

Aus der ehemaligen Klinik für Allgemeine Pädiatrie,  
Campus Virchow Klinikum der Medizinischen Fakultät Charité  
Labor für Pädiatrische Molekularbiologie  
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

"Immature Platelet Fraction": Evaluation eines neuen  
Thrombozytenparameters in der Differentialdiagnose von  
Thrombozytopenien bei Kindern

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Cora Vollert

aus Hamburg

Gutachter/in:     1. Priv.-Doz. Dr. rer. Nat. H. Schulze  
                          2. Priv.-Doz. Dr. med. O. Meyer  
                          3. Priv.-Doz. Dr. med. R. Knöfler

Datum der Promotion: 25.10.2013

# 1 INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>3</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>5</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>8</b>
1.1 Entstehung und Reifung der Blutzellen: Die Hämatopoese	8
1.1.1 Entstehung der thrombozytären Vorläuferzellen: Die Megakaryozytopoese	10
1.1.2 Bildung und Freisetzung von Thrombozyten: Die Thrombozytopoese	11
1.1.3 Das Endprodukt der Thrombozytopoese: Der Thrombozyt	12
1.1.4 Thrombopoetin (TPO) in der Regulation der Megakaryozytopoese	13
1.2 Einführung der Thrombozytenparameter	15
1.2.1 Thrombozytenzahl (PLT)	15
1.2.2 <i>Mean Platelet Volume</i> (MPV)	16
1.2.3 <i>Plateletcrit</i> (PCT)	16
1.2.4 <i>Platelet Deviation Width</i> (PDW)	17
1.2.5 <i>Platelet-Large Cell Ratio</i> (P-LCR)	17
1.2.6 <i>Platelet-Mean Frequent Volume</i> (P-MFV)	18
1.2.7 Retikulierte Plättchen (RP) und <i>Immature Platelet Fraction</i> (IPF)	18
1.2.8 RP- und IPF-Werte im gesunden Erwachsenen und Kindern	20
1.3 Häufigste hämorrhagische Diathese: Die Thrombozytopenie	21
1.3.1 Idiopathische thrombozytopenische Purpura (ITP)	22
1.3.1.1 Akute versus chronische ITP	24
1.3.1.2 Blutungsneigung in ITP-Patienten	26
1.3.2 Akute lymphatische Leukämie (ALL)	27
1.3.3 Kongenitale Thrombozytopenien	28
1.3.3.1 Fanconi-Anämie (FA)	28
1.3.3.2 Thrombozytopenie-Radiusaplasie Syndrom (TAR-S)	29
1.4 Zielsetzung der Arbeit	30
<b>2 PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>32</b>
2.1 Studiendurchführung und Patienten	32
2.1.1 Patientencharakteristika der ITP-Patienten	33
2.1.2 Patientencharakteristika der ALL-Patienten	34
2.2 Technik des hämatologischen Analysegerätes Sysmex XE-2100	34
2.2.1 Messung der Thrombozytenzahl und -parameter	35
2.2.2 Messung von IPF	37
2.3 Statistische Analysen	39

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>40</b>
	3.1 Reproduzierbarkeit und Stabilität der Thrombozytenparameter	40
	3.2 Thrombozytenparameter in hämatologisch gesunden Kindern	43
	3.3 Thrombozytenparameter der ITP-Patienten	48
	3.3.1 Verläufe	51
	3.3.2 Beziehung von PLT und IPF zur Blutungsneigung	53
	3.4 Thrombozytenparameter der ALL- Patienten im Vergleich	54
	3.5 Relative und Absolute <i>Immature platelet fraction</i>	58
	3.5.1 Kongenitale Thrombozytopenien	58
	3.5.2 Thrombozytenparameter in Patienten mit reaktiver Thrombozytose (RT)	60
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>61</b>
	4.1 Die Thrombozytenparameter: Reproduzierbarkeit und Stabilität	61
	4.2 Referenzwerte	63
	4.3 Pathophysiologie der akuten und chronischen ITP	64
	4.3.1 Verläufe	67
	4.3.2 Blutungsneigung.	68
	4.4 Akzelerierte Thrombozytopoese in ALL-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose?	69
	4.5 Differenzierung von aITP- und ALL-Patienten	71
	4.6 Kongenitale Thrombozytopenien	72
	4.7 Reaktive Thrombozytose	74
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>88</b>
<b>8</b>	<b>EIDESSTAATLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>89</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>90</b>
<b>10</b>	<b>PUBLIKATIONS LISTE</b>	<b>92</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
aITP	Akute idiopathische thrombozytopenische Purpura
ALL	Akute lymphatische Leukämie
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
BFU	<i>Burst Forming Unit</i>
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
CFU <sub>GEMM</sub>	<i>Colony Forming Unit</i> (Granulocytes, Erythrocytes, Monocytes, Megakaryocytes)
CFU-GM	<i>Colony Forming Unit-Granulocytes Monocytes</i>
CFU-MK/E	<i>Colony Forming Unit-Megakaryocytes/Erythrocytes</i>
cITP	Chronische idiopathische thrombozytopenische Purpura
CLP	<i>Common Lymphocyte Progenitor</i>
CMP	<i>Common Myeloid Progenitor</i>
CV	Variationskoeffizient
DMS	Demarkationsmembransystem
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EJC	<i>Exon junction complex</i>
EPO	Erythropoetin
ET	Essentielle Thrombozythämie
FA	Fanconi Anämie
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
GMP	<i>Granulocyte-Monocyte Progenitor</i>
Hb	Hämoglobin
H-IPF	<i>High Fluorescent Immature Platelet Fraction</i>
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HR	Hoch-Risikogruppe
HSC	<i>Haematopoietic Stem cell</i>
HSCT	<i>Haematopoietic Stem Cell Transplantation</i>
HSM	Hepatosplenomegalie

ICH	Intrakranielle Blutung ( <i>Intracranial Hemorrhage</i> )
IFN-Y	Interferon-Gamma
IL-2	Interleukin-2
IPF%	<i>Relative Immature Platelet Fraction</i>
IPF#	<i>Absolute Immature Platelet Fraction</i>
ITP	Idiopathische thrombozytopenische Purpura
KT	Kongenitale Thrombozytopenie
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
LMPP	<i>Lymphoid-Primed Multipotent Progenitor</i>
L-IPF	<i>Low Fluorescent Immature Platelet Fraction</i>
m.	Männlich
M-CSF	<i>Monocytes Colony Stimulating factor</i>
MCV	<i>Mean Corpuscular Volume</i>
MEP	<i>Megacaryocyte-Erythrocyte Progenitor</i>
MHC2	<i>Major Histocompatibility Complex 2</i>
MK	Megakaryozyt
MPV	<i>Mean Platelet Volume</i>
n. b.	Nicht bestimmt
NO	Stickstoffmonoxid
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PCT	<i>Plateletcrit</i>
PDW	<i>Platelet Deviation Width</i>
P-LCR	<i>Platelet-Large Cell Ratio</i>
PLT	Absolute Thrombozytenzahl
p. m.	Post menstruationem
P-MFV	<i>Platelet- Mean Frequent Volume</i>
PRP	Plättchenreiches Plasma
RBC	<i>Red Blood Cells</i>
RDW	<i>Red Cell Distribution Width</i>
RG	Risikogruppe
RP	Retikulierte Plättchen
RT	Reaktive Thrombozytose
SAA	Schwere aplastische Anämie

SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SD	Standardabweichung
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SR	Standard-Risikogruppe
s.u.	Siehe unten
TAR-S	Thrombozytopenie-Radiosaplasie Syndrom
TK	Thrombozytenkonzentrat
TO	Thiazol-Orange
TPO	Thrombopoetin
TT	Thrombozytentransfusion
u.a.	Unter anderem
vWF	Von Willebrandt Faktor
w.	Weiblich
WAS	Wiskott-Aldrich Syndrom
WBC	<i>White Blood Cell Count</i>
z. B.	Zum Beispiel

---

# 1 Einleitung

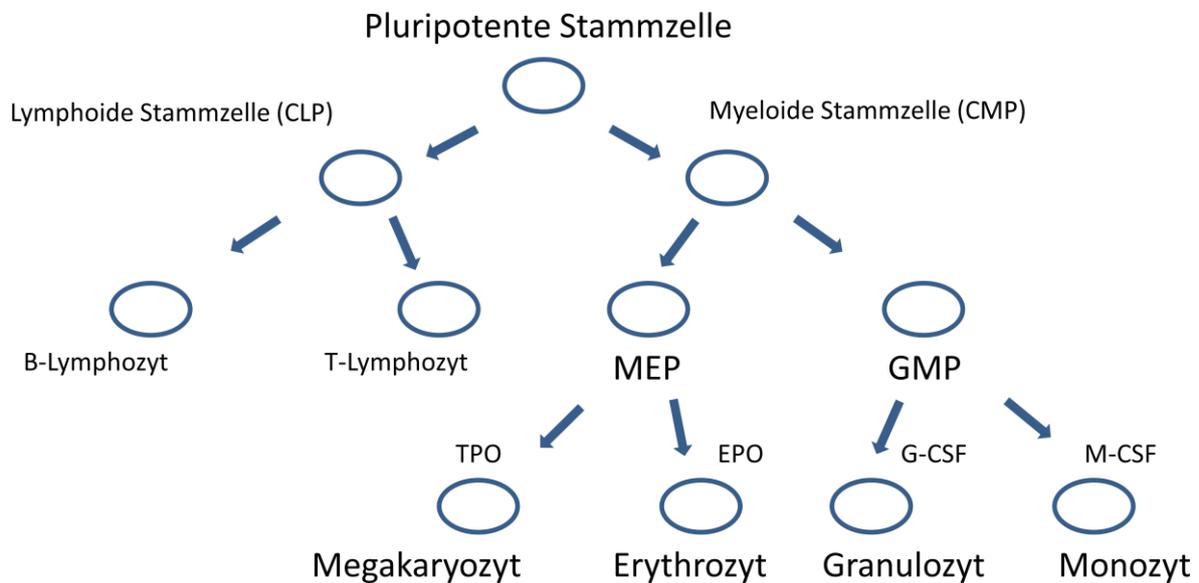
Thrombozyten gehören zu den korpuskulären Bestandteilen des Blutes und sind essentiell für die Blutgerinnung. Neben der Thrombozytenzahl können inzwischen weitere Thrombozytenparameter im Blut bestimmt werden, welche Auskunft über die Größe, Granularität und Populationsverteilung der Thrombozyten liefern. Diese Parameter weisen ein großes Potential für die Differentialdiagnose von Thrombozytopenien und -pathien auf.

Diese Arbeit konzentriert sich auf die Evaluation von Thrombozytenparametern automatisierter Blutzählgeräte bei Kindern und Jugendlichen mit erworbenen und angeborenen Thrombozytopenien. Hierzu wurde eine prospektive klinische Studie durchgeführt, in welche Kinder und Jugendliche eingeschlossen wurden, welche aufgrund einer Thrombozytopenie unklarer Genese an der Charité vorstellig wurden. Der Schwerpunkt der Studie lag auf Patienten mit Idiopathischer thrombozytopenischer Purpura (ITP) und akuter lymphatischer Leukämie (ALL) zum Zeitpunkt der Diagnose. Einführend werden die für die Entstehung der Thrombozyten eminenten Prozesse dargestellt. Anschließend werden die Thrombozytenparameter vorgestellt, die wichtigsten Krankheitsbilder beschrieben sowie die Fragestellung der Arbeit dargelegt.

