moment passiert und den Impuls ausgelöst hat.^{75,76}

Abb. 4. Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung bei der Impedanz-Zellzählung (Widerstandsmessprinzip)⁷⁵



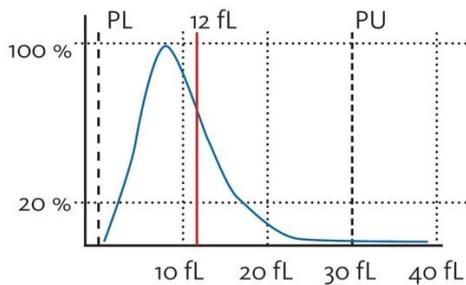
In der Mehrzahl der Fälle wird mit der Impedanzmessung ein akkurates Ergebnis erzielt und als „PLT-I“ vom Sysmex-Automaten ausgegeben (Abbildung 5A). Bei Thrombozytenwerten $< 100/\text{nl}$ wies die optische Methode jedoch verlässlichere Ergebnisse auf.⁷⁷ Bei der Impedanz-Thrombozytenzählung kann es zudem beim Vorliegen von Erkrankungen wie ITP, myelodysplastischem Syndrom, hämolytischer Anämie oder anderen Krankheitszuständen mit Erythrozytenfragmentierung und aplastischem Knochenmark zu Messfehlern kommen: Es entstehen entweder relativ große Thrombozyten (z.B. bei einer ITP), die bei der Impedanzzählung fälschlicherweise ausgeschlossen werden, so dass eine falsch niedrige Thrombozytenzahl angezeigt wird, oder es kommt infolge eines Zellzerfalls zu Fragmentozyten und Zelldebris, welche aufgrund der geringen oder ähnlichen Zellgröße bei der Zählung eingeschlossen werden und somit zu falsch hohen Thrombozytenwerten führen.⁷⁷ Die Unterscheidung zwischen der Erythrozyten- und Thrombozytenpopulation erfolgt im Analysegerät automatisch mittels flexibler Diskriminatoren. Thrombozyten, die normalerweise eine durchschnittliche Größe von 8-12 fL haben, können mit der Impedanzmethode in einem Bereich zwischen 2 fL (unterer Diskriminator (PL)) und 30 fL (oberer Diskriminator (PU)) erfasst werden.⁷⁸ Gibt das Analysegerät eine Impedanzkurve heraus, die nicht einer

Material und Methoden

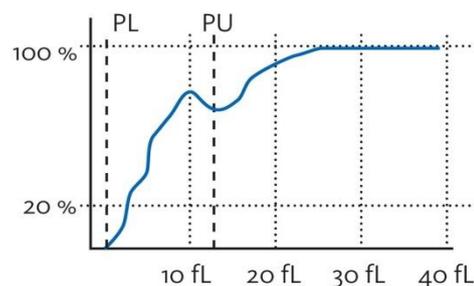
Normalverteilung entspricht (Abbildung 5B), so wird eine Fehlermeldung angezeigt und es erfolgt ein automatischer Wechsel in den optischen Analysenmodus mit fluoreszenzmarkierter Thrombozytenzählung (siehe Kapitel 3.4). Der Fluoreszenzfarbstoff färbt RNA/DNA in den Zellen an und versetzt das System somit in die Lage, Riesenthrombozyten (gleiches Volumen wie Erythrozyten, aber Unterscheidung durch den RNA-Gehalt) und Fragmentozyten (enthalten keine RNA) richtig einzuordnen. Somit wird anhand der Fluoreszenzaktivität und des Volumens der Zellen der exakte Thrombozytenwert ermittelt. Der herausgegebene Wert wird im Sysmex XE-2100 als optisch gemessener Thrombozytenwert (PLT-O) gekennzeichnet. Sollte auch bei der optischen Messung ein zweifelhaftes Ergebnis angezeigt werden, so erfolgt die Ausgabe des Ergebnisses der Impedanzmessung und wird in diesem Fall als „PLT-I*“ angezeigt. Als letzte Option kann bei abnormal verteilten Proben noch die Anfertigung eines Präparates mittels eines automatischen Ausstreichers und einer sich daran anschließenden automatischen Analyse im digitalen Mikroskop erfolgen.⁷³ Durch diesen Algorithmus kann auch bei thrombozytopenen Patienten ein akkurates Ergebnis der Thrombozytenzählung erzielt werden.

Abb. 5 Impedanzkurven (PL, unterer Diskriminator; PU, oberer Diskriminator)

A Impedanzkurve bei normaler Thrombozytopenie⁷⁸



B Impedanzkurve bei einer veränderten Thrombozytenmorphologie (z.B. bei Vorliegen von Riesenthrombozyten oder Fragmentozyten)⁷⁸



Bis vor wenigen Jahren konnten Impedanzanalysen nur in *Platelet Rich Plasma* (PRP) durchgeführt werden, damit keine Erythrozyten versehentlich in die Zählung einbezogen wurden. Qualitätsunterschiede bei der Herstellung von PRP resultierten dennoch in unpräzisen

Meßergebnissen. Die Messung der Thrombozytenzahl im Vollblut ist somit eine wertvolle Neuerung in der automatisierten hämatologischen Diagnostik.

3.4 Messung der retikulierten Thrombozyten

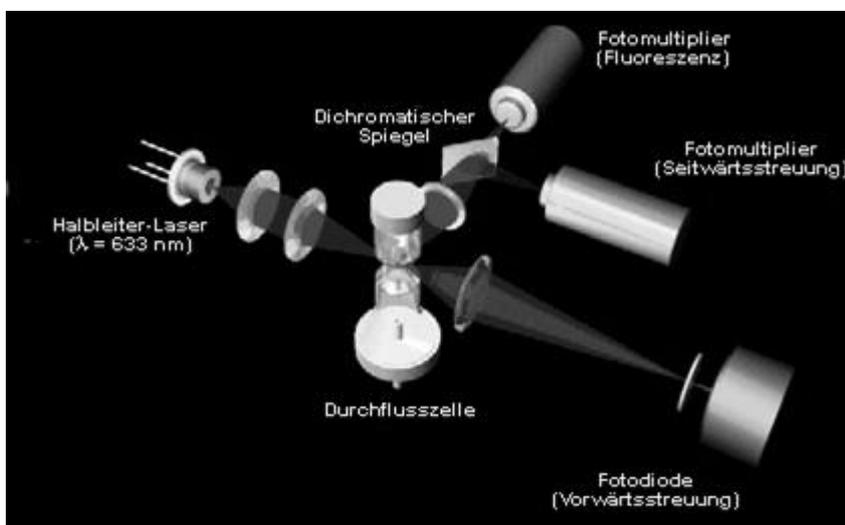
Ingram *et al.* beschrieben erstmals 1969, dass mittels Methylenblau im Ausstrichpräparat eine mikroskopische Darstellung des RNA-Gehalts in unreifen Thrombozyten möglich ist.⁴⁹ 1990 demonstrierte die Arbeitsgruppe von Kienast *et al.*, dass humane retikulierte Thrombozyten mit Thiazol-Orange angefärbt werden können und deren Nachweis in der Durchflusszytometrie (fluoreszenzaktivierte Zellanalyse, FACS) möglich ist. Der Farbstoff penetriert die Zellmembran, wodurch es zur Bindung von TO an RNA im Zytoplasma kommt. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass vermehrt TO-positive Thrombozyten im Blut bei erhöhtem Thrombozytenverbrauch vorliegen bzw. eine erniedrigte Anzahl der retikulierten Thrombozyten mit einer verminderten Produktionsrate im Knochenmark korreliert. Damit wurde erstmals eine Methode etabliert, mit der nicht-invasiv die Aktivität der Megakaryopoese im Knochenmark beurteilt werden kann.⁵⁷ Dale *et al.* erbrachten 1995 bei Hunden und Ault *et al.* in einem Mäusemodell den Beweis, dass die TO-Färbung von Thrombozyten als Marker für neu synthetisierte Thrombozyten gelten kann, da diese den Farbstoff nur bis zu 24 Stunden aufnehmen und innerhalb von 24 Stunden nach Freisetzung aus dem Knochenmark eine Degradation der RNA stattfindet.^{50, 51} Thiazol-Orange wird heute aufgrund der Instabilität der RNA-Bindung jedoch nicht mehr als Standardfärbung verwendet.

In den letzten Jahren etablierte sich eine Messmethode, mit der der Begriff der *Immature Platelet Fraction* eingeführt wurde. Die RNA-Bestimmung wird dabei durch die spezifische Färbung mit Oxazin-Polymethin-Farbstoff (Ret-Search II®, Sysmex) ermöglicht. Dieser Farbstoff durchdringt die Zellmembran, zur Fluoreszenz kommt es erst bei Nukleotidkontakt. Ein Computer-basierter, vordefinierter Algorithmus („Gating“) des XE-2100 unterscheidet anhand der gemessenen Fluoreszenzintensität (in Abhängigkeit vom angefärbten RNA-Gehalt) und des Zellvolumens zwischen reifen und unreifen Thrombozyten. Dies stellt den bedeutenden Vorteil gegenüber früheren Analysemethoden dar, bei denen nur eine manuelle Voreinstellung am Gerät und individuelle Markierung von Auswerteregionen möglich war, woraus die höhere Fehlerwahrscheinlichkeit resultiert. Die Quantifizierung der verschiedenen Zellfraktionen erfolgt über einen Halbleiterlaser, der sich auf die durchfließenden fluoreszierenden Zellen richtet. Das Vorwärtstreulicht, welches durch die Lichtstreuung der Zellen in einem engen Winkel zum

Material und Methoden

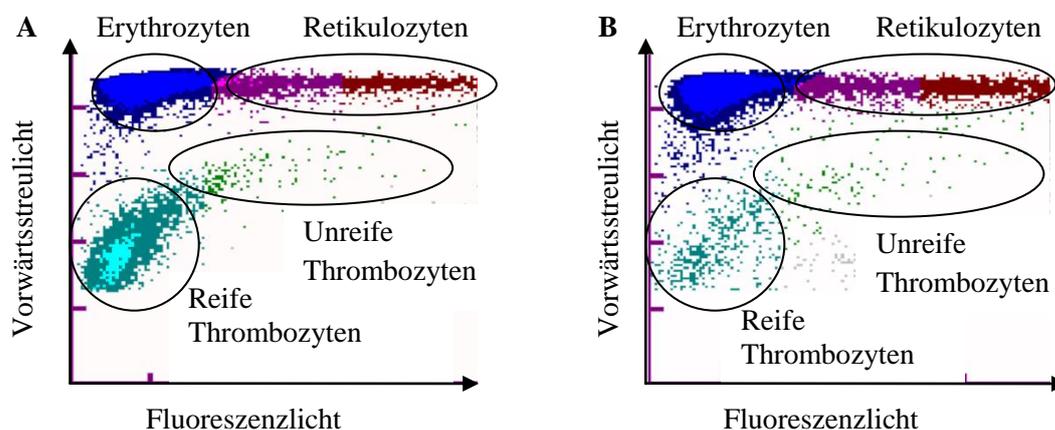
Laserlicht entsteht, liefert dabei Informationen zur Größe/Volumen der Zelle (Y-Achse). Das Seitwärtsstreulicht, welches im Winkel von 90° zum Laserlicht entsteht, charakterisiert die innere Zellstruktur. Das Fluoreszenzlicht misst den zellulären Nukleinsäure-Gehalt (X-Achse).⁷⁹ Die zweidimensionale Thrombozytendarstellung präzisiert somit die frühere eindimensionale Detektion. Abbildung 6 veranschaulicht die optische Messmethode. Erythrozyten und Thrombozyten werden bei der optischen Zählung gemeinsam in einer Messkammer des Analysegerätes gemessen („Retikulozyten-Kanal“), weil sie wegen ihrer deutlichen Größenunterschiede eindeutig getrennt voneinander erfasst werden können.

Abb. 6. Schematische Darstellung des optischen Systems des hämatologischen Analysegerätes XE-2100⁷⁹



Das automatische Blutanalysegerät erzeugt ein Streudiagramm, in dem die Zellen, in Abhängigkeit von Fluoreszenz- und Vorwärtsstreulicht, als Punktwolken dargestellt werden. Die reifen Thrombozyten (kleineres Zellvolumen mit geringem verbleibenden RNA-Gehalt) sind in Abbildung 7 die türkis markierte Zellpopulation; die unreifen Thrombozyten (IPF), die ein größeres Zellvolumen und aufgrund des höheren RNA-Gehaltes ein stärkeres Fluoreszenzsignal aufweisen, sind die grüne Punktwolke. Im oberen Anteil des Streudiagramms sind drei weitere Zellfraktionen zu sehen: die Erythrozyten (blau) mit einer geringen Fluoreszenzintensität, sowie zwei Retikulozytenfraktionen, die anhand des unterschiedlich stark verbleibenden RNA-Gehaltes mit daraus folgender unterschiedlicher Fluoreszenz pink bzw. rot dargestellt werden.

Abb. 7. Original-Scattergramm aus dem Expertviewer®; Ergebnis einer Untersuchung mit dem automatischen Blutanalysegerät XE-2100. Graphische Darstellung unreifer (grün) und reifer (türkis) Thrombozyten. **A.** Streudiagramm bei einem Neugeborenen mit normalem Thrombozytenwert (264/nl) und einem IPF-Wert von 4,4 % [IPF absolut 11,6/nl]. **B.** Streudiagramm bei einem thrombozytopenen Neugeborenen mit einem Thrombozytenwert von 45/nl und einer IPF von 24 % [IPF absolut 10,8/nl].



3.5 Statistische Analysen

In dieser Arbeit wurden die metrischen Parameter Thrombozyten- und IPF-Bestimmungen (% und absolut) sowie die kategorialen Variablen Geburtsgewicht, Gestationsalter und Geschlecht bei thrombozytopenen und nicht-thrombozytopenen Früh- und Neugeborenen untersucht. Deskriptiv wurden der Mittelwert, Median und Range (Minimum, Maximum) angegeben. Für die statistischen Analysen wurden die Werte zunächst auf Normalverteilung getestet (Kolmogorow-Smirnow-Test). Konnte eine Normalverteilung nachgewiesen werden, wurden der Student's t-Test durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angezeigt. Lag keine Normalverteilung der Parameter bzw. Variablen vor, wurden der Mann-Whitney Rank Sum Test genutzt und die Ergebnisse als Median angegeben. Ein statistisch signifikantes Ergebnis war bei $p < 0,05$ gegeben. Zur graphischen Darstellung der Mittelwerte von IPF und Thrombozyten wurde der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Häufigkeitsangaben wurden durch Ermittlung der absoluten Zahl in Beziehung zur Gesamtzahl (Gesamtzahl der Früh- und Neugeborenen bzw. Gesamtzahl der Blutbildanalysen) berechnet. Um die Inzidenz der *early*- und *late-onset* Thrombozytopenie zu ermitteln, wurden Früh- und Neugeborene, deren Thrombozytenzahl innerhalb der ersten 72 Stunden bzw. nach 72 Stunden

erstmalig unter 150/nl lag, in zwei Subgruppen analysiert. Da eine Blutentnahme nur nach klinischer Indikation erfolgte, erhielten vereinzelte Patienten innerhalb der ersten 72 Stunden nach der Geburt keine Blutabnahme.

Im Streudiagramm konnten die Thrombozyten- und IPF%-Werte sowie die Thrombozytenzahl am ersten Lebenstag in Abhängigkeit von Geburtsgewicht bzw. Gestationsalter mittels Regressionsanalyse (Korrelationskoeffizient r) betrachtet werden. Der Zusammenhang wurde jeweils mittels Regressionsgerade graphisch dargestellt.

Box-Plot Graphiken wurden erstellt, um die IPF%-Werte in Abhängigkeit vom Schweregrad der Thrombozytopenie zu veranschaulichen. Außerdem sollten sie die Zunahme der Thrombozytenzahl am ersten Lebenstag bei zunehmendem Geburtsgewicht verdeutlichen. Dazu wurden die Früh- und Neugeborenen entsprechend ihres Geburtsgewichts den vordefinierten Gewichtsklassen (ELBW, VLBW, LBW und Gewicht ≥ 2500 g) zugeordnet. Grundlegend sollen kurz die Symbole der Box-Plot-Graphik erklärt werden: Die untere Linie (Endlinie der sogenannten Antenne) gibt den Minimumwert des Datensatzes wieder. Die untere Grenzlinie der Box spiegelt das 25%-Perzentil (unteres Quartil) wider. Dies bedeutet, dass 25 % der Datenwerte kleiner oder gleich diesem Kennwert sind. Die waagerechte Linie innerhalb der Box ist der Median, der angibt, dass 50 % der Datenwerte kleiner oder gleich diesem Kennwert sind. Die obere Grenzlinie des Box-Plots beschreibt das 75%-Perzentil (oberes Quartil). Bei diesem Wert sind 75 % der Datenwerte kleiner oder gleich dem Kennwert. Die Boxhöhe gibt den Abstand zwischen dem 25%- und dem 75%-Perzentil wieder. Der Maximumwert eines Datensatzes ist durch die obere waagerechte Linie gekennzeichnet. In einer Box-Plot-Graphik können Ausreißer vorkommen. Diese sind dadurch gekennzeichnet, dass ihr Abstand vom 25%-Perzentil nach unten bzw. vom 75%-Perzentil nach oben zwischen dem 1,5-fachen und dem 3-fachen der Boxhöhe liegt. Extremwerte befinden sich außerhalb des 3-fachen der Boxhöhe und damit weit außerhalb des unauffälligen Streuungsbereiches.

Weiterhin wurde die prädiktive Bedeutung der IPF% untersucht, die einen Sturz der Thrombozytenzahl von > 50 /nl am Folgetag vorhersagen kann. Dafür errechnete man die Differenz der Thrombozytenzahlen von zwei aufeinanderfolgenden Tagen (innerhalb der ersten Lebenswoche der Früh- und Neugeborenen) und setzte den ermittelten Betrag in Beziehung zur IPF% des ersten dieser beiden Tage. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in einem Streudiagramm. Der χ^2 (Chi-Quadrat)-Vierfelder-Test wurde herangezogen, um das relative Risiko (RR) zu ermitteln, bei dem ab einem bestimmten IPF%-Wert mit einem Sturz der

Material und Methoden

Thrombozytenzahl von $> 50/\text{nl}$ am Folgetag zu rechnen ist. Es wurde nach folgender Formel berechnet:

$$RR = \frac{\frac{a}{(a+c)}}{\frac{b}{(b+d)}}$$

Für die Analyse und Darstellung (Streudiagramme, Regressionsanalysen, Box-Plot-Graphiken) der Ergebnisse wurden das Statistik- und Graphikprogramm von SigmaPlot (Version 11.0, Systat Software Inc., San José, Kalifornien, USA) sowie die Funktionen (Kalkulationen, graphische Darstellungen) von Microsoft Office Excel 2007 verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Patientenkollektiv und Auswertung der Blutbildanalysen

In diese Studie wurden 612 intensivmedizinisch überwachte Früh- und Neugeborene eingeschlossen, die insgesamt 1354 Blutbildanalysen während der ersten Lebenswoche erhielten. Davon konnten 1339 Thrombozytenzahlen und 1045 IPF%-Werte für die Analysen eingeschlossen werden (Tabelle VII).

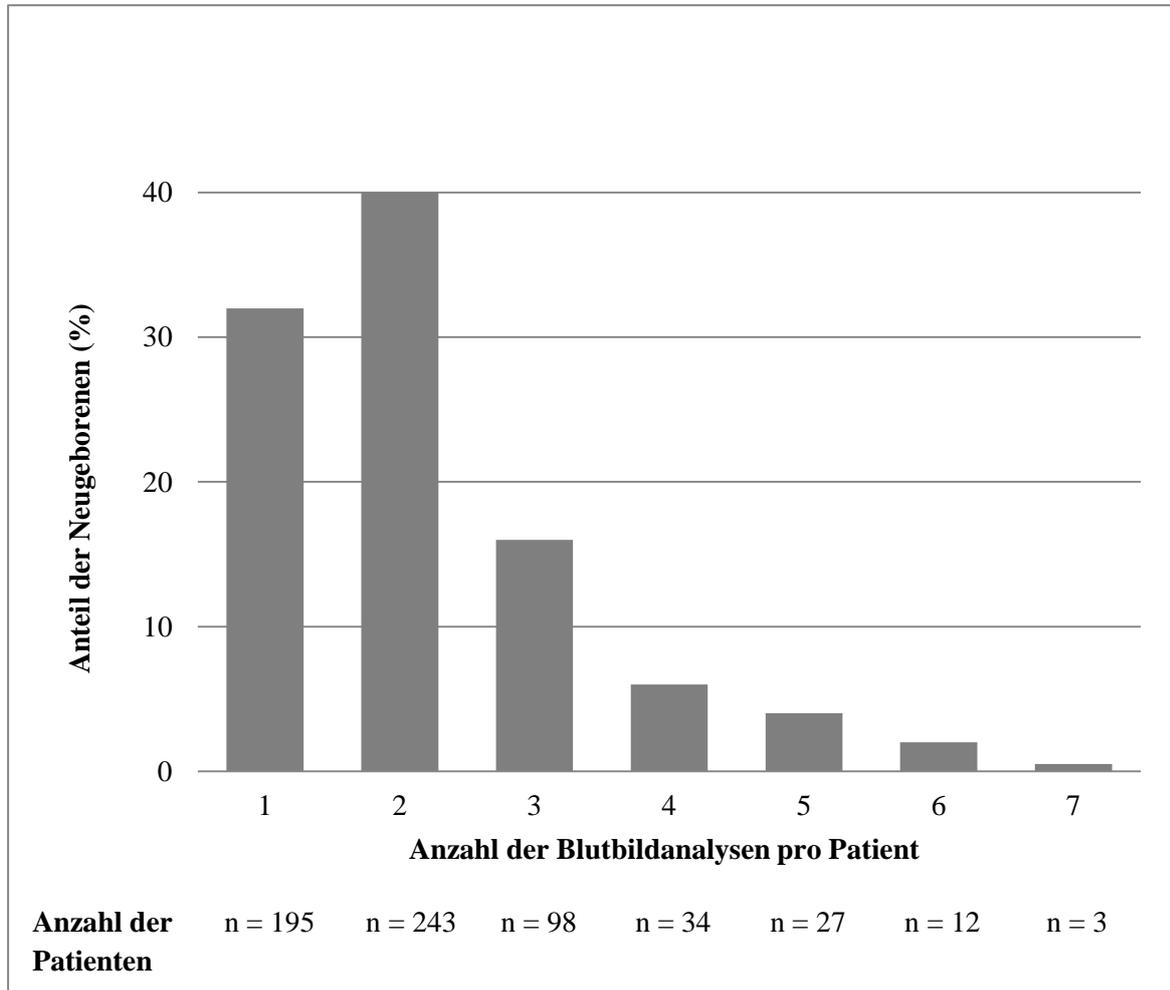
Tabelle VII. Verteilung der Blutbildanalysen bzw. der IPF%-Werte während der ersten sieben Lebenstage aller Früh- und Neugeborenen

Lebenstag	1	2	3	4	5	6	7	gesamt
Anzahl der Neugeborenen mit Blutbildanalysen	254	368	275	141	124	105	72	1339
davon mit IPF-Messungen	162	323	226	113	98	75	48	1045

In Abhängigkeit von der klinischen Indikation zur Blutentnahme lagen eine Blutbildanalyse bzw. bis zu sieben Blutbildanalysen pro Patient vor. Abbildung 8 gibt die Verteilung der Häufigkeit der Blutbildanalysen in der ersten Lebenswoche an. Die Mehrzahl der Neugeborenen erhielt innerhalb der ersten sieben Lebenstage zwei Blutbildkontrollen.

Ergebnisse

Abb. 8. Verteilung der Häufigkeit der Blutbildanalysen während der ersten sieben Lebenstage



4.2 Häufigkeit und Charakteristiken der Thrombozytopenien bei Früh- und Neugeborenen auf der neonatologischen Intensivstation

In der ersten Lebenswoche lag bei 26 % der untersuchten Früh- und Neugeborenen die Thrombozytenzahl zumindest einmal unter 150/nl. Diese Patienten wurden der Thrombozytopenie-Gruppe zugeordnet (156/612).

Im Anschluß wurde die Inzidenz der *early-* und *late-onset* Thrombozytopenie berechnet, wobei unterschieden wurde, ob die Thrombozytenzahl innerhalb der ersten 72 Lebensstunden bzw. nach 72 Lebensstunden erstmalig unter 150/nl lag. 10 Patienten erhielten innerhalb der ersten 72 Stunden keine Blutabnahme. Die Inzidenz für eine *early-onset* Thrombozytopenie betrug 21 %

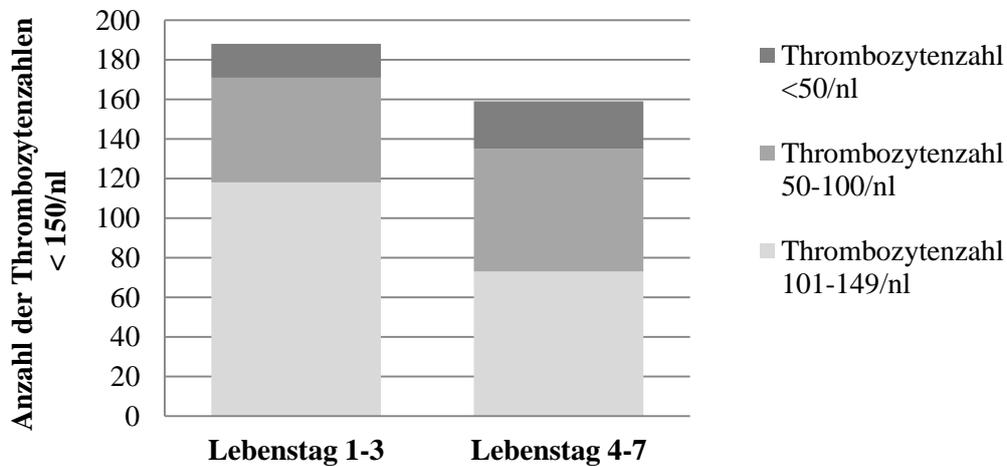
Ergebnisse

(126/612). 5 % (30/612) der Früh- und Neugeborenen entwickelten eine Thrombozytopenie nach 72 Stunden (*late-onset*).

Da eine Wiederholung der Blutbildanalysen an den Folgetagen ausschließlich nach klinischer Indikation – beispielsweise zur Verlaufskontrolle, in Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung, oder bei Verdacht auf eine Thrombozytopenie – durchgeführt wurde, kann nicht für alle Tage der ersten Lebenswoche eine Angabe zur Inzidenz der Thrombozytopenie gemacht werden. Bei 17 % (43/254 Blutbilder) der Blutbildanalysen des ersten Lebenstages wurde eine Thrombozytenzahl < 150/nl ermittelt.

Weiterhin wurde die Verteilung der Schweregrade der Thrombozytopenie in der ersten Lebenswoche untersucht (Abbildung 9). Dabei zeigte sich, dass eine leichte Thrombozytopenie mit 63 % deutlich häufiger in der ersten Wochenhälfte (Tag 1-3) vorkam; von Tag 4-7 waren es nur noch 46 %. Im Gegensatz dazu überwog in der zweiten Wochenhälfte (Tag 4-7) der Anteil an Blutbildern mit moderat und schwer ausgeprägter Thrombozytopenie (39 % *versus* 28 % für eine moderate bzw. 15 % *versus* 9 % für eine schwere Thrombozytopenie).

Abb. 9. Häufigkeit der Thrombozytopenie unter Berücksichtigung des Schweregrades



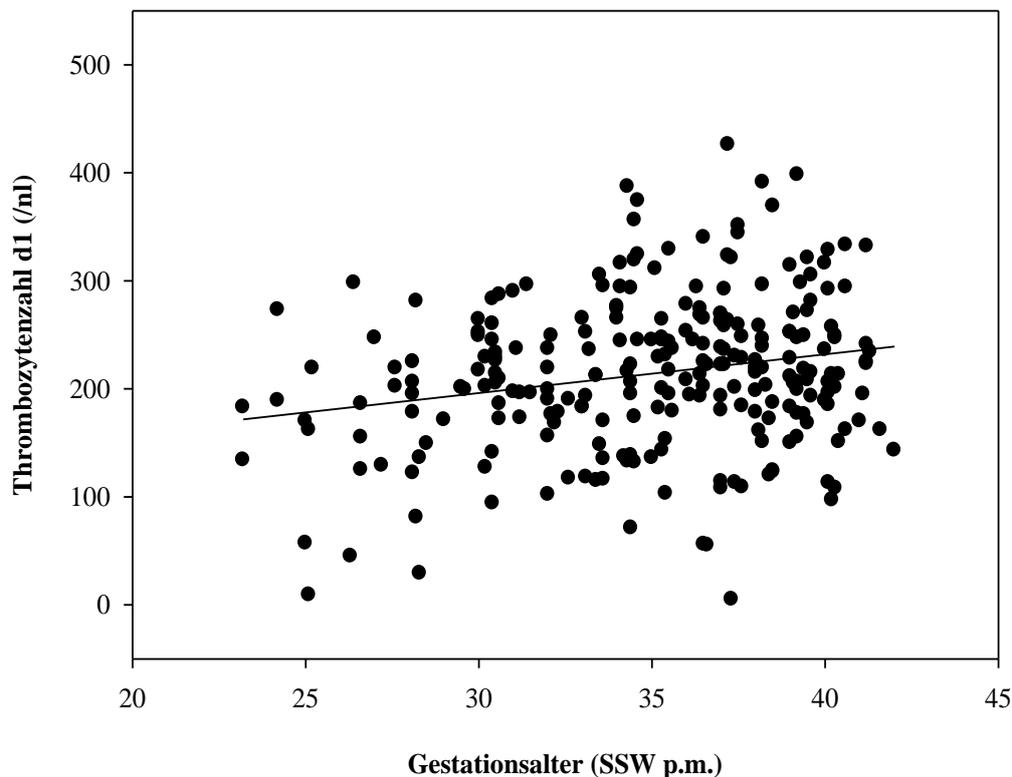
4.3 Epidemiologische Analysen

Thrombozytopenie Neugeborene hatten ein signifikant niedrigeres Gestationsalter und Geburtsgewicht als nicht-thrombozytopenie Neugeborene ($p < 0,001$; Mann-Whitney Rank Sum Test; Tabelle VI).