## 1.1 Die Entstehung und Reifung der Blutzellen: Die Hämatopoese

Die Entstehung und Reifung aller Blutzellen wird als Hämatopoese bezeichnet. Nach einem Modell von Akashi und Weissmann wird heute davon ausgegangen, dass dieser Prozess seinen Ausgangspunkt in der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle (*Haematopoietic Stem Cell* = HSC) des Knochenmarkes nimmt. Die HSC behält lebenslang die Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Sie ist zudem in der Lage sich zu differenzieren und alle zellulären Bestandteile des hämatopoetischen Gewebes zu generieren<sup>1,2</sup>. In einem ersten Schritt entstehen aus der HSC multipotente Stammzellen, welche die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verloren haben. Von ihnen leiten sich die Vorläuferzellen der myeloiden Reihe, der *Common Myeloid Progenitor* (CMP) sowie der lymphoiden Reihe, der *Common Lymphocyte Progenitor* (CLP) ab. Aus dem CMP entwickelt sich der *Granulocyte-Monocyte Progenitor* (GMP) aus dem anschließend die Granulozyten und Monozyten hervorgehen. Weiterhin entsteht aus dem CMP

der *Megakaryocytes-Erythrocytes Progenitor* (MEP), aus welchem sich die Erythrozyten sowie Thrombozyten entwickeln. Aus der CLP entstehen hingegen B- und T-Lymphozyten (Abbildung 1)<sup>1</sup>.



**Abbildung 1.** Modell der Hämatopoese. Differenzierung der lymphoiden sowie myeloiden Zellreihe aus einer gemeinsamen pluripotenten Stammzelle, unter dem Einfluss von Zytokinen. Die Kreise kennzeichnen die experimentell indentifizierte Differenzierungsstufen der hämatopoetischen Vorläuferzellen. (Die blauen Pfeile stellen die Wege der Megakaryozytopoese dar.) M-CSF = *Monocyte Colony Stimulating Factor*; G-CSF = *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*; EPO = Erythropoetin; TPO = Thrombopoetin. (Modifiziert nach Akashi *et al.* 2007)<sup>1</sup>.

Das Mikromilieu für die Hämatopoese wird durch die Zellen des Knochenmarkstromas geschaffen. Stromazellen wie fibroblastische Retikulumzellen und Makrophagen beeinflussen die Hämatopoese durch die Bildung von Zytokinen. Zu diesen Zytokinen, welche die Proliferation, Differenzierung und Reifung der Blutzellen aus hämatopoetischen Stammzellen beeinflussen, gehören unter anderem der *Stem Cell Factor* (SCF), die Interleukine-3, -6 und -11, der *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), sowie linienspezifische Faktoren wie Erythropoetin (EPO), Thrombopoetin (TPO) und der *Granulocyte Colony Stimulating Factor* (G-CSF)<sup>3</sup>.

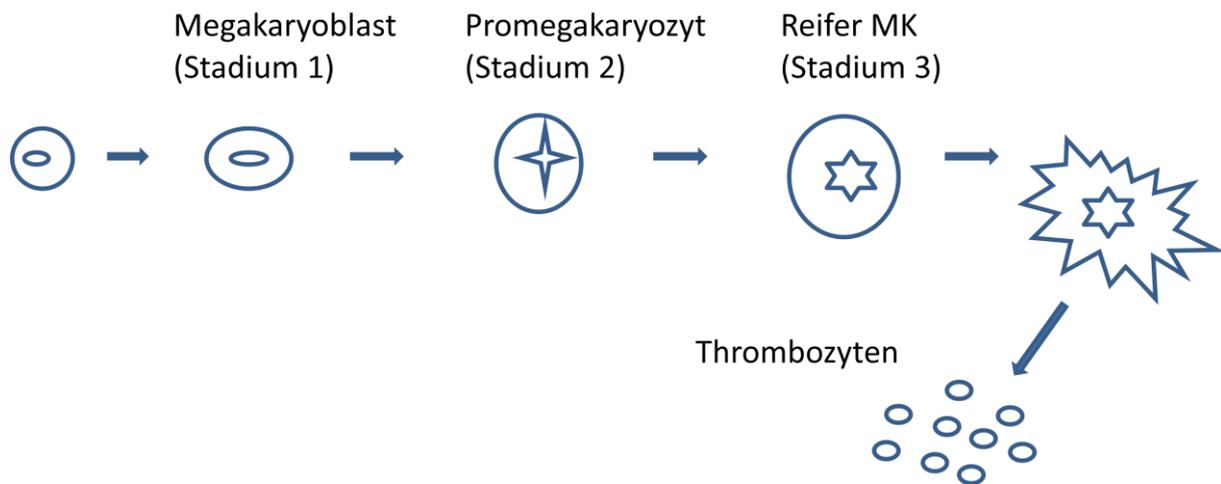
### 1.1.1 Entstehung der thrombozytären Vorläuferzellen: Die Megakaryozytopoese

Megakaryozyten sind die Vorläuferzellen der Thrombozyten und gehören zu den größten hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks (Durchmesser bis zu 50-80 µm). Im Jahre 1849 wurden sie von Robin im Knochenmark erstmals beschrieben<sup>4</sup>. Er war jedoch noch nicht in der Lage die Megakaryozyten von anderen großen Zellen, wie Osteoklasten, zu differenzieren<sup>5</sup>. Erst im Jahre 1890 erkannte Howell die Megakaryozyten als selbstständige Zellentität und prägte ihre Bezeichnung als Megakaryozyten<sup>6</sup>.

Die Megakaryozytopoese, der Reifungsprozess von der hämatopoetischen Stammzelle zum reifen Megakaryozyt, dauert ca. 5 Tage. Während dieses Reifungsprozesses wandern die Zellen aus der osteoblastischen Nische zur vaskulären Nische des Knochenmarks, wo sich die reifen Megakaryozyten in der Nähe der Knochenmarksinusoide einfinden<sup>7</sup>. In der Anwesenheit von Wachstumsfaktoren bilden hämatopoetische Stammzellen in in vitro-Testsystemen auf semi-solidem Medium Kolonien aus (*Colony Forming Units*= CFU)<sup>8</sup>. Gehen aus einer hämatopoetischen Stammzelle in einer einzelnen Kolonie Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten und Megakaryozyten hervor, spricht man von einer CFU<sub>GEMM</sub>. Auf diese Weise kann das hämatopoetische Potential der jeweiligen hämatopoetischen Stammzelle charakterisiert werden. Bisher wurden zwei Zellkolonien beschrieben, die ausschließlich Megakaryozyten beinhalten: die *Colony Forming Unit-Megakaryocyte* (CFU-meg) und die *Burst Forming Unit-Megakaryocyte* (BFU-meg)<sup>9</sup>.

Vergleicht man die morphologischen, histochemischen und biochemischen Eigenschaften der Megakaryozyten lassen sich verschiedene Reifestadien differenzieren. Die erste nachweisbare Zelle der megakaryozytären Reihe ist der 10-50 µm große Megakaryoblast, (Abbildung 2)<sup>10</sup>. Er wird auch als Stadium-I-Megakaryozyt bezeichnet und weist eine noch geringe Polyploidität auf ( $n = 4$ ). Diese Polyploidität entsteht durch DNA-Replikation ohne Zellteilung (= Endomitose), wobei die Zellen zwar in die Mitose eintreten, jedoch die Anaphase B und die Telophase sowie die Zytokinese auslassen<sup>11,12</sup>. Für diese Studie erscheint in diesem Zusammenhang besonders wichtig, dass die Polyploidität der Megakaryozyten mit der Zellgröße und damit auch mit der Anzahl an neu gebildeten Thrombozyten korreliert (Kapitel 1.2.2). Aus dem Megakaryoblasten entsteht in der Folge der 20-80 µm große Promegakaryozyt (Stadium-II-Megakaryozyt)<sup>10</sup>. Promegakaryozyten enthalten bereits granuläre Strukturen, die aus dem Golgi-Apparat entstammen<sup>13</sup>.

Die aus den Promegakaryozyten entstehenden reifen Megakaryozyten (Stadium-III-Megakaryozyten;  $n = 16-32$ ) zeigen eine Abnahme an Ribosomen und enthalten sehr viele Granula<sup>8</sup>.



**Abbildung 2.** Modell der Megakaryozytogenese. Unter dem Einfluss von TPO kommt es über drei verschiedene Zellstadien zur Differenzierung von polyploiden Megakaryozyten (= MK) aus einer hämatopoetischen Stammzelle (= HSC). Die reifen Megakaryozyten bilden dünne Ausläufer aus Zytoplasma aus, aus denen die Proplättchen und schlussendlich die Thrombozyten entstehen<sup>7</sup>.

### 1.1.2 Bildung und Freisetzung von Thrombozyten: Die Thrombozytogenese

Im Jahre 1906 wies James Homer Wright darauf hin, dass Thrombozyten aus dem Zytoplasma von Megakaryozyten entstehen<sup>14</sup>. Die sinusoidal lokalisierten reifen Megakaryozyten scheiden durch Abschnürungen ihrer Zytoplasma-Ausläufer, die in die Sinusoide des Knochenmarks hineinreichen, sogenannte Proplättchen ab. Diese sind in vitro bis zu 250-500  $\mu\text{m}$  lang und können jeweils in 100-200 Thrombozyten zerfallen. Insgesamt entstehen so aus einem Megakaryozyt bis zu 1000 Thrombozyten. Dieser terminale Differenzierungsschritt wird als Thrombozytogenese bezeichnet. Für die Bildung von Proplättchen aus Megakaryozyten ist das sogenannte Demarkationsmembransystem (DMS) von eminenter Bedeutung. Dieses bildet sich durch die Invagination der äußeren Zellmembran der Megakaryozyten und stellt ein Membranreservoir für die Formation der Proplättchen dar<sup>15</sup>. Das DMS ist mit Mikrotubuli-Filamenten und Aktin-Filamenten assoziiert. Die Bedeutung von Mikrotubuli für die Thrombozytogenese wurde 1987 bewiesen, als gezeigt werden konnte, dass das Zellgift Colchicin, welches Mikrotubuli zerstört, die Proplättchenbildung hemmen kann<sup>16</sup>. Die während

der Thrombozytopoese entstehenden pseudopodienartigen Proplättchenstrukturen entwickeln sich zu langen, verzweigten Schäften. Ein sich überlappendes Gleiten dieser mit Mikrotubulin-Filamenten ausgekleideten Schäfte ist für die Verlängerung der Proplättchen von Bedeutung<sup>17</sup>. Am distalen Ende der Schäfte bilden sich, als tränenförmige Strukturen, die zukünftigen Thrombozyten. In ihnen wickeln sich die Mikrotubuli-Filamente zu einer Spirale auf und bilden das sogenannte *Marginal Band*. Nach der Freisetzung der Thrombozyten in den Blutstrom gibt dieses den Thrombozyten ihre charakteristische diskoidale Form<sup>17</sup>. Erstaunlich bleibt die Erkenntnis, dass aus einem Proplättchen morphologisch gleichförmige Thrombozyten, mit einem nur gering schwankenden mittleren Volumen (Kapitel 1.2.2), entstehen. Die Untersuchung des Thrombozytenvolumens lässt so wichtige Rückschlüsse auf Veränderungen der Megakaryozytenreifung und der Proplättchenbildung zu.

### **1.1.3 Das Endprodukt der Thrombozytopoese: Der Thrombozyt**

1882 konnte Bizzozero den Thrombozyt als eigenständigen Bestandteil des Blutes nachweisen<sup>18</sup>. Er erkannte, dass nicht die Leukozyten, sondern die Thrombozyten eine essentielle Rolle für die Thrombusbildung spielen, und prägte zudem ihre heutige Bezeichnung als „Thrombozyten“<sup>18,19</sup>. Hierbei handelt es sich um diskoidale, anukleäre Zellfragmente, mit einem Durchmesser von 1,5-3 µm und einer vergleichsweise kurzen Lebensdauer von 8-10 Tagen. Sie erscheinen erstmals in der 5. Embryonalwoche in der fetalen Zirkulation. Die Thrombozytenzahl nimmt linear zu und erreicht um die 26. Woche post menstruationem (p. m.) Werte, wie sie auch bei Erwachsenen vorliegen<sup>20</sup>.

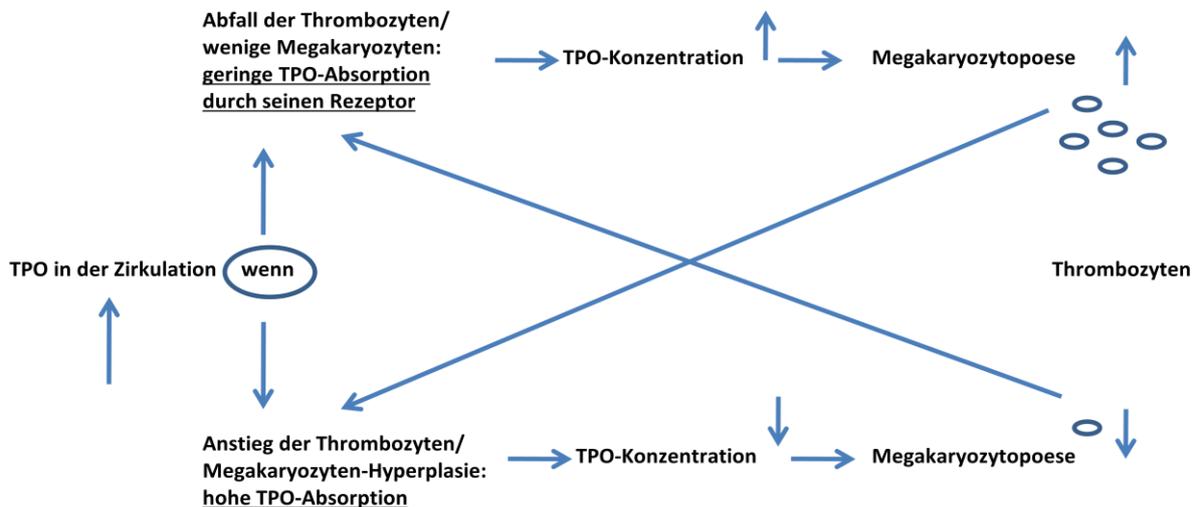
Thrombozyten sind essentiell für die primäre Hämostase. In Folge einer Schädigung von Blutgefäßen kommt es zur Aktivierung der Thrombozyten und Ausbildung von Pseudopodien und Adhäsion der Thrombozyten. Es entsteht ein Thrombozytenaggregat, das zum Verschluss der entstandenen Läsion führt. Sind zu wenige Thrombozyten vorhanden, ist die Funktion der Blutstillung eingeschränkt. In der Folge können sich Blutungen entwickeln. Dieser Zustand wird als Thrombozytopenie bezeichnet und stellt eine der häufigsten hämorrhagischen Diathesen dar (Kapitel 1.3). Ein Anstieg der Thrombozyten über den physiologischen Normwert hinaus wird hingegen als Thrombozytose bezeichnet. Weiterhin sind Thrombozyten mit der angeborenen sowie adaptiven Immunität des Körpers eng verknüpft sind und spielen eine zentrale Rolle in Entzündungsreaktionen.

Ein gesunder menschlicher Körper ist in der Lage, täglich bis zu  $2 \times 10^{11}$  Thrombozyten zu produzieren. Diese Zahl kann bei erhöhtem Bedarf noch um das 20-fache und mehr gesteigert werden<sup>21</sup>. Seit der Erstbeschreibung durch Bizzozero hat das Wissen über die Struktur der Thrombozyten stark zugenommen. Die Morphologie und das Volumen der Thrombozyten (Kapitel 1.2.2) sind abhängig vom Aufbau des thrombozytären Zytoskeletts. Hierfür spielt, wie oben aufgeführt, der Prozess der Proplättchenbildung aus Megakaryozyten eine entscheidende Rolle. Unterhalb der Plasmamembran verfügen Thrombozyten über eine ringförmige Anordnung von Spektrin-Tetrameren, die durch Aktinfilamente und weitere Proteine miteinander verbunden sind<sup>22</sup>. Aktin ist ein Protein, das sich während der Aktivierung der Thrombozyten zu Fibrillen formiert, die für die Bildung der Pseudopodien essentiell sind. Dieses ringförmige Zytoskelett trägt wie das bereits beschriebene *Marginal Band* zur Aufrechterhaltung der diskoiden Form der Thrombozyten bei<sup>23,24</sup>. Für diese Studie ist von großer Bedeutung, dass Thrombozyten einen geringen Anteil an residueller mRNA enthalten, der den Megakaryozyten entstammt<sup>25,26</sup>. Der mRNA-Gehalt nimmt im Laufe der Lebensspanne der Thrombozyten immer weiter ab und ermöglicht die Differenzierung von jungen und alten Thrombozytenpopulationen (Kapitel 1.2.7).

#### **1.1.4 Thrombopoetin (TPO) in der Regulation der Megakaryozytopoese**

Für die Bildung und Reifung der Megakaryozyten ist der hämatopoetische Wachstumsfaktor TPO von besonderer Bedeutung, dessen Rezeptor c-Mpl auf megakaryozytären Vorläuferzellen, Megakaryozyten und Thrombozyten exprimiert wird<sup>21,27</sup>. Kelemen *et al.* postulierte im Jahr 1958 als Erster einen spezifischen Wachstumsfaktor für die Thrombozytopoese und prägte dessen Bezeichnung als Thrombopoetin<sup>28</sup>. 1994 wurde TPO von unabhängigen Gruppen kloniert und isoliert<sup>29,30</sup>. TPO wird hauptsächlich in der Leber produziert und unabhängig von der Anzahl an Thrombozyten konstitutiv in das Blut abgegeben<sup>31,32,33</sup>. Neben der Leber tragen jedoch auch die Nieren, die Milz, glatte Muskelzellen und Stromazellen des Knochenmarks zur Produktion von TPO bei<sup>34,35</sup>. Aktuelle Studien legen nahe, dass die TPO-Plasmakonzentration hauptsächlich über einen end-zellvermittelten Mechanismus reguliert wird. Demnach ist die TPO-Konzentration im Plasma abhängig von der Masse an c-Mpl-Rezeptoren auf Megakaryozyten, Thrombozyten und ihren Vorläuferzellen. Liegen normale Thrombozytenzahlen vor, wird TPO an seinen Rezeptor gebunden und anschließend internalisiert. Die das Knochenmark erreichenden TPO-Wirkspiegel werden im Vergleich auf einem relativ geringen Niveau

gehalten. Die Stimulation der Megakaryozytopoese führt so zu normalen Thrombozytenzahlen. Ein Abfall der Thrombozyten führt zu einer verringerten Entfernung von TPO aus der Zirkulation, da durch die Abnahme an Thrombozyten auch die Dichte an c-Mpl-Rezeptoren abnimmt. Hierdurch steigen die TPO-Spiegel an und es erreichen größere Mengen das Knochenmark. TPO führt dort zur Proliferation und Differenzierung der Megakaryozyten. In der Folge kommt es zu einer gesteigerten Thrombozytenproduktion und konsekutiv zu einem Anstieg der Thrombozytenzahl in den physiologischen Normalbereich. Parallel zur Normalisierung der Thrombozytenzahlen steigt auch die Anzahl an c-Mpl-exprimierenden Zellen wieder an. TPO wird vermehrt aus der Zirkulation entfernt und die TPO-Werte sowie die Stimulation der Megakaryozytopoese erreichen wieder ein normales Niveau (Abbildung 3)<sup>36</sup>. Neben TPO sind die Interleukine 3,-6 und -11, der *Stem Cell Factor* (SCF) und der c-kit-Ligand im Zusammenspiel mit TPO ebenfalls von Bedeutung für die Bildung und Reifung der Megakaryozyten<sup>21</sup>. Diese Faktoren haben jedoch nur geringes Differenzierungspotential.



**Abbildung 3.** Regelkreis von Thrombopoetin (TPO) zur Kontrolle der Thrombozytenzahl. Abbildung modifiziert nach Kuter *et al.*<sup>36</sup>.

## 1.2 Einführung der Thrombozytenparameter

Im Gegensatz zu den Erythrozyten, deren morphologische Charakteristika in der klinischen Routine einen wichtigen diagnostischen Wert besitzen, hat die Evaluation der Thrombozyten bisher kaum Weg in die Klinik gefunden. Oft reicht die Thrombozytenzahl allein nicht aus, um z. B. das mit einer Thrombozytopenie assoziierte Blutungsrisiko einschätzen zu können. So ist in Kindern nach myeloablativer Therapie vor hämatopoetischer Stammzelltransplantation das Blutungsrisiko deutlich höher als in Patienten mit ITP (Kapitel 1.3.1). Zudem gibt die Thrombozytenzahl allein keine Informationen über die Ätiologie der Thrombozytopenie oder den qualitativen und quantitativen Ablauf der Thrombozytopoese. Erst wenn die Ursache einer Thrombozytopenie bekannt ist, können die besten Optionen für ihre Therapie gewählt werden. Neben der Thrombozytenzahl können seit einigen Jahren mit Hilfe spezieller automatisierter Blutzählgeräte zusätzliche Thrombozytenparameter bestimmt werden, welche Auskunft über die Größe, Granularität und Reife der Thrombozytenpopulation liefern. Studienergebnisse beziehen sich bisher zumeist auf Erwachsene, so dass zum heutigen Zeitpunkt nur wenige Informationen über Thrombozytenparameter in Kindern und Jugendlichen zur Verfügung stehen. Im folgenden sollen die für die vorliegende Studie in hämatologisch gesunden sowie in verschiedenen pädiatrischen Patientengruppen gemessenen Thrombozytenparameter eingeführt werden. Diese Parameter wurden in Bezug auf verschiedene Fragestellungen untersucht (Kapitel 1.4). Eine genauere Beschreibung ihrer Analyse erfolgt in Kapitel 2.

### 1.2.1 Thrombozytenzahl (PLT)

Die PLT im peripheren Blut wird bei gesunden Erwachsenen und Kindern zwischen 150/nl und 400/nl angegeben. Die intraindividuelle Variation innerhalb eines Tages beträgt 6,75%, von Tag zu Tag 11,5%, und von Monat zu Monat 10,7%<sup>37,38</sup>. Die verschiedenen Möglichkeiten zur Messung der PLT werden in Kapitel 2.2.1 erläutert.

In Frauen wurden in einigen Studien statistisch signifikant höhere PLT-Werte im Vergleich zu Männern gefunden. Hierfür werden u. a. differierende Hormonprofile von Frauen verantwortlich gemacht. Zudem könnte der durch die Menstruation der Frauen bedingte Blutverlust kompensatorisch für die höheren PLT-Werte der Frauen verantwortlich sein<sup>39</sup>. Dafür spricht auch, dass in postmenopausalen Frauen niedrigere PLT-Werte gefunden wurden als bei jungen

menstruierenden Frauen<sup>40</sup>. Bei gesunden Kindern wurden ebenfalls höhere PLT-Werte bei Mädchen im Vergleich mit Jungen gefunden<sup>41</sup>, sowie eine negative Korrelation von PLT mit dem Alter<sup>42</sup>.