Außerdem zeigte sich eine signifikante lineare Korrelation zwischen der Thrombozytenzahl am ersten Lebenstag ($n = 254$) und dem Gestationsalter ($r = 0,05$; $p = 0,0132$) bzw. Geburtsgewicht ($r = 0,04$; $p < 0,001$). Bei einem höheren Gestationsalter und Geburtsgewicht lagen auch die Thrombozytenwerte der Neugeborenen am ersten Lebenstag höher (Abbildung 10 und 11).

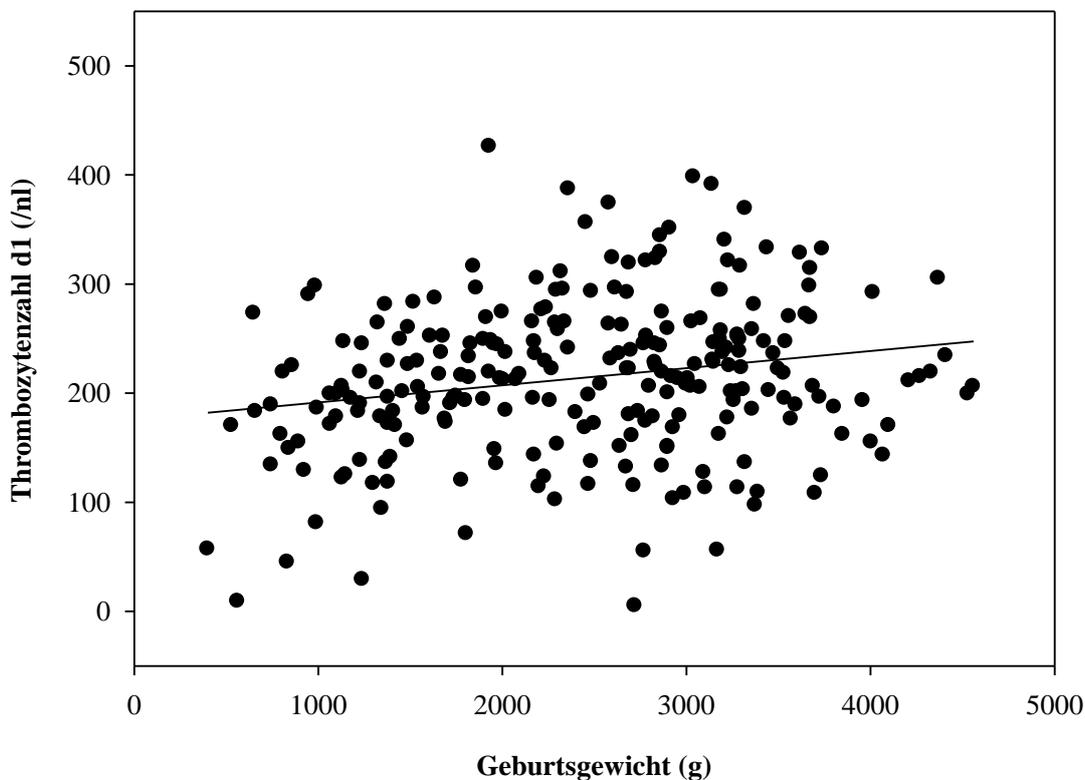
In der Thrombozytopenie-Gruppe hatten 60 % der Neugeborenen (93/156) ein Gestationsalter $< 37+0$ SSW; in der Kontrollgruppe lag der Anteil der Frühgeburtlichkeit bei 45 % (205 von 456).

Abb. 10. Thrombozytenzahlen am ersten Lebenstag in Relation zum Gestationsalter



Ergebnisse

Abb. 11. Thrombozytenzahlen am ersten Lebenstag in Relation zum Geburtsgewicht

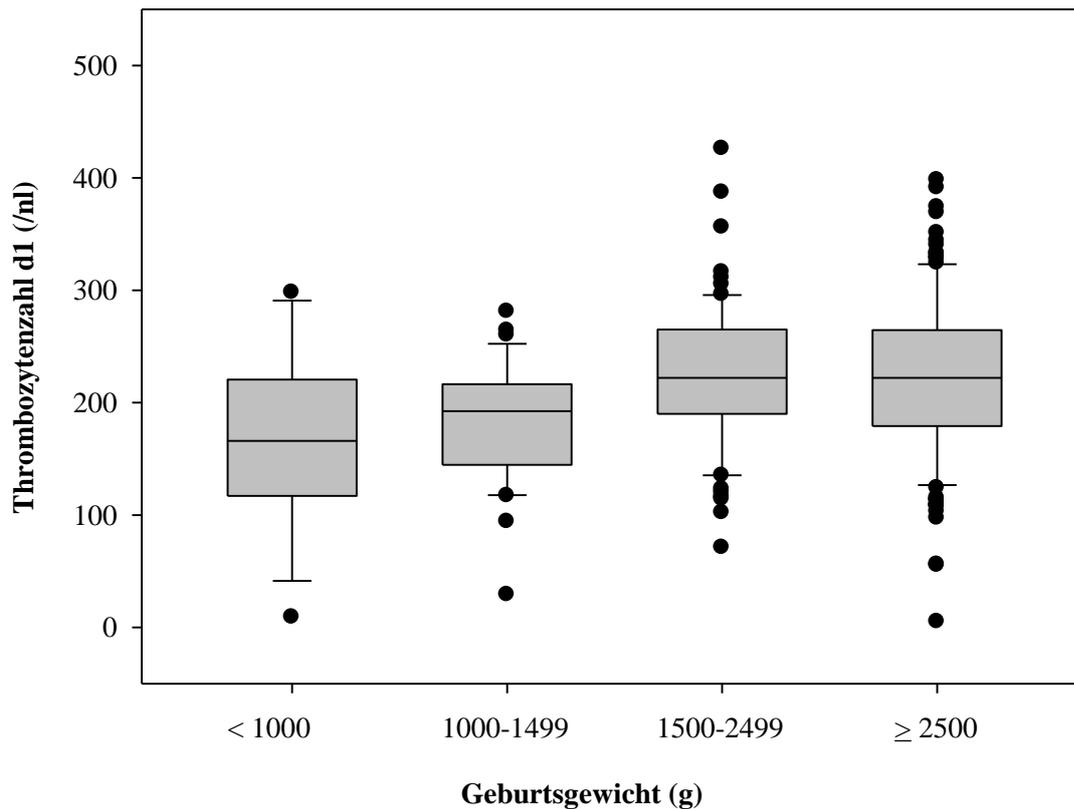


Nach Zuordnung der Früh- und Neugeborenen entsprechend ihres Geburtsgewichtes in die vordefinierten Gewichtsklassen (ELBW, VLBW, LBW sowie Gewicht ≥ 2500 g) ergaben sich in Bezug auf die Thrombozytenzahl am ersten Lebenstag signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe der ELBW- bzw. VLBW-Frühgeborenen und der Gruppe der LBW- bzw. der Früh- und Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht ≥ 2500 g (Student's t-Test; $p < 0,05$; Abbildung 12). ELBW- und VLBW-Frühgeborene differierten voneinander hinsichtlich der Thrombozytenzahl am ersten Lebenstag nicht signifikant ($p = 0,54$), ebenso wenig wie LBW und Früh- und Neugeborene mit einem Geburtsgewicht ≥ 2500 g voneinander ($p = 0,94$). Die 25. Perzentile der Thrombozytenzahl lag sowohl bei ELBW- als auch VLBW-Frühgeborenen $< 150/\text{nl}$, bei LBW- und Früh- und Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht ≥ 2500 g war sie am ersten Lebenstag $> 150/\text{nl}$. Von allen untersuchten Früh- und Neugeborenen gehörten 6 % (37/612) der ELBW-Gruppe an, 10,5 % (64/612) der VLBW-Gruppe. In der ELBW-Gruppe hatten 68 % der Frühgeborenen eine Thrombozytopenie (25/37). Bei den thrombozytopenen ELBW-Frühgeborenen fand sich eine durchschnittliche Thrombozytenzahl am ersten Lebenstag von

Ergebnisse

129/nl ($SD \pm 72$; $n = 25$). In der ELBW-Gruppe ohne Thrombozytopenie betrug die durchschnittliche Thrombozytenzahl am ersten Lebenstag 234/nl ($SD \pm 50$; $n = 12$). Im Gegensatz dazu hatte in der Gruppe der Früh- und Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht ≥ 2500 g nur ein Anteil von 19 % (67/352) eine Thrombozytopenie.

Abb. 12. Thrombozytenzahlen am ersten Lebenstag, klassifiziert nach vordefinierten Gewichtsklassen



Männliche Früh- und Neugeborene hatten am ersten Lebenstag häufiger (30/141; 21 %) eine Thrombozytopenie als weibliche (13/113; 12 %). Bei weiblichen Früh- und Neugeborenen war der mittlere Thrombozytenwert am ersten Lebenstag (230/nl, $SD \pm 71$, $n = 113$) signifikant höher ($p = 0,004$, Student's t-Test) als bei männlichen Früh- und Neugeborenen (203/nl, $SD \pm 72$, $n = 141$).

Ergebnisse

4.4 Thrombozytenwerte und die *Immature Platelet Fraction* im Verlauf der ersten Lebenswoche bei thrombozytopenen und nicht-thrombozytopenen Früh- und Neugeborenen

Tabelle VIII und IX zeigen für beide Untersuchungsgruppen die Thrombozyten- bzw. IPF%-Werte in der ersten Lebenswoche (Mittelwert \pm SD, Median, Minimum und Maximum).

Tabelle VIII. Analyse der Thrombozytenzahlen in der ersten Lebenswoche bei thrombozytopenen und nicht-thrombozytopenen Früh- und Neugeborenen

Lebenstag	1	2	3	4	5	6	7	
Thrombozytopenie-Gruppe								gesamt
Anzahl der Thrombozytenzählungen	78	112	100	70	56	50	35	501
Mittelwert \pm SD (/nl) der Thrombozytenzahl	151 \pm 63	141 \pm 58	129 \pm 63	115 \pm 54	112 \pm 60	120 \pm 72	151 \pm 98	
Median (/nl)	141	133	131	115	107	116	131	
Minimum (/nl)	5	5	5	18	24	27	33	
Maximum (/nl)	319	299	358	383	320	415	428	
Kontrollgruppe								gesamt
Anzahl der Thrombozytenzählungen	176	256	175	71	68	55	37	838
Mittelwert \pm SD (/nl) der Thrombozytenzahl	241 \pm 54	240 \pm 55	244 \pm 57	248 \pm 57	255 \pm 62	275 \pm 71	308 \pm 79	
Median (/nl)	233	231	236	240	244	272	289	
Minimum (/nl)	151	150	150	150	159	162	151	
Maximum (/nl)	426	424	411	389	442	435	450	

Ergebnisse

Tabelle IX. Analyse der IPF%-Werte in der ersten Lebenswoche bei thrombozytopenen und nicht-thrombozytopenen Früh- und Neugeborenen

Lebenstag	1	2	3	4	5	6	7	
Thrombozytopenie-Gruppe								gesamt
Anzahl der IPF%-Werte	41	90	73	53	44	32	22	355
Mittelwert \pm SD der IPF%-Werte	8,7 \pm 9,3	7,4 \pm 4,8	8,6 \pm 5,4	9,3 \pm 6,2	10,6 \pm 6,3	10,9 \pm 5,4	11,8 \pm 9,3	
Median	7,3	6,1	7,4	8,0	8,7	10,6	8,8	
Minimum	2,2	1,9	2,3	0,8	3,5	2,6	3,0	
Maximum	61	25,9	29,9	32,6	28,3	24,8	44,2	
Kontrollgruppe								gesamt
Anzahl der IPF%-Werte	121	233	153	60	54	43	26	690
Mittelwert \pm SD der IPF%-Werte	4,5 \pm 1,8	4,4 \pm 1,9	4,0 \pm 1,8	4,5 \pm 1,5	4,8 \pm 2,4	4,7 \pm 2,0	5,6 \pm 3,1	
Median	4,2	4,1	3,7	4,4	4,1	4,7	5,3	
Minimum	0,7	1,2	1,2	1,8	1,5	1,6	2,2	
Maximum	11	13,1	13,3	9,2	11,8	11	14,5	

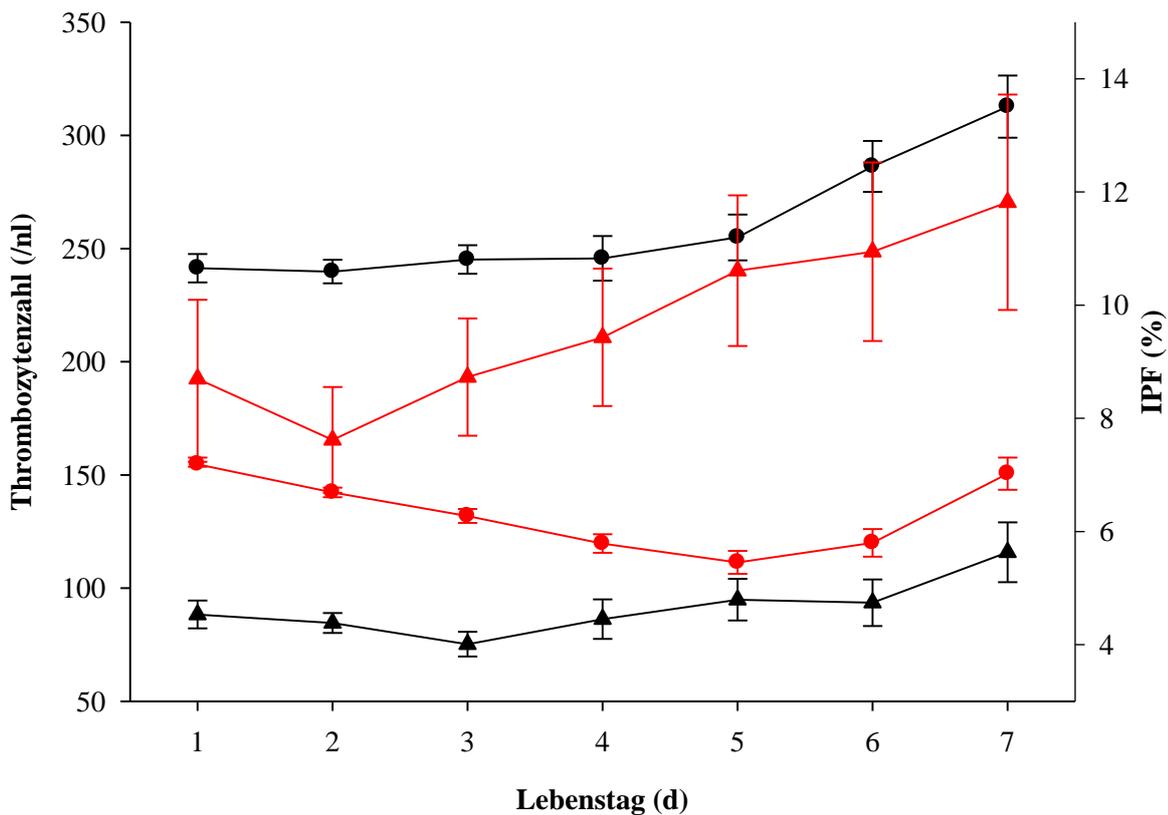
Abbildung 13 gibt den Verlauf der Thrombozyten- und IPF%-Mittelwerte in der ersten Lebenswoche getrennt nach Thrombozytopenie- und Kontrollgruppe wieder. Im Rahmen der graphischen Darstellung wurden hierbei die Mittelwerte mit dem SEM angegeben. Bei den thrombozytopenen Früh- und Neugeborenen lässt sich insgesamt ein Abfall der Thrombozyten-Mittelwerte beschreiben mit nachfolgendem Anstieg ab dem fünften Lebenstag. In der Kontrollgruppe bleiben die Thrombozyten-Mittelwerte in den ersten drei Lebenstagen zunächst relativ konstant, bevor es zum Ende der Woche zu einem leichten Anstieg kommt.