### **1.2.2 Mean Platelet Volume (MPV)**

Das MPV beschreibt das mittlere Thrombozytenvolumen einer Thrombozytenpopulation und ist in Analogie zum *Mean Corpuscular Volume* (MCV) der Erythrozyten entwickelt worden. Bereits seit den frühen achtziger Jahren kann es mit der Hilfe von automatisierten Zellzählern ermittelt werden<sup>43,44</sup>. Da verschiedene Antikoagulantien, Messtechniken sowie Lagerungszeiten das MPV beeinflussen können, sollte der Vergleich verschiedener Studien zum MPV mit großer Vorsicht behandelt werden<sup>45</sup>. Das MPV wird während der Thrombozytopoese festgelegt und zeigt eine inverse Beziehung zur Polyploidität der Megakaryozyten. Bei gesunden Erwachsenen fiel das MPV mit dem Alter ab und zeigte eine negative Korrelation zur PLT<sup>46-48</sup>. In Kindern zeigte sich hingegen ein Anstieg des MPV mit dem Alter und ebenfalls eine negative Korrelation zur PLT<sup>41</sup>. Thrombozytopenien können u. a. nach dem MPV eingeteilt werden. Dabei werden Thrombozytopenien mit erniedrigtem MPV als Mikrothrombozytopenien und solche mit erhöhtem MPV als Makrothrombozytopenien bezeichnet. So weisen z. B. am Wiskott- Aldrich Syndrom (WAS) erkrankte Patienten in der Regel im Vergleich mit gesunden Kontrollen kleinere Thrombozyten auf. Diese Erkrankung ist neben einer Mikrothrombozytopenie durch rekurrende Infektionen und Ekzeme charakterisiert. Wichtig ist bei dieser Einteilung zu beachten, dass die Zuordnung aufgrund des MPV abhängig von der jeweiligen Messmethode sowie den angewandten Normwerten ist. An ITP erkrankte Patienten (Kapitel 1.3.1) zeigten eine signifikante Erhöhung des MPV<sup>49</sup> und eine suffiziente Sensitivität und Spezifität von MPV für die Diagnosestellung der ITP und deren Abgrenzung von Thrombozytopenien mit hypoproliferativem Knochenmark<sup>50</sup>.

### **1.2.3 Plateletcrit (PCT)**

Der PCT wurde in Analogie zum Hämatokrit der Erythrozyten entwickelt. Er beschreibt die Masse der vorhandenen Plättchen und wird definiert als das Produkt von MPV und PLT. Bei

gesunden Kindern fiel der PCT mit dem Alter ab. Während der Pubertät zeigten Mädchen jedoch einen signifikanten Anstieg<sup>41</sup>. Weitere geschlechtsspezifische Unterschiede konnten bisher nicht festgestellt werden<sup>42</sup>.

#### **1.2.4 Platelet Deviation Width (PDW)**

Die PDW ist ein Maß für die Heterogenität der Volumina der Thrombozyten. Ist diese besonders groß, spricht man von Thrombozytenanisozytose. Die PDW ist demnach vergleichbar mit der *Red Cell Distribution Width* (RDW) für die Erythrozyten. Bisher liegen nur einzelne Studien zur PDW in Kindern vor.

In gesunden Kindern wurden keine altersabhängigen Veränderungen der PDW und keine geschlechtsspezifischen Unterschiede festgestellt<sup>42</sup>. Bestimmte Thrombozytopenien mit Makrothrombozyten, wie das Alport-Syndrom, die May-Hegglin Anomalie oder das Bernard-Soulier Syndrom, weisen eine erhöhte PDW auf<sup>51</sup>. Auch Patienten mit myeloproliferativem Syndrom können eine erhöhte PDW aufweisen<sup>52</sup>. Zudem kann die PDW bei einer akuten Blutung und Thrombozytenbildungsstörungen, wie z.B. der aplastischen Anämie erhöht sein. Für die Diagnosestellung der ITP besitzt die PDW eine ausreichende Sensitivität und Spezifität<sup>51</sup>. Bei Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) zum Zeitpunkt der Diagnose war die PDW im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erniedrigt<sup>54</sup>.

#### **1.2.5 Platelet-Large Cell Ratio (P-LCR)**

Das P-LCR gibt den Bruchteil aller Thrombozyten an, die ein Volumen größer als 12fl aufweisen. Der Wert gibt demnach Auskunft darüber, wie groß der prozentuale Anteil an besonders großen Thrombozyten bezogen auf die gesamte Thrombozytenpopulation ist. Thrombozytenaggregate, Riesenthrombozyten oder Mikroerythrozyten können zu einem falsch hohen P-LCR-Wert führen. ITP-Patienten wiesen erhöhte P-LCR-Werte auf<sup>53</sup>. Im Gegensatz dazu zeigten Patienten mit Thrombozytose signifikant niedrigere Werte im Vergleich mit gesunden Kontrollen<sup>55</sup>.

### 1.2.6 *Platelet-Mean Frequent Volume (P-MFV)*

Das P-MFV gibt dasjenige Volumen der Thrombozyten an, welches in einer Thrombozytenpopulation am häufigsten vorkommt. Es wird in fl angegeben. Es ist ein reiner Forschungsparameter, zu dem es bislang nur unsere Studie gibt.

### 1.2.7 *Retikulierte Plättchen (RP) und Immature platelet fraction (IPF)*

1969 wiesen Ingram und Coopersmith nach der Induktion eines akuten Blutverlustes erstmals in Beagle-Hunden große Thrombozyten mit granuliertem Zytoplasma nach<sup>56</sup>. Die Thrombozyten waren reaktiver als reife Thrombozyten und enthielten residuelle RNA<sup>57</sup>. Sie wurden in Analogie zu den Retikulozyten, den Vorläuferzellen der Erythrozyten, zunächst als retikulierte Plättchen (RP) bezeichnet. Im Jahre 1990 zeigten Kienast und Schmitz, dass die in den retikulierten Plättchen enthaltene, residuelle RNA mit dem Farbstoff Thiazol-Orange (TO) anfärbbar ist und die Identifizierung der retikulierten Plättchen mittels Durchflußzytometrie ermöglicht<sup>58</sup>. Dieser Farbstoff war eigentlich für die Analyse von Retikulozyten entwickelt worden. Kienast und Schmitz zeigten auch, dass die TO-positiven Thrombozyten hilfreich in der Differenzierung von Thrombozytopenien aufgrund defizienter Produktion und erhöhtem Thrombozytenverbrauch sein können<sup>58</sup>. 1995 konnte Dale *et al.* beweisen, dass die TO-positiven Thrombozyten eine Fraktion von frisch synthetisierten, jungen Thrombozyten darstellen, die innerhalb von 24 h ihre TO-Positivität verlieren<sup>59</sup>.

Die jungen Thrombozyten enthalten ein grobkörniges, unterbrochenes Retikulum, das mit zunehmendem Alter der Thrombozyten abgebaut wird. Die residuelle RNA der jungen Thrombozyten entstammt den Megakaryozyten. Es wird angenommen, dass die jungen Thrombozyten funktionsfähiger und metabolisch sowie enzymatisch aktiver sind als reife, ältere Thrombozyten<sup>60</sup>. Deshalb erscheint die Bezeichnung als „unreife Thrombozyten“ im Grunde unpassend. Die mit modernen, automatisierten hämatologischen Analysegeräten gemessenen unreifen Thrombozyten werden als *Immature Platelet Fraction (IPF)* bezeichnet. Der Wert kann in relativen (IPF%) und absoluten Zahlen (IPF#) angegeben werden. Die Methoden zur Messung der IPF werden in Kapitel 2.2.2 näher beschrieben. Es ist bekannt, dass mit Hilfe der IPF eine Beurteilung der Thrombozytopoeserate möglich ist<sup>58,61,62</sup>. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass der mRNA-Gehalt der Thrombozyten direkt mit der Aktivität der Megakaryozyten in Patienten mit Thrombozytopenie korreliert<sup>61-64</sup>. Zwischen der IPF und der Anzahl der reifen

Thrombozyten (PLT) zeigt sich eine inverse Beziehung. Nachdem die unreifen, jungen Thrombozyten aus dem Knochenmark freigesetzt werden, nimmt ihr Volumen graduell ab und auch die intrazelluläre mRNA wird nach und nach minimiert<sup>60</sup>. Dieser Prozess der Degradation, welcher innerhalb der ersten 24h nach Freisetzung der Thrombozyten aus dem Knochenmark stattfindet, führt zu einem Anstieg von PLT und in der Folge zu einer Abnahme der IPF<sup>59,65</sup>. Da die IPF die Aktivität der Thrombozytopoese widerspiegelt, kann sie helfen, die Ätiologie verschiedener Formen von Thrombozytopenien besser zu definieren. Eine Thrombozytopenie verbunden mit einem niedrigem IPF-Wert lässt auf eine Produktionsstörung im Knochenmark mit einer verminderten Thrombozytopoese schließen. Eine Thrombozytopenie verbunden mit einem erhöhten IPF-Wert hingegen lässt einen verstärkten Abbau von Thrombozyten in der Peripherie, verbunden mit einer kompensatorisch gesteigerten Thrombozytopoese, vermuten.

## 1.2.8 RP- und IPF-Werte im gesunden Erwachsenen und Kind

In der Vergangenheit haben sich verschiedene Studien mit der Etablierung von RP- und IPF%-Werten in gesunden Erwachsenen beschäftigt. Tabelle 1 fasst die Ergebnisse der Studien für Erwachsene der Jahre 1990 bis 2008 zusammen<sup>49,57,58,66-80</sup>.

**Tabelle 1.** Studienergebnisse der Jahre 1990-2008 für Referenzwerte von RP%- und IPF% in gesunden Erwachsenen.

<b>Studien zu RP (Journal)</b>	<b>RP [%] (Mittelwert ± SD)</b>
Monteagudo <i>et al.</i> 2008 (QJM)	1,3
Thomas-Kaskel <i>et al.</i> 2007 (Cytometry B Clin Cytom)	5,0
Kickler <i>et al.</i> 2006 (Am J Clin Pathol.)	3,1
Salvagno <i>et al.</i> 2006 (Platelets)	6,13 ± 3,09
Butkiewicz <i>et al.</i> 2006 (Thromb Res.)	1,51 ± 0,42
Saxonhouse <i>et al.</i> 2004 (J Pediatr. Hematol. Oncol.)	1,1 ± 0,5
Macchi <i>et al.</i> 2002 (Eur j Haematol)	5,7 ± 2,4
Robinson <i>et al.</i> 2000 (Clin Lab Haematol)	16,4
Saxon <i>et al.</i> 1998 (J Pediatr Hematol Oncol.)	7,9 ± 2,9
Koike <i>et al.</i> 1998 (Thromb Haemost.)	2,17 ± 0,9
Ogata <i>et al.</i> 1998 (Kurume Med. J.)	1,92 ± 1,27
Harrison <i>et al.</i> 1997 (Platelets)	8,6 ± 2,8
Rinder <i>et al.</i> 1993 (Arch Pathol Lab Med)	2,9 ± 2,2
Ault <i>et al.</i> 1993 (ANN N Y Acad Sci)	0,9 ± 0,1
Kienast <i>et al.</i> 1990 (Blood)	8,6 ± 2,8
<b>Studien zu IPF (Journal)</b>	<b>IPF [%] (Mittelwert ± SD, Spannweite)</b>
Takami <i>et al.</i> 2007 (Bone Marrow Transplantation)	2 ± 1,1 (0,5-5,7)
Abe <i>et al.</i> 2006 (Thrombosis Research)	3,3 (1,0-10,3)
Briggs <i>et al.</i> 2004 (Transfusion Medicine)	3,9 (1,1-6,1)

Die Mittelwerte für RP% zeigen große Unterschiede, mit einer Spannweite von 0,9-16,4%. Die Mittelwerte der IPF%-Werte schwanken weniger stark, mit einer Spannweite von 2-3,9%. Abe *et al.* konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede im RP% von Erwachsenen feststellen<sup>81</sup>.