Früh- und Neugeborene mit normaler Thrombozytenzahl hatten eine IPF% von 4,1 % (Median) bei einem 95%-Konfidenzintervall von 0,7-7,9 % (Range 0,7 %-14,5 %). Für thrombozytopenen

Ergebnisse

Früh- und Neugeborene lag der IPF%-Wert für die erste Lebenswoche bei 7,6 % (Median, Range 0,8 %-61 %). Ebenso zeigten sich für jeden einzelnen Tag der ersten Lebenswoche signifikante Unterschiede (Mann-Whitney Rank Sum Test, $p < 0,001$) zwischen den IPF%-Werten der thrombozytopenen Früh- und Neugeborenen gegenüber der Kontrollgruppe. Die IPF%-Mittelwerte der thrombozytopenen Früh- und Neugeborenen fielen von Lebenstag 1 zu Lebenstag 2 ab. Ab dem dritten Tag ging der Anstieg der IPF% einer Normalisierung der Thrombozytenzahlen an den Folgetagen voraus (Abbildung 13). In der Kontrollgruppe veränderten sich die IPF%-Werte im Verlauf der ersten Lebenswoche kaum. Zum Ende der ersten Lebenswoche stiegen die IPF%-Werte parallel zu den Thrombozytenzahlen leicht an.

Abb. 13. Verlauf der Thrombozyten (Kreis)- und IPF% (Dreieck)-Mittelwerte (\pm SEM) in der ersten Lebenswoche bei thrombozytopenen (rot) und nicht-thrombozytopenen (schwarz) Früh- und Neugeborenen



Ergebnisse

In Abhängigkeit vom Schweregrad der Thrombozytopenie stieg die IPF% signifikant an (Mann-Whitney Rank Sum Test, $p < 0,001$; Abbildung 14). In der Thrombozytopenie-Gruppe lagen 355 IPF%-Werte vor. Zum Zeitpunkt des Auftretens einer Thrombozytopenie konnten 255 IPF%-Werte den unterschiedlichen Schweregraden der Thrombozytopenie zugeordnet werden. Bei einer leichten Thrombozytopenie ($n = 140$) betrug der IPF%-Wert im Median 7,4 % (Range 2,6 %-25,9 %). Bei moderater Thrombozytopenie ($n = 82$) wurde ein medianer IPF%-Wert von 10,2 % (Range 4,2 %-32,6 %) errechnet. Für Thrombozytenwerte $< 50/\text{nl}$ ($n = 33$) wurde ein medianer IPF%-Wert von 13,5 % ermittelt (Range 6,5 %-61 %), der 3-fach höher war als bei Früh- und Neugeborenen ohne Thrombozytopenie (4,1 %).

Abb. 14. IPF% in Relation zum Schweregrad der Thrombozytopenie

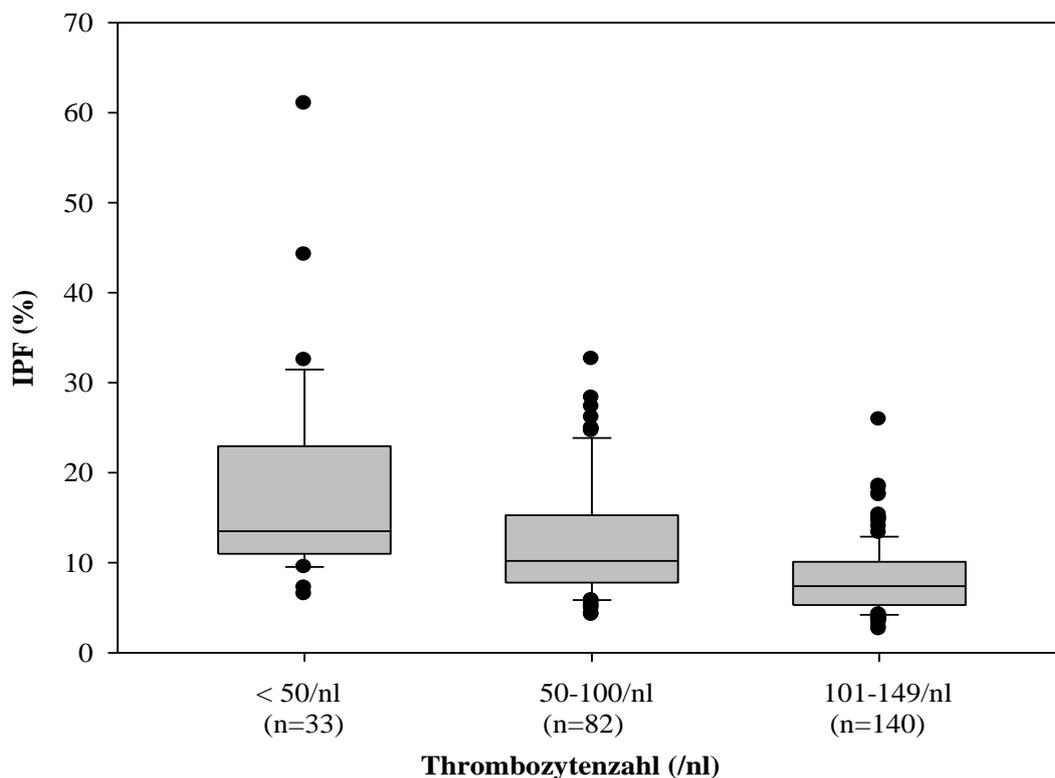
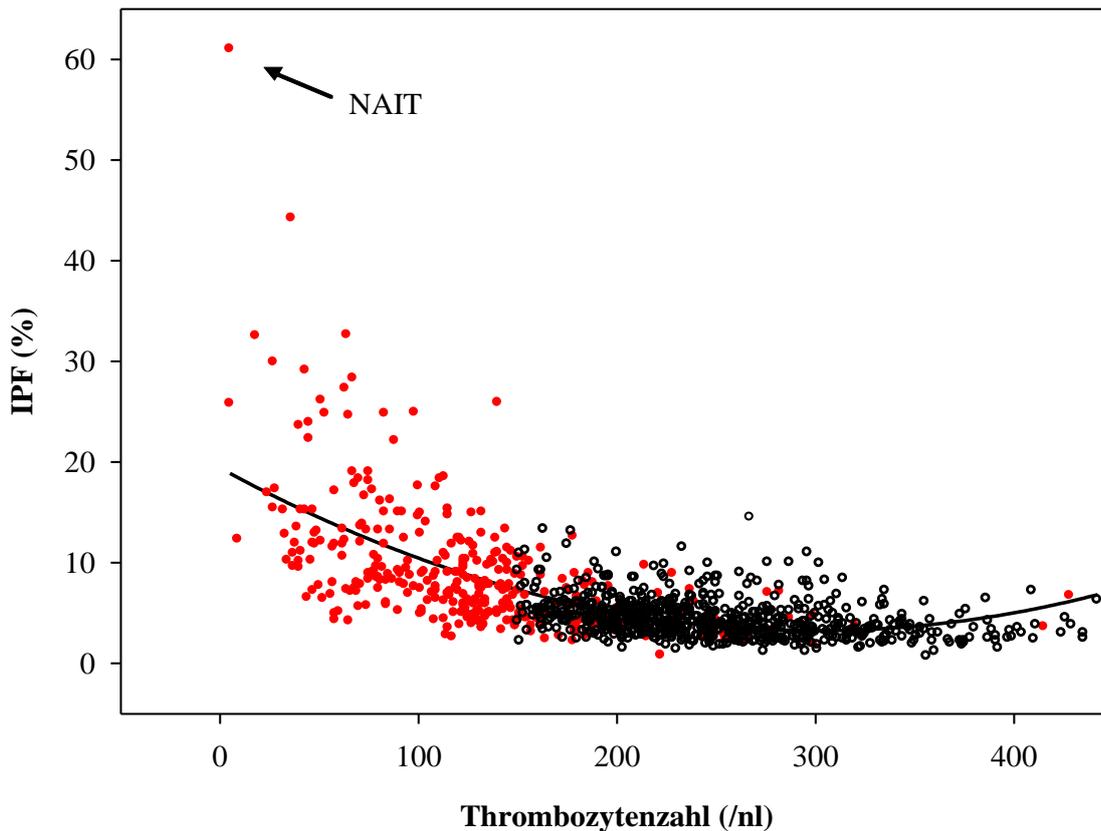


Abbildung 15 zeigt die Verteilung aller Thrombozyten-IPF%-Wertepaare ($n = 1045$) während der ersten Lebenswoche getrennt nach Thrombozytopenie- und Kontrollgruppe ($r = 0,47$; jeweils $p < 0,001$). Besonders auffällig ist der hohe IPF%-Wert von 61 % mit einem dazugehörigen

Ergebnisse

Thrombozytenwert von 5/nl bei Vorliegen der Diagnose einer neonatalen Alloimmunthrombozytopenie (Pfeil).

Abb. 15. Regressionsanalyse von IPF% und Thrombozytenzahl aller Früh- und Neugeborenen (n = 1045 Blutbildanalysen); Thrombozytopenie-Gruppe (rot), Kontrollgruppe (schwarz)
Der IPF%-Wert bei einem Neugeborenen mit schwerer NAIT ist markiert (↖).

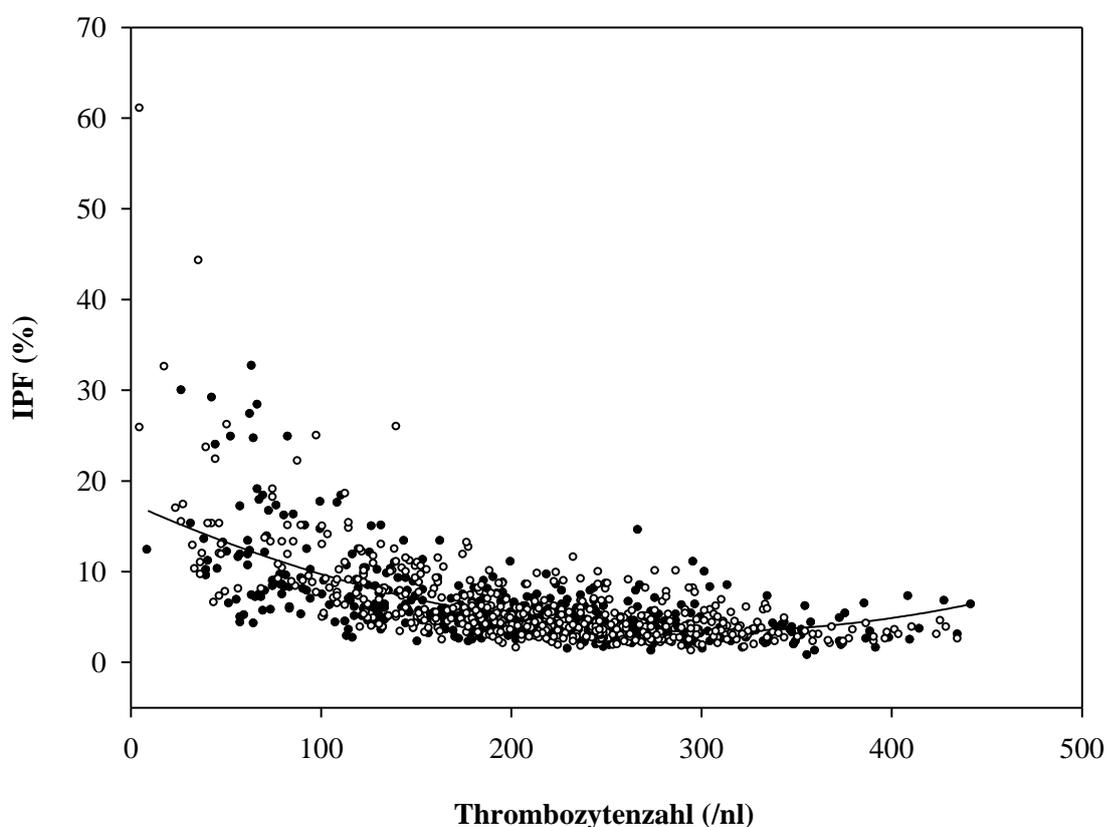


In Abbildung 16 wurden IPF%-Thrombozyten-Wertepaare unter Berücksichtigung des Gestationsalters (*preterm versus term*) dargestellt ($r = 0,33$; $p < 0,001$). In den beiden Gruppen zeigten sich signifikante Unterschiede bezüglich der Thrombozytenzahlen (Median von 195/nl der *preterm* Neugeborenen $< 37+0$ SSW; Median von 222/nl der *term* Neugeborenen $\geq 37+0$ SSW; Mann-Whitney Rank Sum Test, $p < 0,001$), für die IPF%-Werte konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden (Median von 5 % der *preterm* Neugeborenen $< 37+0$ SSW; Median von 4,6 % der *term* Neugeborenen $\geq 37+0$ SSW; Mann-Whitney Rank Sum Test, $p = 0,235$).

Ergebnisse

Bei Betrachtung der Gruppe der *preterm* sowie *term* Neugeborenen zeigten sich signifikante Unterschiede der IPF%-Werte (Mann-Whitney Rank Sum Test, $p < 0,05$) zwischen der Kontroll- und Thrombozytopenie-Gruppe (*preterm*: Median 4,2 % in der Kontrollgruppe versus 6,9 % in der Thrombozytopenie-Gruppe; *term*: Median 3,9 % in der Kontrollgruppe versus 8,7 % in der Thrombozytopenie-Gruppe).

Abb. 16. Regressionsanalyse von IPF% und Thrombozytenzahl aller Neugeborenen (n = 1045 Blutbildanalysen) in Abhängigkeit vom Gestationsalter; *preterm* Neugeborene (schwarz), *term* Neugeborene (weiß)



Zur Vervollständigung der Analyse wurden neben den prozentualen IPF-Werten auch die IPF-Absolutzahlen (Tabelle X) ermittelt ($\text{IPFabsolut} = \text{Thrombozytenzahl} \times \text{IPF\%}$). Der Mittelwert in der Kontrollgruppe war für den dritten bis fünften Lebenstag signifikant höher als in der Thrombozytopenie-Gruppe.

Früh- und Neugeborene mit schwerer Thrombozytopenie (n = 33) hatten unabhängig von der Betrachtung der einzelnen Lebenstage signifikant geringere IPF-Absolutwerte im Vergleich zur

Ergebnisse

Kontrollgruppe (Median 4,8/nl, Range 1,1/nl-15,9/nl, *versus* Median 9,8/nl, Range 2,5/nl-38,7/nl; Mann-Whitney Rank Sum Test, $p < 0,001$).

Beim Vergleich der IPF-Absolutwerte zwischen *preterm* und *term* Neugeborenen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (9,5/nl, Range 1,1/nl-38,7/nl, *versus* 9,5/nl, Range 1,3/nl-36,3/nl; Mann-Whitney Rank Sum Test, $p = 0,195$).

Tabelle X. IPF-Absolutwerte in der ersten Lebenswoche bei thrombozytopenen und nicht-thrombozytopenen Früh- und Neugeborenen

Lebenstag	1	2	3	4	5	6	7	
Thrombozytopenie-Gruppe								gesamt
Anzahl der IPF-Absolutwerte	41	90	73	53	44	32	22	355
Mittelwert der IPF-Absolutwerte (/nl) ± SD	10,1 ± 4,9	9,7 ± 5,1	8,4 ± 3,4	8,9 ± 4,4	9,0 ± 4,0	10,9 ± 5,0	12,6 ± 6,3	
Median (/nl)	8,6	8,4	7,6	7,6	8,4	10,7	12,6	
Minimum (/nl)	1,1	2,5	1,3	1,8	2,9	3,0	4,2	
Maximum (/nl)	22,4	36,3	19,1	20,9	19,0	20,6	28,7	
Kontrollgruppe								gesamt
Anzahl der IPF-Absolutwerte	121	233	153	60	54	43	26	690
Mittelwert der IPF-Absolutwerte (/nl) ± SD	10,9 ± 4,1	10,1 ± 3,9	9,4 ± 3,7	10,7 ± 3,9	12,0 ± 5,9	12,4 ± 5,0	16,4 ± 8,9	
Median (/nl)	10,4	9,4	8,6	10,0	10,2	10,3	13,4	
Minimum (/nl)	2,5	3,3	3,2	4,6	3,0	6,2	5,7	
Maximum (/nl)	25	27,6	21,7	24,7	27,8	32,6	38,7	

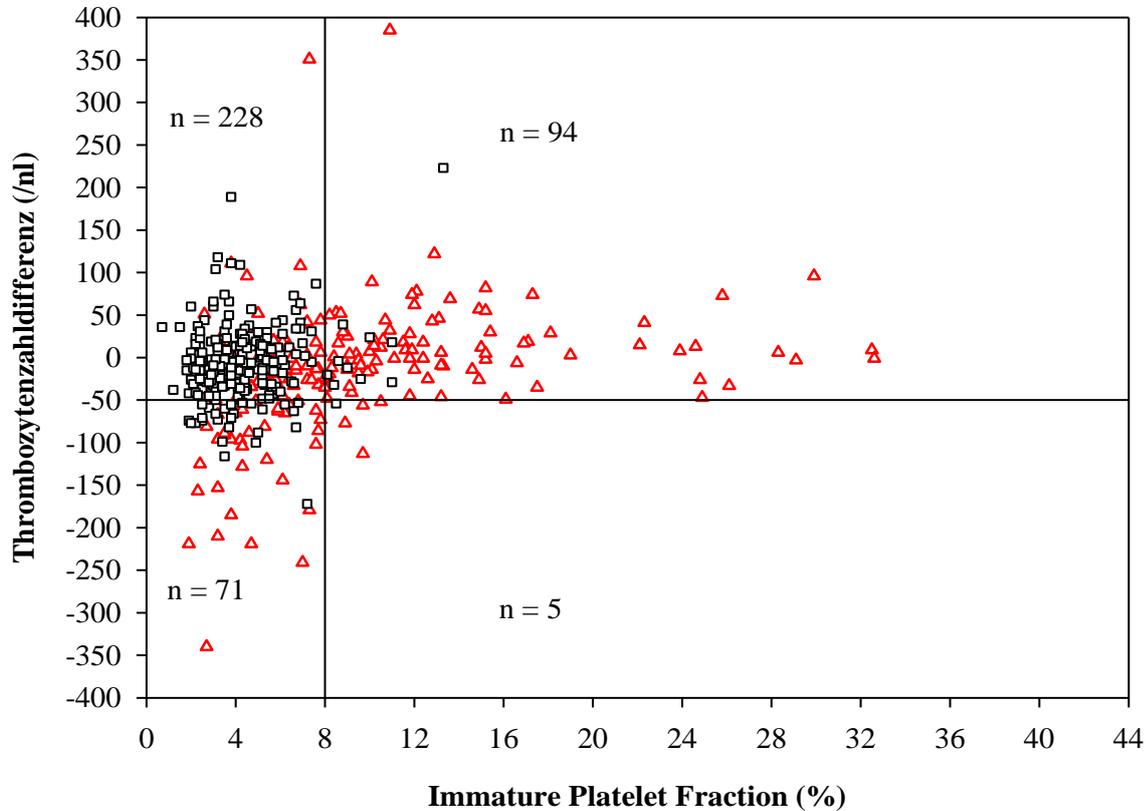
4.5 Die *Immature Platelet Fraction* zur Prädiktion eines Sturzes der Thrombozytenzahl > 50/nl am Folgetag

Abschließend wurde die Frage gestellt, ob der IPF%-Wert ein geeigneter prädiktiver Marker für einen Absturz der Thrombozytenzahl um > 50/nl in einem Zeitintervall von zwei aufeinanderfolgenden Tagen innerhalb der ersten Lebenswoche ist. Von jeweils zwei aufeinanderfolgenden Tagen der ersten Lebenswoche wurde die Differenz der Thrombozytenzahl errechnet und diese korrespondierend zum IPF%-Wert des vorangegangenen Tages aufgetragen. Ein weiterer Grenzwert wurde bei einem IPF%-Wert von 8 % festgelegt, da dieser außerhalb des 95%-Konfidenzintervalls für den ermittelten IPF%-Normwert der Kontrollgruppe (7,9 %) liegt. Anhand der Grenzwerte für das Ausmaß eines Sturzes der Thrombozytenzahl und der IPF% ergibt sich ein Streudiagramm mit vier Quadranten (Abbildung 17).

Im linken oberen Quadranten findet sich die Untergruppe der Früh- und Neugeborenen (n = 228), bei denen es zu keinem Abfall der Thrombozytenzahl > 50/nl kam und deren IPF%-Werte im Normbereich lagen. Der rechte obere Quadrant der Abbildung spiegelt die Untergruppe wider (n = 94), die ebenso keinen kritischen Abfall der Thrombozytenzahlen aufwies, deren IPF%-Werte jedoch ≥ 8 % betrug. Im linken unteren Quadranten befinden sich die Daten der Früh- und Neugeborenen (n = 71), die eine Thrombozytenzahldifferenz > 50/nl an zwei aufeinanderfolgenden Tagen hatten und niedrige IPF%-Werte (< 8 %) aufwiesen. Somit ergibt sich, dass es in 71 von 299 Fällen (24 %) zu einem Abfall der Thrombozytenzahl kam, wenn die IPF < 8 % war. Der rechte untere Quadrant zeigt die Neugeborenen (n = 5) auf, bei denen es trotz einer erhöhten *Immature Platelet Fraction* mit Werten ≥ 8 % zu einem Abfall der Thrombozytenzahl > 50/nl kam. Daraus ergibt sich, dass sich in nur 5 % der Fälle (5 von 99) trotz des Vorliegens einer IPF% ≥ 8 % ein Sturz der Thrombozytenzahl > 50/nl ereignete.

Ergebnisse

Abb. 17. Analyse der prädiktiven Funktion der IPF für einen Thrombozytensturz > 50/nl innerhalb von 24 Stunden bei Früh- und Neugeborenen; Kontrollgruppe (schwarz) n = 224; Thrombozytopenie-Gruppe (rot) n = 185



Mittels der Vierfeldertafel, die sich aus den vier Gruppen in Abhängigkeit von der Differenz der Thrombozytenzahl und zugehörigem IPF%-Wert ergibt, konnte gezeigt werden, dass die Fälle unterschiedlich verteilt waren (Chi-Quadrat-Test, $p = 0,002$). Ferner wurde anhand der Zahlen ermittelt, dass Früh- und Neugeborene mit IPF%-Werten < 8 % ein 4,7-fach erhöhtes relatives Risiko (RR) für eine Verminderung der Thrombozytenzahl von > 50/nl am Folgetag haben (95%-Konfidenzintervall 1,9-11,8).

$$RR = \frac{71/(71 + 228)}{5/(5 + 94)} = 4,7$$

5 Diskussion

Die zügige und verlässliche Beurteilung der Aktivität der Megakaryopoese und Thrombozytopoese ist für das optimale Management der Thrombozytopenie erstrebenswert, um einerseits die Blutungsrisiken zu minimieren und andererseits Transfusionen und assoziierte Komplikationen zu vermeiden. Diese Ziele können durch die technischen Innovationen der automatisierten Analysensysteme, die zu einer erweiterten Analytik geführt haben, zunehmend realisiert werden. Die Messung retikulierter Thrombozyten im Blut dient der schnellen Einschätzung der Megakaryozytenproduktionsrate im Knochenmark oder der fetalen/neonatalen Leber. Die Etablierung zuverlässiger Referenzwerte ist daher essentiell. Die präzise Bestimmung der Thrombozytenzahl bzw. IPF wird ermöglicht durch zwei voneinander unabhängige Messmethoden im Sysmex XE-2100 Analysengerät. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch die IPF-Messung eine schnelle Beurteilung der Bildungsrate der Thrombozyten bei einer neonatalen Thrombozytopenie möglich ist und deren Verlauf eingeschätzt werden kann.

Die vorliegende Arbeit war zum Zeitpunkt der Publikation der Originaldaten die erste Studie, die mit standardisierter Messtechnik die unreife Thrombozytenfraktion - IPF - bei Früh- und Neugeborenen untersucht hat.⁸⁰ Untersuchungen zu retikulierten, frühen Thrombozytenformen wurden bislang mit einer anderen Methodik durchgeführt und nutzten die Angabe von RP%. Christensen *et al.* bezogen in ihre Untersuchung 284 Neugeborene ein,²¹ Peterec *et al.* 89.⁸¹ Saxonhouse *et al.* ermittelten RP-Normwerte anhand der Blutbildanalysen von zehn gesunden Erwachsenen,⁸² Abe *et al.* erforschten diese bei 129 gesunden Erwachsenen.⁸³ Dies zeigt, dass bisherige Untersuchungen deutlich geringere Stichprobengrößen hatten als in der vorliegenden Arbeit, die 612 Früh- und Neugeborene untersuchte.

5.1 Häufigkeit der neonatalen Thrombozytopenie

Bei 26 % der untersuchten Früh- und Neugeborenen der neonatologischen Intensiv- und Intensivüberwachungsstationen lag in der ersten Lebenswoche eine Thrombozytopenie vor. Die Inzidenz der Thrombozytopenie am ersten Lebenstag betrug damit 17 % (43/254). Diese Inzidenz ist kongruent mit der in der Literatur beschriebenen Häufigkeit von 22-35 %, ^{31, 32} die somit deutlich höher ist als bei Neugeborenen, die nicht auf einer Intensivstation behandelt werden (0,9-2 %).^{23, 24} Thrombozytenzahlen < 100/nl werden in der Literatur bei 12 % der Neugeborenen einer neonatologischen Intensivstation beschrieben (n = 807).³² In der eigenen

Diskussion

Untersuchungspopulation konnte gezeigt werden, dass 11 % der 612 Früh- und Neugeborenen Thrombozytenwerte $\leq 100/\text{nl}$ hatten, was unwesentlich von den Angaben von Castle *et al.* abweicht. Für eine schwere Thrombozytopenie ermittelten Baer *et al.* eine Inzidenz von 2,4 % für Neugeborene der neonatologischen Intensivstation, wobei aber nur die Neugeborenen eingeschlossen wurden, die während ihres Aufenthaltes ≥ 2 Thrombozytenwerte $< 50/\text{nl}$ aufwiesen (Gesamtpopulation $n = 11281$).⁸⁴ In der eigenen Untersuchungspopulation waren 4 von 254 Patienten (2 %), von denen am Tag der Geburt ein Blutbild vorhanden war, von einer schweren Thrombozytopenie betroffen. Die eigene Untersuchungspopulation ist somit für die Fragestellungen repräsentativ.

Von allen untersuchten Früh- und Neugeborenen entwickelten 21 % innerhalb der ersten drei Lebenstage eine Thrombozytopenie (*early-onset*). Dies stellt nach den Kriterien des Zeitpunkts des erstmaligen Auftretens der Thrombozytopenie die größte Gruppe der thrombozytopenen Früh- und Neugeborenen dar. In der Studie von Christensen *et al.* wurden 58 % der Thrombozytopenien der ELBW-Frühgeborenen einer neonatologischen Intensivstation innerhalb der ersten drei Tage nach Geburt detektiert. Davon zeigten 23 % eine milde Ausprägung und 38 % schwere Verläufe mit Werten $< 50/\text{nl}$.²¹ Wie erwartet ist die *early-onset* Thrombozytopenie insbesondere bei ELBW-Frühgeborenen vorzufinden. In der Literatur wird beschrieben, dass sich *early-onset* Thrombozytopenien im Allgemeinen als mild präsentieren.^{34, 85} In der vorliegenden Arbeit bestätigt sich dies, da bei der Auswertung der Blutbildanalysen der ersten drei Lebenstage bei 63 % der Thrombozytenzahlen $< 150/\text{nl}$ Werte von 100-150/nl vorlagen. Das Geburtsgewicht ist ebenfalls mit einem Risiko für eine Thrombozytopenie am Tag der Geburt assoziiert. Es fand sich eine positive Korrelation zwischen Thrombozytenzahl und Geburtsgewicht: die Thrombozytenzahl des ersten Lebenstages der untersuchten Früh- und Neugeborenen lag mit zunehmendem Geburtsgewicht signifikant höher ($p < 0,001$). Vor allem ELBW- und VLBW-Frühgeborene hatten dabei deutlich niedrigere durchschnittliche Thrombozytenzahlen (Abbildung 12). Beiner *et al.* fanden in ihrer Untersuchung ebenfalls ein signifikant niedrigeres Geburtsgewicht bei thrombozytopenen Früh- und Neugeborenen (1208 g *versus* 1597 g, $p = 0,0001$).⁸⁶ Baer *et al.* beschrieben, dass Patienten mit einem Geburtsgewicht < 1000 g eine 10-fach erhöhte Prävalenz für eine schwere Thrombozytopenie im Vergleich zu Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht > 2000 g hatten.⁸⁴ In der eigenen Untersuchungspopulation waren 68 % der ELBW-Frühgeborenen thrombozytopen. Dieses Ergebnis ist kongruent mit den Resultaten von Christensen *et al.*, die bei 70 % der ELBW-

Diskussion

Frühgeborenen eine Thrombozytopenie feststellten.²¹ In der eigenen Arbeit hatten thrombozytopen ELBW-Frühgeborene im Vergleich zu ELBW-Frühgeborenen der Kontrollgruppe eine deutlich niedrigere Thrombozytenzahl am ersten Lebenstag (129/nl *versus* 234/nl), wobei sowohl bei ELBW- als auch VLBW-Frühgeborenen die 25. Perzentile für die Thrombozytenzahl < 150/nl war.