Bonan *et al.* fanden hingegen höhere RP%-Werte in Frauen als in Männern und auch in gesunden Neugeborenen wurden höhere RP%-Werte in Mädchen als in Jungen gemessen. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant<sup>82,83</sup>.

Bisher liegen keine Studienergebnisse zu Referenzwerten der Thrombozytenparameter von genügend großen Gruppen vollkommen gesunder Kindern vor. Saigo *et al.* bestimmte die Referenzwerte für IPF% nicht in gesunden Kindern, sondern in 30 kranken Kinder, in denen das Knochenmark eine normale Funktion aufwies, sich die Thrombozyten und Leukozyten im Normalbereich befanden und kein G-CSF gegeben wurde. Der Mittelwert für IPF% lag bei 2,6% und PLT und IPF zeigten eine signifikante negative Korrelation<sup>84</sup>. Für die Studie von Rajantie *et al.* wurden die Werte für PLT, RP und MPV zwar in gesunden, insgesamt jedoch nur in 6 Kindern bestimmt. Der Median für RP lag bei 1,5% und für das MPV bei 9 fl<sup>85</sup>.

### **1.3 Häufigste hämorrhagische Diathese im Kindesalter: Die Thrombozytopenie**

Die Hauptursachen für eine Thrombozytopenie können in drei Kategorien unterteilt werden: Zunächst kann eine Thrombozytopenie durch eine angeborene oder erworbene verminderte Produktion von Thrombozyten bedingt sein. Weiterhin kann ein vermehrter Abbau von Thrombozyten in der Peripherie ursächlich sein, der entweder immunologisch oder nicht-immunologisch bedingt ist. Zudem kann es zu einer Sequestration von Thrombozyten, v. a. in der Milz, aber auch in anderen Organen, kommen. Die Milz beherbergt unter normalen Umständen ungefähr ein Drittel aller Thrombozyten<sup>86</sup>. Kommt es zu einer Vergrößerung des Organs, steigt der dort gespeicherte Anteil an Thrombozyten.

Es ist deshalb sehr wichtig, die Ursache der verschiedenen Thrombozytopenien zu erkennen, da hiervon u. a. die Wahl der Therapie abhängt. Potentielle Ursachen für falsch niedrige Thrombozytenzahlen schließen eine Aktivierung der Thrombozyten während der Blutentnahme, Riesenthrombozyten oder eine Pseudothrombozytopenie als Folge der *in vitro* Agglutination von Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-abhängigen Antikörpern mit ein<sup>87</sup>.

Eine Thrombozytopenie kann altersunabhängig in verschiedene Schweregrade eingeteilt werden: PLT= 50-100/nl milde, PLT= 29-50/nl mittelgradige, PLT unter 20/nl schwere Thrombozytopenie.

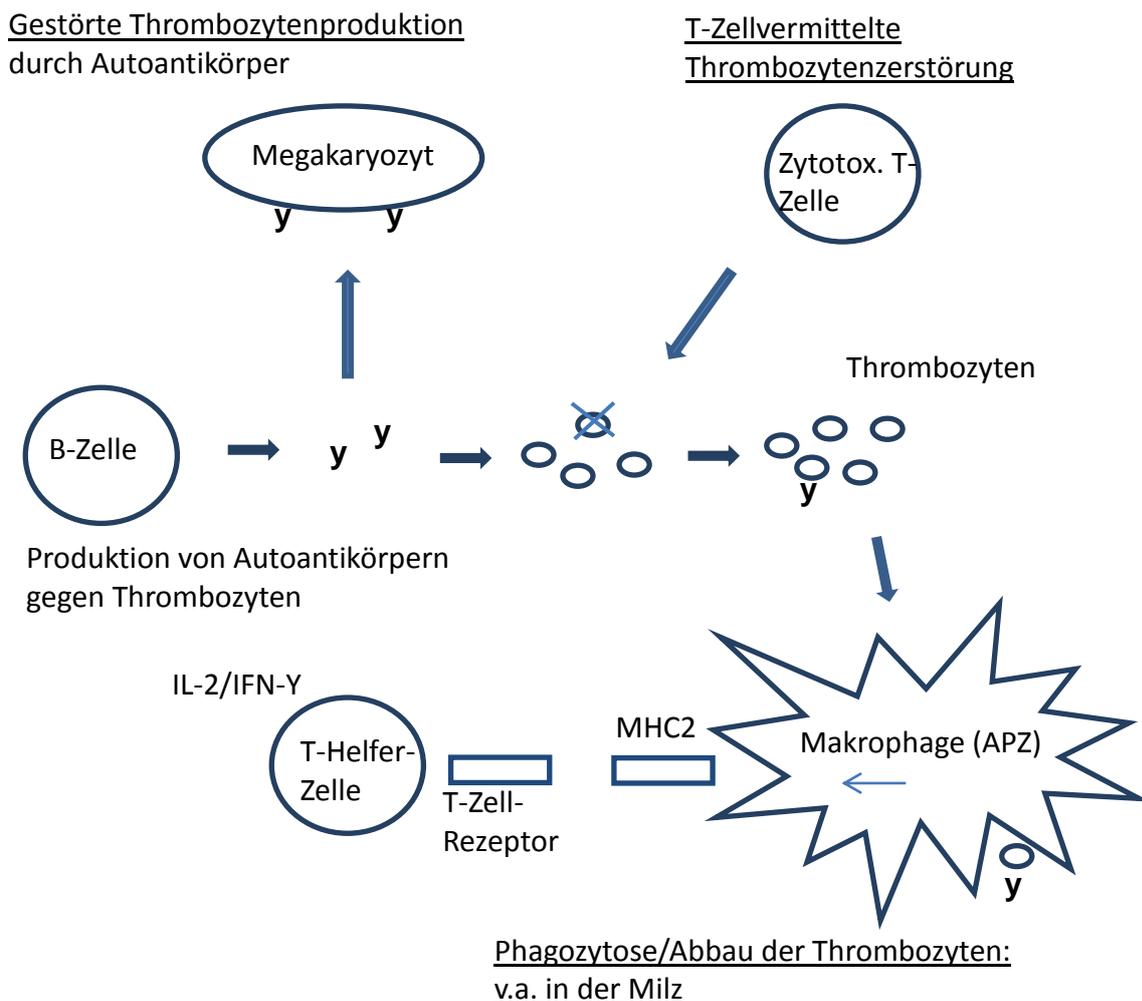
### 1.3.1 Idiopathische Thrombozytopenische Purpura (ITP)

Mit einer Inzidenz von 4 auf 100.000 Kinder pro Jahr ist die ITP die häufigste erworbene hämorrhagische Diathese im Kindesalter<sup>88</sup>. Sie ist charakterisiert durch einen immunologisch bedingten Abbau von mit Autoantikörpern beladenen Thrombozyten durch Makrophagen des retikuloendothelialen Systems. Ältere und neuere Untersuchungen zu radioaktiv <sup>51</sup>Cr und <sup>111</sup>In markierten Thrombozyten von ITP-Patienten erbrachten kontroverse Ergebnisse die Überlebenszeit der Thrombozyten und die Thrombozytenproduktion betreffend<sup>89</sup>. Zum einen scheint ein verstärkter peripherer Abbau von Thrombozyten mit verminderter Thrombozytenlebenszeit in einem Teil der Patienten zum Abfall der PLT zu führen. Kompensatorisch kann dies zu einer Aktivitätssteigerung der Megakaryozytopoese führen, die jedoch nicht ausreicht, um den Thrombozytenwert im Normbereich zu halten<sup>90</sup>. Die klassische Steigerung der Megakaryozytopoese liegt jedoch nicht immer vor. Oftmals ist das Knochenmark von ITP-Patienten auch normozellulär und in Einzelfällen kann es sogar hypozellulär oder mit isoliert reduzierter Megakaryozytopoese imponieren. In Kindern mit ITP wurden normale oder leicht erhöhte Thrombopoetin-Konzentrationen gemessen<sup>91</sup>.

Die Pathophysiologie der ITP ist komplex und noch nicht zu allen Teilen verstanden. Eine wesentliche Rolle spielt der Verlust peripherer Toleranzmechanismen, der zu einer Produktion von Autoantikörpern gegen bestimmte Thrombozytenantigene führt<sup>92</sup>. 1951 konnte erstmals gezeigt werden, dass die Infusion von Plasma von ITP-Patienten bei gesunden Individuen zu einem Abfall der PLT führte<sup>93</sup>. Einige Zeit danach konnte nachgewiesen werden, dass dieser Effekt auf ein Immunglobulin zurückzuführen ist<sup>94</sup>. Heute weiß man, dass die Autoantikörper von ITP-Patienten zumeist gegen die Glykoproteine GPIIb/IIIa und GPIb/IX auf der Zelloberfläche der Thrombozyten gerichtet sind und überwiegend der Immunglobulinklasse IgG angehören<sup>92</sup>. Zelluläre Mechanismen scheinen eine zentrale Rolle in der Entstehung der ITP zu spielen. So konnte nachgewiesen werden, dass die Produktion von Thrombozytenautoantikörpern durch B-Zellen die Anwesenheit von Antigen-spezifischen, CD4-positiven T-Helfer-Zellen erfordert<sup>90</sup>.

Obwohl der verstärkte Abbau der mit Autoantikörpern bedeckten Thrombozyten eine wichtige Rolle in der Pathogenese der ITP spielt, wurden weitere der Entstehung der ITP zu Grunde liegende Mechanismen beschrieben. Zum einen wurde die Bindung der Autoantikörper an Megakaryozyten diskutiert, die in der Folge die Reifung der Megakaryozyten beeinträchtigen und zu einem intramedullären Untergang von Megakaryozyten und Thrombozyten führen

könnten<sup>95</sup>. Zum anderen wurde ein negativer Einfluss der Autoantikörper auf die Proplättchenformation in erwachsenen ITP-Patienten beschrieben, sowie eine mögliche Zerstörung von Thrombozyten durch zytotoxische T-Zellen<sup>96</sup>. Abbildung 4 stellt die Pathophysiologie der ITP in vereinfachter Form da. Vermutlich variiert die Bedeutung der einzelnen Mechanismen, welche zur Entstehung der Erkrankung beitragen, von Patient zu Patient.



**Abbildung 4.** Vereinfachte Darstellung der Pathophysiologie der ITP. (APZ = Antigenpräsentierende Zelle, IL-2 = Interleukin-2, IFN-γ = Interferon-gamma, MHC2 = major histocompatibility complex 2, Y = Antikörper).

Die ITP beginnt oft plötzlich und führt zum Auftreten von Hämatomen und/oder petechialen Einblutungen. Das Allgemeinbefinden der Kinder ist dabei nur wenig bis gar nicht beeinträchtigt. Mehr als 80-90% aller Kinder mit ITP bleiben, trotz niedriger

Thrombozytenwerte, von schweren Blutungen verschont und benötigen keine Behandlung. Intrakranielle Blutungen (*Intracranial Hemorrhage* = ICH) kommen in weniger als 1% aller Patienten vor, unabhängig davon, ob eine Therapie durchgeführt wurde oder nicht<sup>88</sup>. Das Auftreten einer Hepatosplenomegalie oder Lymphadenopathie ist als untypisch anzusehen. Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahrzehnten gibt es immer noch keinen einfachen, diagnostischen Test für die ITP. Die Diagnose beruht auf dem Ausschluss anderer Erkrankungen. Hierzu gehören u. a. die mit der ALL des Kindesalter assoziierte Thrombozytopenie (Kapitel 1.3.2), kongenitale Thrombozytopenien (KT, Kapitel 1.3.3) sowie sekundäre Thrombozytopenien (mit HIV oder SLE = systemischer Lupus erythematoses assoziiert). Nach den Richtlinien der *American Society for Hematology* sprechen eine unauffällige klinische Untersuchung, abgesehen von den bereits genannten Petechien und Hämatomen, sowie ein großes Blutbild mit einer isolierten Thrombozytopenie als einzige Veränderung für das Vorliegen einer ITP. Zudem sollte ein unauffälliger peripherer Blutaussstrich vorliegen. Eine Untersuchung des Knochenmarks zur Diagnosestellung wird in ITP-Patienten als nicht notwendig beschrieben. Die megakaryopoetische Aktivität und die Dynamik der Thrombozytopenie bleiben so in den meisten Fällen unbekannt. Eine Untersuchung des Knochenmarks wird nur in Patienten mit atypischen Verläufen empfohlen. Dazu zählen u. a. Patienten, die unter Müdigkeit, Fieber, Gelenkschmerzen, Anämie, Neutropenie und Hepato- und/oder Splenomegalie leiden<sup>92</sup>. Neben atypischen Verläufen kann bei Therapieversagen und lang andauernden Verläufen eine Untersuchung des Knochenmarks in Erwägung gezogen werden<sup>97</sup>. Weiterhin offen bleibt die Frage, ob in Kindern mit einer typisch verlaufenden akuten ITP, für die eine Therapie mit Kortikosteroiden in Betracht kommt, eine Knochenmarkuntersuchung durchgeführt werden sollte. Diese Untersuchung könnte eine potentiell zu Grundliegende Leukämie und deren fälschliche Behandlung als ITP verhindern<sup>74</sup>. Wann und wie genau ein Kind mit akuter ITP behandelt werden sollte, bleibt eine viel diskutierte Frage<sup>88,97-100</sup>.

### **1.3.1.1 Akute versus chronische ITP**

Im Kindesalter tritt die ITP zu einem Anteil von 70-80% als eine akute Erkrankung (aITP), häufig nach einem Virusinfekt oder seltener einer Lebendimpfung, auf<sup>85</sup>. Der Zeitraum zwischen dem Infekt und dem Beginn von Blutungszeichen beträgt ca. 2 Wochen. Die aITP ist

grundsätzlich eine gutartige Erkrankung mit selbst limitierendem Verlauf. Sie bildet sich in der Mehrzahl der Patienten innerhalb einiger Wochen und Monaten wieder zurück. Nach 4-8 Wochen erreicht ca. die Hälfte der Kinder eine Remission, nach 3 Monaten ca. zwei Drittel. Prädiktoren für eine frühe Remission sind ein abrupter Beginn der Erkrankung, eine vorhergehende virale Infektion, Alter unter 10 Jahren, Schleimhautblutungen und ein initialer Thrombozytenwert  $< 5/nl$ .

Als cITP wurde bisher eine isolierte Thrombozytopenie bezeichnet, die länger als 6 Monate persistiert. Diese Definition wird jedoch inzwischen in Frage gestellt, da gezeigt werden konnte, dass im 2. Halbjahr nach Diagnosestellung noch ca. 10% der Kinder eine Remission erreichen<sup>101,102</sup>. In den letzten Jahren hat sich daher eine neue Einteilung etabliert nach der in Kindern, die innerhalb von 3-12 Monaten eine Remission erreichen, die Erkrankung nicht als chronische, sondern als persistierende ITP bezeichnet wird. Erst wenn die Erkrankung länger als 12 Monate anhält wird sie demnach als chronisch klassifiziert<sup>103</sup>.

Ein schleichender Beginn sowie ein Alter von mehr als 10 Jahren bei Diagnosestellung sind mit der cITP assoziiert. Zudem liegt der Anteil an Mädchen in der Gruppe deutlich höher<sup>86</sup>. Kinder mit cITP weisen weiterhin zu Anfang ihrer Erkrankung eine höhere mittlere Thrombozytenzahl auf als aITP-Patienten<sup>104</sup>. Die TPO-Werte von aITP- und cITP- Patienten, welche zumeist im Bereich von Normalspendern liegen, unterscheiden sich hingegen nicht<sup>105</sup>.

Zur Zeit ist noch nicht bekannt, warum die ITP in einigen pädiatrischen Patienten einen akuten und in anderen einen chronischen Verlauf nimmt und ob es sich um eine von einer akuten in eine chronische Phase übergehende oder vielleicht sogar zwei verschiedene Krankheitsentitäten handelt. Beide Verläufe sind immunvermittelt, jedoch könnten verschiedene Pathomechanismen zugrunde liegen, worauf Unterschiede in der Immunität von aITP- und cITP-Patienten hinweisen. Die Anzahl an anti-GPIIb/IIIa-Antikörpern und ihre Bindungsratio lag in pädiatrischen Patienten mit cITP sehr viel höher als in aITP- Patienten<sup>106</sup>. Der Anteil an Patienten, deren Werte für IL-2, IFN- $\gamma$  und/oder IL-10 erhöht waren, war in der Gruppe der cITP-Patienten größer<sup>107</sup>. Weiterhin wurde in cITP-Patienten eine hohe Ratio von Th1/Th2-Zellen gefunden<sup>108</sup>.

Die Aufklärung der verschiedenen Pathomechanismen könnte dazu beitragen, Kinder mit akuter ITP, die eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine Chronifizierung aufweisen, frühzeitig zu erkennen und den Verlauf der Erkrankung besser einschätzen zu können.

Mehrere Studien berichteten über erhöhte RP%- und IPF%-Werte in erwachsenen Patienten mit ITP. Die absoluten Werte waren im Vergleich dazu erniedrigt<sup>57,109</sup>. Zudem zeigte sich eine

statistisch signifikante inverse Korrelation zwischen PLT und RP%, und die Sensitivität und Spezifität von RP% für die Diagnose der ITP waren exzellent. Besonders die Messung von RP% zusammen mit TPO zeigte gute Ergebnisse<sup>109</sup>. In ITP-Patienten mit einem typischen Verlauf und einem signifikanten IPF%-Anstieg kann auf eine Knochenmarkuntersuchung verzichtet werden<sup>57</sup>. In Kindern mit ITP wurden erhöhte RP%-Werte, in Assoziation mit einer gesteigerten Thrombozytopenie zum Zeitpunkt der Diagnose, gefunden. Es zeigte sich eine negative Korrelation zwischen PLT und RP% und eine positive Korrelation zwischen RP% und MPV sowie RP% und TPO. Zudem wurde eine Beziehung zwischen den RP%-Werten und dem Ansprechen auf Therapie beschrieben. Ein RP%-Wert >15% war mit einem besseren Ansprechen auf Steroidtherapie und Splenektomie assoziiert<sup>85</sup>.

### 1.3.1.2 Blutungsneigung in ITP-Patienten

Die Einschätzung der Blutungsneigung in ITP-Patienten ist bisher, aufgrund fehlender Marker, problematisch. Die richtige Einschätzung erscheint jedoch gerade im Hinblick auf Therapieentscheidungen imminent. Bisher orientieren sich Therapieentscheidungen hauptsächlich am PLT-Wert<sup>71</sup>. Die Schwere von Blutungen in Kindern mit ITP zeigt normalerweise eine inverse Beziehung mit der PLT. Trotzdem haben einige Patienten obgleich stark erniedrigtem PLT-Wert, nur minimale oder gar keine Blutungszeichen<sup>88,110,111</sup>. Die Ursache für dieses Phänomen ist noch weitgehend unbekannt. Die weitere Evaluation der Beziehung von Blutungsneigung und PLT-Wert bzw. IPF-Wert erscheint daher essentiell. Die Blutungsneigung der ITP-Patienten zum Zeitpunkt der Messung der Thrombozytenparameter (Ergebnisse Kapitel 3.3.2) wurde für diese Studie anhand eines etablierten Blutungsscore (Buchanan *et al.*; *The Journal of Pediatrics*, 2002) bestimmt<sup>112</sup>. Dieser erlaubt die semiquantitative Beurteilung der Blutungsneigung. Demnach wurde die Blutungsneigung folgendermaßen eingeteilt: **0 = Keine Blutungen**; **1 = Leicht**→ wenige Petechien ( $\leq 100$  insgesamt) und/oder  $\leq 5$  kleine Hämatome ( $\leq 3$  cm Durchmesser); **2 = Mild**→ viele Petechien ( $\geq 100$ ) und /oder  $\geq 5$  große Hämatome ( $> 3$  cm im Durchmesser), keine Schleimhautblutungen; **3 = Moderat**→ Schleimhautblutungen (Epistaxis, Blutungen am Gaumen, oropharyngeale Blutblasen, Menorrhagie, gastrointestinale Blutung, ect.), die keine sofortige medizinische Interventionen benötigen; **4 = Schwer**→ Schleimhautblutungen oder vermutete innere Blutung ( im Gehirn, Lunge, Muskel, Gelenk, etc.),

*die sofortige medizinische Intervention benötigen; 5 = lebensbedrohlich → dokumentierte Hirnblutung oder lebensbedrohliche oder fatale Blutung egal wo.*

### **1.3.2 Akute lymphatische Leukämie (ALL)**

Die ALL ist eine maligne, klonale Neoplasie der lymphatischen Vorläuferzellen des Knochenmarkes. Es kommt zu einer diffusen autonomen Proliferation der Leukozyten und Ausschwemmung unreifzelliger Blasten ins periphere Blut. Sie ist mit ca. 500 Neuerkrankungen von Kindern in Deutschland pro Jahr die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter und tritt gehäuft zwischen dem 2. und 5. Lebensjahr auf.

Die pathologischen Ereignisse, die zur Entwicklung einer ALL führen, sind noch nicht vollständig verstanden. Die Immunphänotypisierung der leukämischen Lymphoblasten ist essentiell, um die Erkrankung diagnostizieren zu können und reflektiert die Reife des dominanten Klons. Therapeutische Bedeutung hat dabei vor allem die Differenzierung von T-Zell- sowie reifen und unreifen B-Zell-Phänotypen<sup>113,114</sup>. Die Durchführung einer Chromosomenanalyse ist integraler Bestandteil der ALL-Diagnostik. Immer häufiger werden darüber hinaus hoch spezifische und sensitive Verfahren wie die RT-PCR, Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) und Durchflusszytometrie eingesetzt, um genetische Veränderungen wie z. B. Fusionstranskripte, Verlust von DNA-Material oder spezifische Chromosomen mit prognostischer und/oder therapeutischer Relevanz detektieren zu können<sup>113,114</sup>.

Die klinische Symptomatik resultiert aus der Expansion des malignen Klons, welche eine progrediente Verdrängung und Insuffizienz des Knochenmarkes, einhergehend mit einer Anämie, Granulozytopenie und Thrombozytopenie, zur Folge hat. Die klinische Präsentation von Kindern mit ALL ist sehr variabel. Ungefähr die Hälfte der Patienten präsentiert sich mit Fieber. Hinzu kommen Müdigkeit, Blässe und Dyspnoe als Folge der bestehenden Anämie. Weiterhin besteht eine Anfälligkeit für bakterielle Infekte und eine erhöhte Blutungsneigung im Rahmen der Thrombozytopenie. Extramedulläre leukämische Infiltration kann zudem eine Hepato- und Splenomegalie oder Lymphadenopathie verursachen. Über ein Viertel der erkrankten Kinder klagt über Knochenschmerzen sowie Arthralgien als Folge der leukämischen Infiltration des Periosts, der Knochen und Gelenke oder der Expansion der Knochenmarkhöhle durch leukämische Blasten. Kinder mit starken Knochenschmerzen können sich mit unveränderten Blutbild präsentieren, was die Diagnosefindung erschwert<sup>115</sup>.