Bonifacio *et al.* beschrieben in ihrer Untersuchungsgruppe von 94 thrombozytopenen Frühgeborenen und 70 nicht-thrombozytopenen Frühgeborenen, dass zwei Drittel der Thrombozytopenien im Alter von > 72 Stunden diagnostiziert wurden. Davon wiesen 51 % eine schwere Thrombozytopenie (< 50/nl) auf.¹⁹ Es ist zu vermuten, dass das niedrige Gestationsalter des Patientenkollektivs (≤ 32 SSW) dabei relevant ist. Es zeigte sich, dass das Gestationsalter der Frühgeborenen mit moderater und schwerer Thrombozytopenie signifikant geringer war.¹⁹ In der eigenen Untersuchungspopulation lag das Gestationsalter der thrombozytopenen Patienten mit im Median 35+1 SSW höher, und es konnte gezeigt werden, dass mit einem geringeren Gestationsalter eine höhere Inzidenz der Thrombozytopenie assoziiert war (Abbildung 10). Auch der Befund, dass in der Thrombozytopenie-Gruppe 60 % der Patienten ein Gestationsalter < 37+0 SSW hatten und in der Kontrollgruppe nur 45 % verdeutlicht diese Assoziation. Andere Arbeitsgruppen, beispielsweise von Van den Hof *et al.*²² oder Beiner *et al.*, kamen in ihrer Untersuchung auch zu dem Ergebnis, dass thrombozytopen Frühgeborene im Vergleich mit einer nicht-thrombozytopenen Gruppe ein signifikant niedrigeres Gestationsalter (30+5 SSW *versus* 31+6 SSW, $p = 0,002$) hatten,⁸⁶ woraus eine Assoziation der Thrombozytopenie mit der Frühgeburtlichkeit gefolgert werden kann. Die Studie von Bonifacio *et al.* schließt ausschließlich Frühgeborene ≤ 32 SSW ein, welche häufiger eine schwere Thrombozytopenie präsentieren. Hierbei kommen Thrombozytopenien mit moderater und schwerer Ausprägung häufiger bei *late-onset* Thrombozytopenien vor. Dies mag der entscheidende Unterschied zur eigenen Patientengruppe zu sein, in der die Thrombozytopenien überwiegend erstmalig im Alter von < 72 Stunden auftrat, während bei Bonifacio *et al.* zwei Drittel der Thrombozytopenien im Alter von > 72 Stunden diagnostiziert wurden.

Als Erklärung für die höhere Inzidenz der Thrombozytopenie bei Neugeborenen mit intrauteriner Wachstumsrestriktion/- verzögerung werden eine exzessive Stressreaktion der Erythropoese, eine fetale Verbrauchskoagulopathie, Destruktion von Thrombozyten sowie ein Ungleichgewicht von Thromboxan A₂, welches zu einer plazentaren Gefäßkonstriktion und Thrombozytenaggregation führt, angeführt.⁸⁷

Früh- und Neugeborene mit Thrombozytenzahlen $< 50/\text{nl}$ fanden sich in der eigenen Studienpopulation wie auch in der Studie von Bonifacio *et al.* häufiger bei *late-onset* Thrombozytopenien (Abbildung 9). Dies wird dadurch erklärt, dass die *late-onset* Thrombozytopenie meist eine Folge von Sepsis oder NEC ist und einen protrahierten Verlauf hat.^{43, 48}

Der Einfluss des Geschlechts des Neugeborenen auf die Thrombozytenzahl wird in der Literatur kontrovers beschrieben. Wie in der Studie von Wasiluk *et al.*⁸⁸ konnte auch in der eigenen Arbeit eine signifikant höhere Thrombozytenzahl bei weiblichen Früh- und Neugeborenen nachgewiesen werden. In der Thrombozytopenie-Gruppe waren deutlich mehr männliche Früh- und Neugeborene zu finden (63 %). Hinsichtlich der Studie von Wasiluk *et al.* muss die geringe Fallzahl (33 weibliche *versus* 39 männliche, gesunde, reife Neugeborene) kritisch angemerkt werden.

5.2 Die inverse Korrelation zwischen Thrombozytenzahl und der *Immature Platelet Fraction*

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass wie bei Kindern und Erwachsenen⁸³ auch bei Früh- und Neugeborenen eine inverse Korrelation zwischen Thrombozytenzahl und IPF% besteht. Als ein wesentliches Ziel konnten IPF%-Referenzwerte für Früh- und Neugeborene etabliert werden. Der für nicht-thrombozytopenie Früh- und Neugeborene ermittelte IPF%-Wert von 4,1 % (Range 0,7 %-14,5 %) ist höher als der von älteren Kindern (2,7 % (SD \pm 1,3))⁸⁹ oder Erwachsenen (3,4 %).⁷⁰ Dies könnte mit einer erhöhten Thrombozytenproduktionsrate bei Früh- und Neugeborenen erklärt werden, die aufgrund des schnelleren Wachstums notwendig ist. Um eine normale Thrombozytenzahl aufrecht zu erhalten, kommt es zu einer relativ höheren IPF%-Rate.²⁰ Die höhere Aktivität der Megakaryopoese im Knochenmark bzw. der fetalen/neonatalen Leber steht auch in Einklang mit den im Vergleich zu älteren Kindern höheren zirkulierenden Thrombopoietin-Konzentrationen bei Früh- und Neugeborenen.³³ Liu *et al.* zeigten in ihrer Arbeit, dass Neugeborene zwar kleinere Megakaryozyten mit einer geringeren Ploidie als Erwachsene besitzen, diese jedoch reifer sind als adulte Megakaryozyten mit gleicher Ploidie. Megakaryozytäre Vorläuferzellen werden bei Neugeborenen mit einer 10-fach höheren Rate produziert als im adulten Körper. Diese Mechanismen werden auf eine Hochregulierung der Signaltransduktion *downstream* des Thrombopoietin-Rezeptors c-MPL zurückgeführt. Dieses

Diskussion

Phänomen wird dem mTOR Signalweg und der höheren Aktivität des Transkriptionsfaktors GATA-1 zugeschrieben. Es wird spekuliert, dass Neugeborene dadurch fähig sind, das sich entwickelnde Knochenmark und ihr Blutvolumen weiter auszubauen und dabei eine normale Thrombozytenzahl aufrecht erhalten.⁹⁰

Zu dem in dieser Arbeit ermittelten IPF%-Normwert von 4,1 % (Median) der Kontrollgruppe muss kritisch angemerkt werden, dass ausschließlich Früh- und Neugeborene der neonatologischen Intensiv- und Intensivüberwachungsstationen untersucht wurden. Die Patienten der Kontrollgruppe wiesen keine Thrombozytopenie auf, hatten aber andere Erkrankungen, die eine Intensivpflege erforderlich machten. Frühgeborene machten einen Anteil von 49 % der untersuchten Patienten aus. In früheren Arbeiten zu retikulierten Thrombozyten wurden *a priori* Patienten ausgeschlossen, die an einer Sepsis, DIC, Asphyxie, maternalen immunologischen Erkrankung, SIH oder genetischen Syndromen litten bzw. bei denen eine Medikamenteneinnahme als mögliche Ursache der Thrombozytopenie anamnestisch bekannt war.⁸¹ Auch Briggs *et al.* nahmen an, dass das Vorliegen einer schweren Infektion die Studienergebnisse beeinflusst. Zytokine (vor allem IL-6), welche unter septischen Bedingungen ausgeschüttet werden, stimulieren über die THPO-Expression oder triggern andere indirekte Mechanismen, welche die Aktivität der Megakaryopoese stimulieren und zu einem IPF%-Anstieg führen können, obwohl zumindest initial aufgrund eines vermehrten Thrombozytenverbrauchs eine Stabilisierung der Thrombozytenzahlen nicht erkennbar ist.^{91, 92}

Der IPF%-Wert für thrombozytopenie Früh- und Neugeborene beträgt 7,6 % (Median). Aufgrund einer unterschiedlichen Pathophysiologie der Thrombozytopenien könnte die im Vergleich zur Kontrollgruppe größere Streuung der IPF%-Werte zustande kommen (Abbildung 13). Bei einer Thrombozytopenie aufgrund einer Knochenmarkinsuffizienz bzw. einer erniedrigten Megakaryopoese liegen normale oder erniedrigte IPF%-Werte vor, wohingegen bei einer peripheren Ursache der Thrombozytopenie (Verbrauch, Destruktion) erhöhte IPF%-Werte vorzufinden sind.⁸² Anhand dieser Tatsache lässt sich für die in dieser Arbeit untersuchten thrombozytopenen Früh- und Neugeborenen schlussfolgern, dass mehrheitlich eine periphere Ursache der Thrombozytopenie vorliegt. Briggs *et al.* stellten in ihren Untersuchungen fest, dass bei RP%-Werten $> 8\%$ ein erhöhter peripherer Thrombozytenverbrauch als Ursache der Thrombozytopenie sehr wahrscheinlich ist.⁷⁰

Diskussion

Die Absolutwerte für retikulierte Thrombozyten können der weiteren Differenzierung von unterschiedlichen Pathomechanismen dienen. Anhand der Absolutwerte können Früh- und Neugeborene identifiziert werden, die auf einen erhöhten peripheren Thrombozytenverbrauch nicht mit einer adäquat gesteigerten Produktionsrate von megakaryozytären Vorläuferzellen bzw. Thrombozyten reagieren.⁸⁰ IPF-Absolutwerte sind unabhängig von der Thrombozytenzahl und erlauben eine genauere Aussage zur Aktivität der Megakaryopoese im Knochenmark bzw. in der Leber des Neugeborenen. Bei der Auswertung der IPF%-Werte sollten deswegen stets die Thrombozytenzahl gemeinsam mit der IPF% betrachtet werden. Liegen IPF%-Werte im Referenzbereich, obwohl eine schwere Thrombozytopenie zu verzeichnen ist, so kann dies nicht als adäquate Kompensation angesehen werden. Um den Verlauf während der ersten Lebenswoche der Neugeborenen zu verfolgen, ist die Angabe in IPF% jedoch eine geeignete und anerkannte Messgröße.

Die eigenen Untersuchungen zeigen, dass bei schwerer Thrombozytopenie signifikant niedrigere absolute IPF-Werte als in der Kontrollgruppe vorliegen (Median von 4,8/nl *versus* 9,8/nl; $p < 0,001$). In diesem Fall geht man von einer Thrombozytenproduktionsstörung im Knochenmark aus.

Ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit ist die Validierung der IPF% als prädiktiver Faktor für den Verlauf einer Thrombozytopenie am Folgetag. Für eine weitergehende Betrachtung wurde angenommen, dass bei einer Differenz in der Thrombozytenzahl $> 50/\text{nl}$ an zwei aufeinanderfolgenden Tagen von einem kritischen Abfall der Thrombozytenzahl gesprochen werden kann. Der Grenzwert von 8 % entspricht dem Wert, der außerhalb des 95%-Konfidenzintervalls für den ermittelten IPF%-Normwert der Kontrollgruppe (7,9 %) liegt und somit als Indikator eine gesteigerte Thrombozytenproduktion anzunehmen ist. Aus Abbildung 17 wird ersichtlich, dass die Früh- und Neugeborenen, bei denen es zu keinem Abfall der Thrombozytenzahl $> 50/\text{nl}$ innerhalb von zwei aufeinanderfolgenden Tagen kam, die IPF%-Werte im Normbereich lagen. Somit kann von insgesamt stabilen Thrombozytenzahlen ausgegangen werden, und es zeigt sich, dass sich in dieser Gruppe auch die überwiegende Anzahl der Kontrollgruppe befindet. Wurde kein kritischer Abfall der Thrombozytenzahlen sowie IPF-Werte $\geq 8\%$ erfasst, so deutet dies auf eine erhöhte Rate der Freisetzung von Thrombozyten aus dem Knochenmark bzw. der Leber hin. Dieser Patientengruppe gehören fast ausschließlich thrombozytopenie Früh- und Neugeborene an. Zu einem kritischen Abfall kam es bei erhöhten IPF%-Werte aber nicht. Dies bestätigt auch das Ergebnis dieser Arbeit, dass vor

allem bei thrombozytopenischen Früh- und Neugeborenen erhöhte IPF%-Werte einem Thrombozytenanstieg vorausgehen (Abbildung 13). Im Allgemeinen besteht bei IPF%-Werten $< 8\%$ ein 4,7-fach erhöhtes relatives Risiko für thrombozytopenie Früh- und Neugeborene einen kritischen Thrombozytenabfall um $> 50/\text{nl}$ zu erleiden. Damit ist eine IPF% von 8% ein verlässlicher Grenzwert, um den Verlauf einer Thrombozytopenie einzuschätzen. Bei nur 5% (5 von 99) der Früh- und Neugeborenen kam es trotz einer gesteigerten Aktivität der Megakaryopoese im Knochenmark und hohen IPF%-Werten ($\geq 8\%$) zu einem kritischen Thrombozytenabfall. Für den klinischen Alltag bietet dieses Ergebnis dem Neonatologen eine wichtige Hilfestellung bezüglich der Indikationsstellung für wiederholte Blutbildkontrollen sowie für die Transfusion von Thrombozytenkonzentraten. Bei Früh- und Neugeborenen mit einer IPF $\geq 8\%$ kann mit einer relativ hohen Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass es nicht zu einem relevanten Sturz der Thrombozytenzahl ($> 50/\text{nl}$) am Folgetag kommt. Die IPF% dient somit der Interpretation des Verlaufs einer neonatalen Thrombozytopenie.

5.3 Die Bedeutung der Studienergebnisse für das klinische Management der neonatalen Thrombozytopenie

Weiterführende Arbeiten zum Thema der *Immature Platelet Fraction* könnten prospektiv angelegt werden. Bei prospektiven Studien besteht kein Selektionsbias, der bei retrospektiven Studien zur Beeinflussung der Ergebnisse führen kann. Dieser Punkt kann für die eigene Arbeit ausgeschlossen werden, da nahezu die gesamte Kohorte der Früh- und Neugeborenen eingeschlossen wurde, die im Zeitraum Juni bis November 2007 auf einer der Intensiv- und Intensivüberwachungsstationen der Charité - Universitätsmedizin Berlin aufgenommen wurde.

Kulshrestha *et al.* untersuchten die IPF und Kinetik des Verlaufs von der Thrombozytenzahl bei VLBW-Frühgeborenen ($n = 27$). Sie entwickelten ein mathematisches Modell, welches die Produktion und das Überleben der IPF und Thrombozyten nachahmt. Für nicht-thrombozytopenie Frühgeborene wurde die durchschnittliche Verweilzeit der IPF und Thrombozyten mit 0,912 bzw. 10,7 Tagen angegeben, bei thrombozytopenen Frühgeborenen zeigte sich eine signifikant kürzere Verweilzeit von 0,429 bzw. 2,56 Tagen. Im Modell konnte dargestellt werden, dass die Zunahme des Körpergewichts der Frühgeborenen im Verlauf des Untersuchungszeitraums der ersten 35 Tage nach Geburt die Kinetik des Verlaufs der Thrombozytenzahlen durch das ansteigende Blutvolumen maßgeblich beeinflusst. Die Erkenntnisse von Kulshrestha *et al.* sind

für zukünftige Therapieansätze zur Behandlung von thrombozytopenen Neugeborenen wichtig.⁹³ Die eigene Arbeit, in der IPF-Normwerte für nicht-thrombozytopen Neugeborene generiert und ein signifikanter Einfluss von Gestationsalter und Geburtsgewicht auf die Thrombozytenzahl gezeigt wurde, hat somit einen hervorragenden Stellenwert für innovative Strategien zur Verbesserung des klinischen Managements bei neonataler Thrombozytopenie.

Zukünftig könnten zudem weitere Untersuchungen zur Rolle von THPO für Diagnostik und Therapie im Zusammenhang mit der IPF angestellt werden. Im Allgemeinen besteht zwischen der THPO-Konzentration und der Thrombozytenzahl eine inverse Korrelation. Durch die spezifischen c-MPL-Rezeptoren der Thrombozyten wird THPO gebunden und aus dem Blutplasma eliminiert. Bei ansteigender Thrombozytenzahl verbleibt somit weniger THPO in der Zirkulation, wodurch die THPO-Konzentration sinkt. Bei einer Thrombozytopenie kann weniger THPO gebunden werden, wodurch hohe THPO-Konzentrationen in der Blutzirkulation verbleiben und diese die Thrombozytopoese stimulieren.³ Es besteht keine Abhängigkeit der THPO-Konzentration vom Schweregrad der Thrombozytopenie.⁹⁴ Neonatale THPO-Plasmakonzentrationen sind bei gesunden Neugeborenen höher als bei gesunden Erwachsenen.³³

Eine aktuelle Studie untersuchte THPO, IPF und Thrombozytenzahl bei VLBW-Frühgeborenen und *term* Neugeborenen in der ersten Lebenswoche. Am dritten Lebenstag konnte bei Neugeborenen ein genereller THPO-Anstieg festgestellt werden. Dieser war signifikant höher bei VLBW-Frühgeborenen (n = 69) im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe von *term* Neugeborenen (n = 41). Bei thrombozytopenen VLBW-Frühgeborenen war die THPO-Konzentration außerdem signifikant höher als bei nicht-thrombozytopenen VLBW-Frühgeborenen. Ursache für eine Thrombozytopenie bei VLBW-Frühgeborenen ist somit allenfalls ein inadäquater THPO-Spiegel. Ein THPO-Anstieg ging einem IPF-Anstieg und folgendem Thrombozytenanstieg voraus. Die IPF-Werte waren am siebten Lebenstag bei thrombozytopenen VLBW-Frühgeborenen jedoch niedriger als bei VLBW-Frühgeborenen ohne Thrombozytopenie, was auf die verringerte Aktivität der Megakaryopoese hinweist. Hier zeigt sich, dass die erhöhten THPO-Konzentrationen allein nicht ausreichend sind, um einen suffizienten IPF-Anstieg zu erreichen bzw. auf eine maximale Konzentration limitiert sind.⁹⁵

Da THPO als potentester Stimulator der Megakaryopoese bekannt ist,³ wurde in Studien die Rolle von THPO-Mimetika als therapeutisches Mittel der neonatalen Thrombozytopenie bereits

Diskussion

diskutiert.⁹⁶ Zunächst bedarf es jedoch einer Einschätzung über den Verlauf der Thrombozytopenie. THPO-Mimetika führen erst nach 4-6 Tagen zu ansteigenden Thrombozytenzahlen und erreichen nach 10 bis 14 Tagen ihr Maximum.⁹⁶ Daher stellt diese Therapiemethode keine akute Behandlungsoption dar. Eine schnelle Beurteilung des Verlaufs der neonatalen Thrombozytopenie ist primär notwendig und kann durch die IPF% ermöglicht werden.

Es sollte weiterhin die Bedeutung der IPF für das Management spezifischer Formen der Thrombozytopenie des Früh- und Neugeborenen untersucht werden. Es stellt sich zum Beispiel die Frage, ob bei gesteigerter Erythropoiese (zum Beispiel beim *Morbus haemolyticus neonatorum*) die Thrombozytopoiese im Knochenmark tatsächlich unterdrückt ist.^{97, 98}

Bei Immunthrombozytopenien wurde eine Abhängigkeit der Zahl der retikulierten Thrombozyten vom Schweregrad der Thrombozytopenie beschrieben. Die Untersuchung wurde bei 16 pädiatrischen Patienten mit ITP (Alter 1,5-14,3 Jahre bei Diagnosestellung) durchgeführt. Bei Thrombozytenwerten < 50/nl waren stets erhöhte RP% zu messen (Median 10,4 %), ab Werten > 100/nl waren diese nur leicht erhöht (Median 2,1 %) oder lagen im Normbereich (Median 1,5 %).⁹⁹ In der eigenen Arbeit lässt sich ein signifikanter Anstieg der IPF% mit zunehmendem Schweregrad der Thrombozytopenie verzeichnen (Abbildung 14, 15). Bei einem in der Arbeit eingeschlossenen Neugeborenen mit diagnostizierter neonataler Alloimmunthrombozytopenie lag ein IPF%-Wert von 61 % bei einem Thrombozytenwert von 5/nl vor. Dies steht im Einklang mit den in der Fachliteratur beschriebenen deutlich erhöhten IPF%-Werten bei Immunthrombozytopenien. Briggs *et al.* empfehlen in ihrer Arbeit zur IPF% bei Erwachsenen, bei Verdacht auf ITP ohne signifikant erhöhte IPF% eine Knochenmarkuntersuchung durchzuführen. Bei sich typisch präsentierender ITP mit hoher IPF% hingegen kann zunächst von invasiven Maßnahmen abgesehen werden.⁷⁰ Es wäre zu prüfen, ob ein solches Vorgehen auch bei Neugeborenen mit Immunthrombozytopenie angewandt werden sollte.

Da bei mehr als der Hälfte der, vor allem, *early-onset* Thrombozytopenien der genaue Pathomechanismus nicht geklärt ist bzw. oft Situationen vorherrschen, in denen die Thrombozytopenie multifaktoriell bedingt sein kann, könnte die longitudinale Analyse der IPF-Werte für Entscheidungen über das weitere therapeutische Vorgehen sehr hilfreich sein.

Diskussion

In dieser Arbeit konnte ermittelt werden, dass es mit einer hohen Wahrscheinlichkeit bei einer IPF $\geq 8\%$ zu keinem Thrombozytenabfall $> 50/\text{nl}$ am Folgetag kommt. Liegen im Falle einer neonatalen Thrombozytopenie IPF%-Werte $\geq 8\%$ vor und lassen sich weder Anzeichen einer Blutung noch einer Sepsis nachweisen, so kann bei der Frage nach einer Thrombozytentransfusion eine abwartende Haltung eingenommen werden.

Die aktuell durchgeführte PlaNet-2 Studie, die Frühgeborene ($< 34+0$ SSW) mit Thrombozytenzahlen $< 50/\text{nl}$ untersucht,⁶⁷ könnte in einer Subgruppen-Analyse die Messung der IPF% mit einbeziehen. Es ließe sich überprüfen, ob Frühgeborene in Abhängigkeit der IPF%-Werte in der jeweiligen Gruppe mit Thrombozytenzahlen $< 25/\text{nl}$ bzw. $< 50/\text{nl}$ auch mit einem verminderten Auftreten einer schwerwiegenden Blutung einhergehen.

Oben genannte Aspekte verdeutlichen den zukünftig vielseitig möglichen Nutzen der IPF für Diagnostik und Therapieentscheidungen der neonatalen Thrombozytopenie. Durch die neu gewonnenen Erkenntnisse können Früh- und Neugeborene mit erhöhtem Risiko für einen Thrombozytensturz $> 50/\text{nl}$ am Folgetag besser identifiziert und gezielter überwacht werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Lüllmann-Rauch R. Blut und Blutbildung. In: Histologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 2003; 239-246.
2. Sola-Visner M, Sallmon H, Brown R. New insights into the mechanisms of nonimmune thrombocytopenia in neonates. *Semin Perinatol* 2009; 33(1):43-51.
3. Machlus KR, Thon JN, Italiano JE, Jr. Interpreting the developmental dance of the megakaryocyte: a review of the cellular and molecular processes mediating platelet formation. *Br J Haematol* 2014; 165(2):227-36.
4. Clarke MC, Savill J, Jones DB, Noble BS, Brown SB. Compartmentalized megakaryocyte death generates functional platelets committed to caspase-independent death. *J Cell Biol* 2003; 160(4):577-87.
5. Josefsson EC, James C, Henley KJ, Debrincat MA, Rogers KL, Dowling MR, White MJ, Kruse EA, Lane RM, Ellis S, Nurden P, Mason KD, O'Reilly LA, Roberts AW, Metcalf D, Huang DC, Kile BT. Megakaryocytes possess a functional intrinsic apoptosis pathway that must be restrained to survive and produce platelets. *J Exp Med* 2011; 208(10):2017-31.
6. Tablin F, Castro M, Leven RM. Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation. *J Cell Sci* 1990; 97(Pt 1):59-70.
7. Italiano JE, Jr. Unraveling mechanisms that control platelet production. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 2013; 39(1):15-24.
8. Italiano JE, Jr., Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol* 1999; 147(6):1299-312.

Literaturverzeichnis

9. Suzuki A, Shin JW, Wang Y, Min SH, Poncz M, Choi JK, Discher DE, Carpenter CL, Lian L, Zhao L, Wang Y, Abrams CS. RhoA is essential for maintaining normal megakaryocyte ploidy and platelet generation. *PLoS One* 2013; 8(7):e69315.
10. Pleines I, Dütting S, Cherpokova D, Eckly A, Meyer I, Morowski M, Krohne G, Schulze H, Gachet C, Debili N, Brakebusch C, Nieswandt B. Defective tubulin organization and proplatelet formation in murine megakaryocytes lacking Rac1 and Cdc42. *Blood* 2013; 122(18):3178-87.
11. Pötzsch B, Madlener K. Die Entwicklung der megakaryozytären Zellreihe aus den hämatopoetischen Stammzellen. In: *Hämostaseologie: Grundlagen, Diagnostik, Therapie*. Springer Verlag, Heidelberg; 2010; 30-42.
12. Fukuda T. Fetal hemopoiesis. I. Electron microscopic studies on human yolk sac hemopoiesis. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1973; 14(3):197-213.
13. Levine RF, Olson TA, Shoff PK, Miller MK, Weisman LE. Mature micromegakaryocytes: an unusual developmental pattern in term infants. *Br J Haematol* 1996; 94(2):391-9.
14. Mattia G, Vulcano F, Milazzo L, Barca A, Macioce G, Giampaolo A, Hassan HJ. Different ploidy levels of megakaryocytes generated from peripheral or cord blood CD34+ cells are correlated with different levels of platelet release. *Blood* 2002; 99(3):888-97.
15. Murray NA, Watts TL, Roberts IA. Endogenous thrombopoietin levels and effect of recombinant human thrombopoietin on megakaryocyte precursors in term and preterm babies. *Pediatr Res* 1998; 43(1):148-51.
16. Liu ZJ, Sola-Visner M. Neonatal and adult megakaryopoiesis. *Curr Opin Hematol* 2011; 18(5):330-7.

Literaturverzeichnis

17. Pastos KM, Slayton WB, Rimsza LM, Young L, Sola-Visner MC. Differential effects of recombinant thrombopoietin and bone marrow stromal-conditioned media on neonatal versus adult megakaryocytes. *Blood* 2006; 108(10):3360-2.
18. Liu ZJ, Hoffmeister KM, Hu Z, Mager DE, Ait-Oudhia S, Debrincat MA, Pleines I, Josefsson EC, Kile BT, Italiano J Jr, Ramsey H, Grozovsky R, Veng-Pedersen P, Chavda C, Sola-Visner M. Expansion of the neonatal platelet mass is achieved via an extension of platelet lifespan. *Blood* 2014; 123(22):3381-9.
19. Bonifacio L, Petrova A, Nanjundaswamy S, Mehta R. Thrombocytopenia related neonatal outcome in preterms. *Indian J Pediatr* 2007; 74(3):269-74.
20. Sola-Visner M, Saxonhouse MA, Brown RE. Neonatal thrombocytopenia: what we do and don't know. *Early Hum Dev* 2008; 84(8):499-506.
21. Christensen RD, Henry E, Wiedmeier SE, Stoddard RA, Sola-Visner MC, Lambert DK, Kiehn TI, Ainsworth S. Thrombocytopenia among extremely low birth weight neonates: data from a multihospital healthcare system. *J Perinatol* 2006; 26(6):348-53.
22. Van den Hof MC, Nicolaidis KH. Platelet count in normal, small, and anemic fetuses. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162(3):735-9.
23. Dreyfus M, Kaplan C, Verdy E, Schlegel N, Durand-Zaleski I, Tchernia G. Frequency of immune thrombocytopenia in newborns: a prospective study. Immune Thrombocytopenia Working Group. *Blood* 1997; 89(12):4402-6.
24. Sainio S, Jarvenpaa AL, Renlund M, Riikonen S, Teramo K, Kekomaki R. Thrombocytopenia in term infants: a population-based study. *Obstet Gynecol* 2000; 95(3):441-6.
25. Sola MC, Rimsza LM. Mechanisms underlying thrombocytopenia in the neonatal intensive care unit. *Acta Paediatr Suppl* 2002; 91(438):66-73.

Literaturverzeichnis

26. Gibson B. Neonatal haemostasis. *Arch Dis Child* 1989; 64(4):503-6.
27. Forestier F, Daffos F, Galacteros F, Bardakjian J, Rainaut M, Beuzard Y. Hematological values of 163 normal fetuses between 18 and 30 weeks of gestation. *Pediatr Res* 1986; 20(4):342-6.
28. Forestier F, Daffos F, Catherine N, Renard M, Andreux JP. Developmental hematopoiesis in normal human fetal blood. *Blood* 1991; 77(11):2360-3.
29. Holmberg L, Gustavii B, Jonsson A. A prenatal study of fetal platelet count and size with application to fetus at risk for Wiskott-Aldrich syndrome. *J Pediatr* 1983; 102(5):773-6.
30. Wiedmeier SE, Henry E, Sola-Visner MC, Christensen RD. Platelet reference ranges for neonates, defined using data from over 47 000 patients in a multihospital healthcare system. *J Perinatol* 2008; 29(2):130-6.
31. Mehta P, Vasa R, Neumann L, Karpatkin M. Thrombocytopenia in the high-risk infant. *J Pediatr* 1980; 97(5):791-4.
32. Castle V, Andrew M, Kelton J, Giron D, Johnston M, Carter C. Frequency and mechanism of neonatal thrombocytopenia. *J Pediatr* 1986; 108(5 Pt 1):749-55.
33. Dame C. Developmental biology of thrombopoietin in the human fetus and neonate. *Acta Paediatr Suppl* 2002; 91(438):54-65.
34. Roberts IA, Murray NA. Thrombocytopenia in the newborn. *Curr Opin Pediatr* 2003; 15(1):17-23.
35. Murray NA. Evaluation and treatment of thrombocytopenia in the neonatal intensive care unit. *Acta Paediatr Suppl* 2002; 91(438):74-81.
36. Murray NA, Roberts IA. Circulating megakaryocytes and their progenitors in early thrombocytopenia in preterm neonates. *Pediatr Res* 1996; 40(1):112-9.