Die Beeinflussung der Megakaryozytopoese in Kindern mit ALL zum Zeitpunkt der Diagnose ist bisher noch nicht ausreichend untersucht worden. Kalmanti *et al.* konnten feststellen, dass die Anzahl an Megakaryozyten-Kolonien zum Zeitpunkt der Diagnose signifikant reduziert ist<sup>116</sup>. Eine 1990 durchgeführte Studie kam zu demselben Ergebnis. Die Autoren räumten jedoch ein, dass die niedrigere Anzahl an CFU-MK zum Zeitpunkt der Diagnose auf einen Verdünnungseffekt mit leukämischen Zellen zurückzuführen sein könnte, da zwei Drittel der Kinder normale Zahlen an CFU-MK aufwiesen, wenn diese allein auf die nicht-leukämische Zellen des Knochenmarks bezogen wurden<sup>117</sup>. Die TPO-Werte zeigten sich leicht erhöht<sup>118,119</sup>. In der Literatur finden sich bisher keine Untersuchungen zu IPF oder anderen Thrombozytenparametern.

### **1.3.3 Kongenitale Thrombozytopenien (KT)**

Angeborene Thrombozytopenien sind seltene Erkrankungen. Aus der heterogenen, phänotypischen Ausprägung der Erkrankungen resultieren Schwierigkeiten bei der Diagnosestellung, und die tatsächliche Häufigkeit wird so wahrscheinlich unterschätzt. Obwohl bereits verschiedene Gendefekte beschrieben wurden, sind die Erkrankungen noch nicht ausreichend charakterisiert. Mit Hilfe neuer Thrombozytenparameter könnte ihre Differenzierung und die Diagnosefindung erleichtert werden.

#### **1.3.3.1 Fanconi Anämie (FA)**

Die FA ist eine seltene kongenitale Erkrankung, die mit einer Thrombozytopenie einher gehen kann. Sie wird autosomal rezessiv, selten auch X-chromosomal rezessiv, vererbt. Bisher konnten insgesamt 15 Gene identifiziert, welche in FA-Patienten Mutationen aufweisen. FA ist gekennzeichnet durch ein breites Spektrum an kongenitalen Anomalien, progressives Knochenmarkversagen (Beginn im Median mit 7 Jahren) und eine Prädisposition für maligne Tumoren<sup>120,121</sup>. Zellen von FA-Patienten zeigen, aufgrund einer chromosomalen Instabilität, eine Überempfindlichkeit gegenüber Interkalanzien wie Mitomycin. Diese Eigenschaft wird für die Diagnosestellung mittels Fusionsexperimenten genutzt<sup>122</sup>. Die FA ist eine genetisch uneinheitliche Erkrankung, so dass eine starke Heterogenität der Phänotypen beobachtet wird.

Dadurch wird die Diagnose zunächst durch die Interpretation klinischer Manifestationen stark erschwert. Bis zum heutigen Tag konnten 13 Komplementationsgruppen (A-N) identifiziert werden. Davon ist Gruppe A mit 60% die häufigste<sup>122</sup>. Die Gene von 11 Komplementationsgruppen konnten bereits kloniert und dadurch demonstriert werden, dass 10 der Proteine in einem gemeinsamen biochemischen *pathway* kooperieren, welcher eine komplexe zelluläre Antwort auf DNA-Schäden reguliert. Die Aktivierung des *pathways* führt zur Rekrutierung von Proteinen für die Reparatur der DNA und beeinflusst den Zellzyklus und die enzymatische Prozessierung der DNA<sup>122</sup>. Die mit der FA assoziierte Thrombozytopenie führt häufig zu Blutungskomplikationen, welche die Lebensqualität der Patienten stark einschränken können. Die Ausprägung der Thrombozytopenie korreliert nicht immer mit der Ausprägung der Blutungen, was auf Funktionsdefekte der Thrombozyten zurückgeführt wird. Dafür spricht, dass in FA-Patienten eine dysplastische Megakaryopoese und morphologische Veränderungen der Megakaryozyten nachgewiesen werden konnten. Zudem wies eine große Anzahl von Patienten chromosomale Aberrationen auf, welche in Funktionsdefekten der Thrombozyten resultieren könnten<sup>97,123,124</sup>. Holzhauer *et al.* kamen zu dem Ergebnis, dass die Thrombozyten von FA-Patienten eine reduzierte Reaktivität auf physiologische Thrombozytenagonisten zeigen und außerdem kleiner sind als Thrombozyten gesunder Kontrollen. Die IPF%-Werte der FA-Patienten lagen im Normalbereich, während die IPF#-Werte reduziert waren<sup>120</sup>.

### **1.3.3.2 Thrombozytopenie-Radiusaplasie Syndrom (TAR-S)**

Die erste Beschreibung eines Patienten mit TAR-S erfolgte 1929 durch Greenwald und Sherman. 1969 wurde die Erkrankung von J. Hall als Syndrom zusammengefasst. Sie manifestiert sich bereits bei Geburt mit einer Thrombozytopenie. Die Radiusknochen sind aplastisch, die Daumen jedoch vorhanden. Dies ermöglicht eine Differenzierung des TAR- Syndroms von anderen Erkrankungen mit möglichen Veränderungen des Radius, wie der FA, bei der die Daumen immer fehlen<sup>125</sup>. Neben den Veränderungen des Radius können beim TAR-S zusätzliche somatische Anomalien wie Kleinwuchs, verkürzte oder aplastische Ulnae, aplastische Humeri, sowie Herzfehler vorliegen<sup>126</sup>. Zudem leiden viele TAR-S- Patienten an einer Kuhmilchunverträglichkeit<sup>127,128</sup>. Die Thrombozytopenie kann zu gastrointestinalen und selten zu intrazerebralen Blutungen führen. 10-20% aller TAR-S-Patienten sind deshalb in den ersten Lebensjahren auf den Einsatz von Thrombozytentransfusionen (TT) angewiesen<sup>126</sup>.

Die Ätiologie der Thrombozytopenie konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, genau wie die erstaunliche Tatsache, dass sich die Thrombozytenwerte mit zunehmendem Alter der Patienten wieder weitgehend normalisieren können. Im Knochenmark von TAR-S-Patienten finden sich wenige, oft unreife Megakaryozyten, neben einem sonst völlig normalen oder hyperzellulären Knochenmark. Ein Produktionsdefekt von TPO als Ursache der Thrombozytopenie konnte ausgeschlossen werden, da im Gen des TPO-Rezeptors c-Mpl keine Mutationen<sup>129,130</sup> und zudem im Serum von TAR-S-Patienten erhöhte Spiegel von biologisch aktivem TPO gefunden wurden. TAR-S-Patienten zeigten jedoch eine defekte Reaktivität auf TPO. Dies spricht dafür, dass ein Defekt im Signaltransduktionsweg des TPO-Rezeptors c-Mpl in Megakaryozyten für die defekte Megakaryozytopoese verantwortlich ist<sup>131</sup>. Klopocki *et al.* konnten zudem eine Mikrodeletion auf Chromosom 1q21 in TAR-Patienten identifizieren, welche zwar nicht als alleiniger Verursacher der Erkrankung in Frage kommt, jedoch eine Rolle wichtige für dessen Entstehung spielen könnte<sup>125</sup>. In diesem Jahr konnte ein Defekt im *Exon-Junction-Complex* (EJC) als ein weiterer wichtiger ursächlicher Faktor für das TAR-Syndrom identifiziert werden<sup>132</sup>.

#### **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Thrombozyten sind diskoide, anukleäre Fragmente im Blut, welche für die Blutgerinnung essentiell sind. Mit der Hilfe spezieller automatisierter Blutzählgeräte können Thrombozytenparameter bestimmt werden, die neben einer genaueren Beschreibung der Morphologie auch Informationen über den Reifegrad der Thrombozyten liefern. Die Evaluation dieser Parameter weist großes Potential für die Differenzierung sowie die Diagnose- und Prognosestellung von verschiedenen Erkrankungen auf. Zudem können mit ihrer Hilfe wichtige Erkenntnisse über den Zustand von Megakaryozytopoese und Thrombozytopoese unter den verschiedensten pathologischen Bedingungen gewonnen werden. Da das für ihre Messung benötigte Blut während Routineblutentnahmen gewonnen werden kann, stellen die Thrombozytenparameter eine einfache und gering-invasive Diagnostik dar. Für diese Studie wurden auf der Grundlage der beschriebenen Erkenntnisse folgende Ziele bzw. Fragestellungen definiert.

1) **Referenzwerte:** Bisher stehen keine Referenzwerte der Thrombozytenparameter für gesunde Kinder zur Verfügung. Dies erschwert die Evaluation und Einordnung der Thrombozytenparameter in Kindern unter pathologischen Konditionen erheblich. Daher ist das erste Ziel dieser Arbeit, Referenzwerte für hämatologisch gesunde Kinder zu etablieren, um die verlässliche Interpretation der Parameter in verschiedenen pädiatrischen Patientengruppen zu garantieren. Weiterhin soll der Einfluss von Alter und Geschlecht auf die Parameter, sowie die Beziehung der einzelnen Parameter untereinander in hämatologisch gesunden Kindern untersucht werden.

2) **Idiopathische thrombozytopenische Purpura:** Bestimmung sowie Vergleich der Parameter IPF(%,#), MPV und PDW in aITP- und cITP-Patienten. Lassen sich Unterschiede erkennen? Beurteilung von IPF im zeitlichen Verlauf. Beantwortung der Frage, ob der IPF-Wert einen prädiktiven Wert im Bezug auf die Progression der Erkrankung von einer aITP zu einer cITP hat. Weiterhin soll die Untersuchung des Zusammenhanges von Anzahl und Reife der Thrombozyten mit der Blutungsneigung erfolgen.

3) **Akute lymphatische Leukämie:** Über den Status der Megakaryozytopoese in pädiatrischen ALL-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose ist bisher nur wenig bekannt. Daher sollen auch hier vor allem die relativen und absoluten IPF-Werte evaluiert werden.

4) **Diskriminierung von aITP -und ALL-Patienten:** Vergleich der Parameter von aITP-Patienten und ALL-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose. Beantwortung der Frage, ob mit Hilfe der Parameter eine Diskriminierung der beiden Gruppen möglich ist, mit dem Ziel einer konsekutiven Verbesserung der Diagnosestellung und Vermeidung von Knochenmarkuntersuchungen in Kindern mit aITP.

5) **Relative und Absolute IPF:** Ziel ist es herauszufinden inwieweit IPF% und IPF# den Status der Megakaryozytopoese reflektieren. Hierzu sollen die beiden Parameter in Patientengruppen mit Thrombozytopenie unterschiedlichster Genese untersucht werden.

Weiterhin soll die Frage beantwortet werden, ob die Parameter einen Beitrag zur Differenzierung der kongenitalen Thrombozytopenien FA und TAR-S leisten können, um eine frühe und adäquate Behandlung zu ermöglichen. Diese Erkrankungen können aufgrund ihrer phänotypischen Heterogenität schwer zu unterscheiden sein.

## 2 Patienten, Material und Methoden

### 2.1 Studiendurchführung und Patienten

Die für die Studie untersuchten Kinder waren in der Klinik für Allgemeine Pädiatrie des Otto-Heubner-Zentrums der Charité, Universitätsmedizin in Berlin, vorstellig.