Literaturverzeichnis

37. Hohlfeld P, Forestier F, Kaplan C, Tissot JD, Daffos F. Fetal thrombocytopenia: a retrospective survey of 5,194 fetal blood samplings. *Blood* 1994; 84(6):1851-6.
38. Forestier F, Hohlfeld P. Management of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Biol Neonate* 1998; 74(6):395-401.
39. Paidas MJ, Haut MJ, Lockwood CJ. Platelet disorders in pregnancy: implications for mother and fetus. *Mt Sinai J Med* 1994; 61(5):389-403.
40. Ebell W, Salama A. Transfusionsmedizin. In: Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J, Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Springer Verlag, Heidelberg; 2006; 1032-42.
41. Querschnitts-Leitlinien (BÄK) zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten. 2014. (Accessed 17.10.2014, at http://www.bundesaerztekammer.de/downloads/QLL_Haemotherapie_2014.pdf.)
42. Blanchette VS, Johnson J, Rand M. The management of alloimmune neonatal thrombocytopenia. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 2000; 13(3):365-90.
43. Roberts I, Murray NA. Neonatal thrombocytopenia: causes and management. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003; 88(5):F359-64.
44. Sainio S, Joutsu L, Järvenpää AL, Kekomäki R, Koistinen E, Riikonen S, Teramo K. Idiopathic thrombocytopenic purpura in pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998; 77(3):272-7.
45. Dame C. Thrombozytopenien des Neugeborenen. In: Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J, Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Springer Verlag, Heidelberg; 2006; 290-302.
46. Ballmaier M, Germeshausen M, Schulze H, Cherkaoui K, Lang S, Gaudig A, Krukemeier S, Eilers M, Strauss G, Welte K. c-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Blood* 2001; 97(1):139-46.

Literaturverzeichnis

47. Ballmaier M, Balduini C, Welte K, Germeshausen M. Erbllich bedingte Thrombozytopenien. *Monatsschr Kinderheilkd* 2006; 154(6):510-21.
48. Chakravorty S, Murray N, Roberts I. Neonatal thrombocytopenia. *Early Hum Dev* 2005; 81(1):35-41.
49. Ingram M, Coopersmith A. Reticulated platelets following acute blood loss. *Br J Haematol* 1969; 17(3):225-9.
50. Dale GL, Friese P, Hynes LA, Burstein SA. Demonstration that thiazole-orange-positive platelets in the dog are less than 24 hours old. *Blood* 1995; 85(7):1822-5.
51. Ault KA, Knowles C. In vivo biotinylation demonstrates that reticulated platelets are the youngest platelets in circulation. *Exp Hematol* 1995; 23(9):996-1001.
52. Takami A, Shibayama M, Orito M, Omote M, Okumura H, Yamashita T, Shimadoi S, Yoshida T, Nakao S, Asakura H. Immature platelet fraction for prediction of platelet engraftment after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39(8):501-7.
53. Robinson MS, Mackie IJ, Khair K, Liesner R, Goodall AH, Savidge GF, Machin SJ, Harrison P. Flow cytometric analysis of reticulated platelets: evidence for a large proportion of non-specific labelling of dense granules by fluorescent dyes. *Br J Haematol* 1998; 100(2):351-7.
54. Balduini CL, Noris P, Spedini P, Belletti S, Zambelli A, Da Prada GA. Relationship between size and thiazole orange fluorescence of platelets in patients undergoing high-dose chemotherapy. *Br J Haematol* 1999; 106(1):202-7.
55. Ault KA, Rinder HM, Mitchell J, Carmody MB, Vary CP, Hillman RS. The significance of platelets with increased RNA content (reticulated platelets). A measure of the rate of thrombopoiesis. *Am J Clin Pathol* 1992; 98(6):637-46.

Literaturverzeichnis

56. Ault KA. Flow cytometric measurement of platelet function and reticulated platelets. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 677:293-308.
57. Kienast J, Schmitz G. Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood* 1990; 75(1):116-21.
58. Stanworth SJ, Clarke P, Watts T, Ballard S, Choo L, Morris T, Murphy MF, Roberts I. Prospective, observational study of outcomes in neonates with severe thrombocytopenia. *Pediatrics* 2009; 124(5):e826-34.
59. Dohner ML, Wiedmeier SE, Stoddard RA, Null D Jr, Lambert DK, Burnett J, Baer VL, Hunt JC, Henry E, Christensen RD. Very high users of platelet transfusions in the neonatal intensive care unit. *Transfusion* 2009; 49(5):869-72.
60. Andrew M, Vegh P, Caco C, Kirpalani H, Jefferies A, Ohlsson A, Watts J, Saigal S, Milner R, Wang E. A randomized, controlled trial of platelet transfusions in thrombocytopenic premature infants. *J Pediatr* 1993; 123(2):285-91.
61. Cremer M, Sola-Visner M, Roll S, Josephson CD, Yilmaz Z, Bühner C, Dame C. Platelet transfusions in neonates: practices in the United States vary significantly from those in Austria, Germany, and Switzerland. *Transfusion* 2011; 51(12):2634-41.
62. Andrew M, Castle V, Saigal S, Carter C, Kelton JG. Clinical impact of neonatal thrombocytopenia. *J Pediatr* 1987; 110(3):457-64.
63. Aderka D, Praff G, Santo M, Weinberger A, Pinkhas J. Bleeding due to thrombocytopenia in acute leukemias and reevaluation of the prophylactic platelet transfusion policy. *Am J Med Sci* 1986; 291(3):147-51.
64. Horbar JD, Badger GJ, Carpenter JH, Fanaroff AA, Kilpatrick S, LaCorte M, Phibbs R, Soll RF. Trends in mortality and morbidity for very low birth weight infants, 1991-1999. *Pediatrics* 2002; 110(1 Pt 1):143-51.

Literaturverzeichnis

65. Dame C. Hämatologie. In: Genzel-Boroviczény O, Mihatsch W, Proquitté H, Roos R, Checkliste Neonatologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 2015 (in Druck).
66. Eger H, Kalden J. Immunologische Prinzipien von Transfusion und Transplantation. In: Greten H, Innere Medizin. Georg Thieme Verlag, Heidelberg; 2005; 1101-1103.
67. Curley A, Venkatesh V, Stanworth S, Clarke P, Watts T, New H, Willoughby K, Khan R, Muthukumar P, Deary A. Platelets for neonatal transfusion - study 2: a randomised controlled trial to compare two different platelet count thresholds for prophylactic platelet transfusion to preterm neonates. *Neonatology* 2014; 106(2):102-6.
68. Albanyan A, Murphy MF, Wilcock M, Harrison P. Changes in the immature platelet fraction within ageing platelet concentrates. *J Thromb Haemost* 2008; 6(12):2213-5.
69. Präanalytik - Blut. 2013. (Accessed 19.01.2014, at http://www.ladr.de/sites/all/themes/cont/files/_02_pdfs/01_medizin/01_diagnostik/praeanalytik/Praeanalytik_Blut.pdf.)
70. Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2004; 126(1):93-9.
71. Weimann A, Weimann K, Lun A. Laboratory haematological changes in the field of intensive care medicine--the extended differential blood count. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2009; 44(3):164-70.
72. Lawrence JB, Yomtovian RA, Dillman C, Masarik SR, Chongkolwatana V, Creger RJ, Manka A, Hammons T, Lazarus HM. Reliability of automated platelet counts: comparison with manual method and utility for prediction of clinical bleeding. *Am J Hematol* 1995; 48(4):244-50.
73. Briggs C, Harrison P, Machin SJ. Continuing developments with the automated platelet count. *Int J Lab Hematol* 2007; 29(2):77-91.

Literaturverzeichnis

74. Kickler TS, Oguni S, Borowitz MJ. A clinical evaluation of high fluorescent platelet fraction percentage in thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol* 2006; 125(2):282-7.
75. Blutuntersuchungen werden besser vergleichbar. Physikalische Technische Bundesanstalt. 2012. (Accessed 19.12.2014, at http://www.ptb.de/cms/fileadmin/internet/publikationen/ptb_news/pdf/deutsch/news2012_2d.pdf.)
76. RBC/PLT-Kanal: Impedanzmessung mittels hydrodynamischer Fokussierung. (Accessed 23.12.2014, at http://www.sysmex.de/fileadmin/media/f101/Xtra/Themenblaetter/12.2.11_b_Messprinzipien_xed_RZ_Web.pdf.)
77. Briggs C, Harrison P, Grant D, Staves J, MacHin SJ. New quantitative parameters on a recently introduced automated blood cell counter--the XE 2100. *Clin Lab Haematol* 2000; 22(6):345-50.
78. Thrombozytenverteilungskurven: Interpretationen, Möglichkeiten und Grenzen. Sysmex. (Accessed 15.01.2014, at http://www.sysmex.de/fileadmin/media/f101/Xtra/Themenblaetter/17.2.03_Thrombozyten-Verteilungskurven.pdf.)
79. Muster-Standardarbeitsanweisung für den Sysmex Hämatologieanalysator XE-2100. (Accessed 15.10.2014, at http://www.sysmex.de/fileadmin/media/f101/Muster-Standardarbeitsanweisung/SOP_XE_2100__11_2010.pdf.)
80. Cremer M, Paetzold J, Schmalisch G, Hammer H, Loui A, Dame C, Weimann A. Immature platelet fraction as novel laboratory parameter predicting the course of neonatal thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2009; 144(4):619-21.
81. Peterec SM, Brennan SA, Rinder HM, Wnek JL, Beardsley DS. Reticulated platelet values in normal and thrombocytopenic neonates. *J Pediatr* 1996; 129(2):269-74.
82. Saxonhouse MA, Sola MC, Pastos KM, Ignatz ME, Hutson AD, Christensen RD, Rimsza LM. Reticulated platelet percentages in term and preterm neonates. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004; 26(12):797-802.

Literaturverzeichnis

83. Abe Y, Wada H, Tomatsu H, Sakaguchi A, Nishioka J, Yabu Y, Onishi K, Nakatani K, Morishita Y, Oguni S, Nobori T. A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF). *Thromb Res* 2006; 118(4):463-9.
84. Baer VL, Lambert DK, Henry E, Christensen RD. Severe Thrombocytopenia in the NICU. *Pediatrics* 2009; 124(6):e1095-100.
85. Murray NA, Howarth LJ, McCloy MP, Letsky EA, Roberts IA. Platelet transfusion in the management of severe thrombocytopenia in neonatal intensive care unit patients. *Transfus Med* 2002; 12(1):35-41.
86. Beiner ME, Simchen MJ, Sivan E, Chetrit A, Kuint J, Schiff E. Risk factors for neonatal thrombocytopenia in preterm infants. *Am J Perinatol* 2003; 20(1):49-54.
87. Wasiluk A, Mantur M, Kemonia H, Szczepanski M, Jasinska E, Milewski R. Thrombopoiesis in small for gestational age newborns. *Platelets* 2009; 20(7):520-4.
88. Wasiluk A. Thrombocytopoiesis in healthy term newborns. *J Perinat Med* 2005; 33(3):252-4.
89. Strauss G, Vollert C, von Stackelberg A, Weimann A, Gaedicke G, Schulze H. Immature platelet count: A simple parameter for distinguishing thrombocytopenia in pediatric acute lymphocytic leukemia from immune thrombocytopenia. *Pediatr Blood Cancer* 2011; 57(4):641-7.
90. Liu ZJ, Italiano J Jr, Ferrer-Marin F, Gutti R, Bailey M, Poterjoy B, Rimsza L, Sola-Visner M. Developmental differences in megakaryocytopoiesis are associated with up-regulated TPO signaling through mTOR and elevated GATA-1 levels in neonatal megakaryocytes. *Blood* 2011; 117(15):4106-17.
91. Hack CE, Aarden LA, Thijs LG. Role of cytokines in sepsis. *Adv Immunol* 1997; 66:101-95.

Literaturverzeichnis

92. Briggs C, Hart D, Kunka S, Oguni S, Machin SJ. Immature platelet fraction measurement: a future guide to platelet transfusion requirement after haematopoietic stem cell transplantation. *Transfus Med* 2006; 16(2):101-9.
93. Kulshrestha M, Sola-Visner M, Widness JA, Veng-Pedersen P, Mager DE. Mathematical model of platelet turnover in thrombocytopenic and nonthrombocytopenic preterm neonates. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015; 308(1):H68-73.
94. Sola MC, Calhoun DA, Hutson AD, Christensen RD. Plasma thrombopoietin concentrations in thrombocytopenic and non-thrombocytopenic patients in a neonatal intensive care unit. *Br J Haematol* 1999; 104(1):90-2.
95. Cremer M, Weimann A, Bühner C, Dame C. Thrombopoietin und Immature Platelet Fraction bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht < 1500 g. *Monatsschr Kinderheilkd* 2011; 159, Supp2:51. 37. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin 2011.
96. Sallmon H, Gutti RK, Ferrer-Marin F, Liu ZJ, Sola-Visner MC. Increasing platelets without transfusion: is it time to introduce novel thrombopoietic agents in neonatal care? *J Perinatol* 2010; 30(12):765-9.
97. Harman CR, Bowman JM, Menticoglou SM, Pollock JM, Manning FA. Profound fetal thrombocytopenia in Rhesus disease: serious hazard at intravascular transfusion. *Lancet* 1988; 2(8613):741-2.
98. Koenig JM, Christensen RD. Neutropenia and thrombocytopenia in infants with Rh hemolytic disease. *J Pediatr* 1989; 114(4 Pt 1):625-31.
99. Rajantie J, Javela K, Joutsu-Korhonen L, Kekomaki R. Chronic thrombocytopenia of childhood: use of non-invasive methods in clinical evaluation. *Eur J Haematol* 2004; 72(4):268-72.

7 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Judith Paetzold, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die *Immature Platelet Fraction* bei neonataler Thrombozytopenie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an erfolgter Publikation

Judith Paetzold hatte Anteil an der folgenden Publikation:

Cremer M, Paetzold J, Schmalisch G, Hammer H, Loui A, Dame C, Weimann A. Immature platelet fraction as novel laboratory parameter predicting the course of neonatal thrombocytopenia. Br J Haematol 2009; 144(4):619-21.

Beitrag im Einzelnen: Analyse, Auswertung und Interpretation der Daten und Laborwerte von 612 Früh- und Neugeborenen der neonatologischen Intensiv- und Intensivüberwachungsstationen der Charité - Universitätsmedizin Berlin

Datum, Unterschrift der Doktorandin

8 Curriculum Vitae

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

9 Veröffentlichungen aus dieser Arbeit

Cremer M, Paetzold J, Schmalisch G, Hammer H, Loui A, Dame C, Weimann A. *Immature platelet fraction* as novel laboratory parameter predicting the course of neonatal thrombocytopenia. Br J Haematol 2009; 144(4):619-21.

Cremer M, Paetzold J, Schmalisch G, Bühner C, Weimann A, Dame C. *Immature platelet fraction* – ein innovativer Parameter für das Management der Thrombozytopenie des Neugeborenen. Z Geburtsh Neonatol 2009; 213:38. (Abstract)

10 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Christof Dame sowie Herrn Dr. med. Malte Cremer für die Bereitstellung des interessanten Themas. Ich bedanke mich insbesondere für die umfassende Betreuung, Hilfsbereitschaft und konstruktive Kritik bei der Datenauswertung und bei der Ausarbeitung der Arbeit sowie die stets geduldige und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Im Besonderen haben auch meine Familie und Freunde zum Gelingen und Fertigstellen der Arbeit durch ihre fortwährende und uneingeschränkte Unterstützung und Ermutigung beigetragen. Ich danke meiner Familie, dass sie mir die Universitätsausbildung und diesen Werdegang ermöglicht haben und mir während des gesamten Studiums und darüber hinaus jederzeit zur Seite standen.