Da die zusätzlichen Thrombozytenparameter routinemässig nicht gemessen werden, wurden die Ärzte der entsprechenden Stationen bzw. Ambulanzen gebeten, nach schriftlicher Einwilligung des Patienten oder der Erziehungsberechtigten, ein zusätzliches EDTA-Röhrchen bei der Routineblutentnahme mit abzunehmen. Dieses wurde darauffolgend zur Messung der Parameter an das Zentrallabor für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité geschickt. Die Blutentnahme der ITP-Patienten erfolgte mit Zustimmung der Ethikkommission der Charité in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki (EA2/147/07). Die Durchführung der prospektiven Studie, d. h. die Akquirierung der Blutproben, erfolgte im Zeitraum von Januar 2008 bis April 2010.

Für die Etablierung der Referenzwerte wurden die Thrombozytenparameter in 100 hämatologisch gesunden Kindern bestimmt, welche sich aus neurologischen, endokrinologischen, diätischen oder sozialen Gründen in regelmäßiger medizinischer Kontrolle durch das Sozialpädiatrische Zentrum der Charité befanden. Die Kinder der Kontrollkohorte waren zwischen 0 und 17 Jahre alt und 41 davon Mädchen und 59 Jungen. Bei der Auswahl wurde auf eine gleichmäßige Altersverteilung geachtet. Ausschlusskriterien waren das Vorliegen von hämatologischen Erkrankungen, Veränderungen des kleinen Blutbildes sowie akute Infektionen zum Zeitpunkt der Blutentnahme.

Weiterhin wurden die Thrombozytenparameter in 87 Patienten mit Thrombozytopenie bestimmt. Darunter waren 33 ITP-Patienten, 28 ALL-Patienten, 10 FA- und 9 TAR-S-Patienten sowie 7 Patienten mit Myelodysplastischen Syndrom (MDS) oder Aplastischer Änamie (AA). Ein PLT-Wert von  $< 150/\text{nl}$  wurde als thrombozytopen eingestuft.

Die Diagnose der ITP wurde auf der Grundlage der Richtlinien der *American Society for Hematology* gestellt (u.a. isolierte Thrombozytopenie, Ausschluss anderer Ursachen für die Thrombozytopenie, unauffällige klinische Untersuchung sowie unauffälliger peripherer Blutaussstrich). Nach dem aktuellen Standard wurden ITP-Patienten, welche innerhalb von 3 Monaten nach Diagnosestellung eine Remission erreichten als akute ITP-Patienten klassifiziert. Hingegen wurden ITP-Patienten, welche innerhalb eines Jahres in die Remission gingen, als

persistent und diejenigen, welche länger als 12 Monate thrombozytopen blieben als chronisch eingestuft<sup>103</sup>.

Die Verifizierung der Diagnosen der ALL-Patienten erfolgte nach Evaluation der Knochenmarkbiopsie entsprechend den aktuellen Standards mittels Knochenmarkaspiration, Immunphänotypisierung sowie Zyto- und Molekulargenetik. Auf der Grundlage der FAB-Klassifikation erfolgte die Einteilung der Patienten in die ALL-Subgruppen L1 (kindlicher Typ: vorwiegend kleine Blasten) oder L2 (erwachsener-Typ: heterogene Zellpopulation). Weiterhin erfolgte die Zuordnung zur Standard-Risikogruppe (SR) oder Hoch-Risikogruppe (HR) und die Ausprägung einer eventuellen Hepatosplenomegalie wurde dokumentiert (0 = keine; + = 2-3 cm; ++ = 4-6 cm). Zur Beurteilung der Thrombozytopenie wurde zudem die Anzahl der Megakaryozyten im Ausstrich bestimmt (0 = keine, (+) = 1 pro Objektträger).

Die Diagnose der FA erfolgte mittels Chromosomenbruchuntersuchungen sowie Durchflusszytometrie, die des TAR-Syndroms u.a. mit Hilfe von Röntgenaufnahmen des Skeletts sowie der hämatologischen Analyse von Blut- und Knochenmarkausstrichen. Weiterhin wurden in 9 Kindern mit einer reaktiven Thrombozytose (PLT > 500/nl), im Rahmen einer anderen Grunderkrankung, ohne weitere hämatologische Erkrankungen, die Thrombozytenparameter bestimmt. Alle in diese Studie eingeschlossenen Kinder waren kaukasischer Abstammung. Zur Einsicht der gewonnenen hämatologischen Befunde wurde das Programm der „Expertviewer“ zur Hilfe genommen.

### **2.1.1 Patientencharakteristika der ITP-Patienten**

Für diese Studie wurden die Thrombozytenparameter in 20 Patienten mit akuter ITP zum Zeitpunkt der Diagnose (aITP) und in 13 Patienten mit bereits chronifizierter ITP (cITP) (Tabelle 7 und 8, Kapitel 3.3) untersucht. Die Patienten befanden sich in regelmäßiger ambulanter Betreuung in der Poliklinik für Hämatologie und Onkologie der Klinik für Allgemeine Pädiatrie des Otto-Heubner-Centrums der Charité. Die Diagnose der ITP wurde auf der Grundlage von Anamnese, körperlicher Untersuchung, Blutbild und peripherem Blutaussstrich gestellt. 8 der aITP-Patienten waren Mädchen und 12 Jungen. 13 dieser Patienten gingen innerhalb von 12 Monaten in Remission und können somit als akute bzw. persistierende ITP klassifiziert werden. In 7 der Patienten entwickelte sich im Verlauf eine chronische ITP, d.h. die Erkrankung dauerte über 1 Jahr an. Das Knochenmark wurde in 2 der aITP-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose untersucht. Beide Patienten zeigten eine erhöhte Anzahl an Megakaryozyten im Knochenmark,

jedoch kein Anhalt für eine Aplasie oder Malignität. Unter den Patienten mit cITP waren 11 Mädchen und 2 Jungen.

Zum Zeitpunkt der Diagnose, vor Blutentnahme und Bestimmung der Thrombozytenparameter erhielt keiner der aITP-Patienten eine Therapie. Auch die cITP-Patienten erhielten zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine Therapie. Jedoch hatten 3 der cITP-Patienten im Verlauf bereits Therapie erhalten.

### **2.1.2 Patientencharakteristika der ALL-Patienten**

Für diese Arbeit wurden die Thrombozytenparameter von 28 pädiatrischen Patienten mit ALL zum Zeitpunkt der Diagnose gemessen (Tabelle 9, Kapitel 3.4). Ziel war es zum einen, mehr über den Status der Megakaryozytopoese der Patienten zu erfahren. Zum anderen ging es darum, einen Vergleich der Thrombozytenparameter von ALL- und ITP-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose zu gewährleisten, um die Differenzierung der beiden Erkrankungen zu verbessern.

Die Patienten hatten zum Zeitpunkt der Messung noch keine Therapie erhalten. Die Patienten waren bei Diagnose zwischen 1 und 17 Jahre alt (Median = 4,4 Jahre). Es wurden 9 Mädchen und 19 Jungen eingeschlossen. Die Mehrzahl der Patienten wurde auf der Grundlage der FAB-Klassifikation der ALL-Subgruppe L1 zugeordnet (kindlicher Typ: vorwiegend kleine Blasten), sowie der Standardrisikogruppe (SR). Im Knochenmark von 11 Patienten konnten vereinzelt ((+) = 1 pro Objektträger) und in dem von weiteren 16 keine Megakaryozyten ( 0 = keine) nachgewiesen werden. In einem Patienten konnte die Anzahl an Megakaryozyten nicht bestimmt werden. Bei 16 der Patienten lag eine leichte Hepatosplenomegalie (HSM) von 2-3 cm und bei zwei Patienten von 4-6 cm vor. Neun der Patienten zeigten keine Hepatosplenomegalie und in einem Patienten wurde das Ausmass der HSM nicht evaluiert.

## **2.2 Technik des hämatologischen Analysegerätes Sysmex XE-2100**

Für die Messung der in dieser Arbeit untersuchten Thrombozytenparameter wurde das quantitativ, voll automatisiert und mit Vollblut arbeitende Blutanalysegerät XE-2100 (Sysmex, Kobe, Japan) verwendet. Dieses ist in der Lage, die unmittelbaren hämatopoetischen Vorläuferzellen von Erythrozyten und Thrombozyten zu detektieren. Für die Messung von IPF ist es mit einer erweiterten Software ausgestattet (XE IPF Master, Sysmex). Das Gerät erlaubt eine schnelle, einfache und präzise Bestimmung der Thrombozytenparameter. Für alle

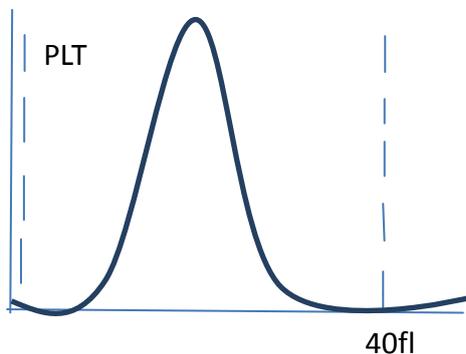
Messungen würde 0,5 ml venöses, mit EDTA versetztes Blut, verwendet. Alle Messungen erfolgten innerhalb von 2 h nach Entnahme. Im folgenden werden die zur Bestimmung von PLT und der IPF zum Einsatz kommenden Techniken des XE-2100 näher beschrieben.

### **2.2.1 Messung der Thrombozytenzahl und -parameter**

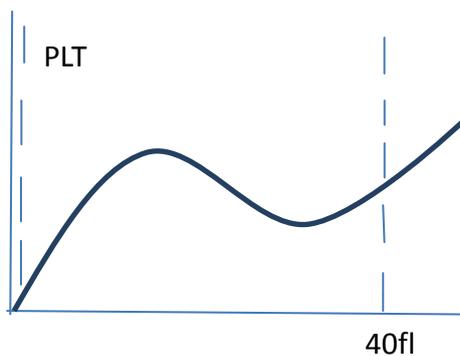
Es bestehen vier verschiedene Methoden zur Messung der Thrombozytenzahl. Zunächst ist es möglich die PLT mittels Phasenkontrastmikroskopie zu bestimmen. Neuere Methoden ermöglichen die automatische optische Zählung mittels Streulicht und Fluoreszenz, Impedanz und dem Einsatz von Durchflusszytometrie<sup>57</sup>. Die manuelle Zählung der PLT wurde lange Zeit als der Goldstandard der Thrombozytenzählung angesehen. Sie wurde für die Kalibrierung von, durch automatisierte Blutzählgeräte bestimmte, Thrombozytenzahlen und die Gewinnung von Kontrollmaterial eingesetzt. Die Methode ist jedoch zeitaufwändig und weist einen hohen Grad an Ungenauigkeit auf<sup>57</sup>. Im Vergleich von manueller und automatischer PLT-Bestimmung zeigte sich, dass die manuelle Zählung zu signifikant höheren Ergebnissen für PLT führte als die automatische. Zudem differierten die Ergebnisse der dreifachen Bestimmung der PLT mittels manueller Zählung, im Gegensatz zur automatischen Methode, stark voneinander<sup>57,133</sup>. Die Einführung der automatischen Impedanz-Methode führte zu einer Verbesserung der Präzision der PLT-Bestimmung.

Für diese Arbeit wurde die PLT mit dem Blutanalysegerät XE-2100 bestimmt. Dieses ist in der Lage, die PLT sowohl mittels automatischer Impedanz als auch durch optische Zählung und dem Einsatz von Streulicht und Fluoreszenz zu bestimmen. Die Fähigkeit, die PLT mit Hilfe von zwei voneinander unabhängigen Methoden zu bestimmen, erlaubt eine präzise Angabe der Thrombozytenzahlen und die Erstellung einer Thrombozytenverteilungskurve (Abb. 5)<sup>134</sup>. Liegen in einer Probe Mikroerythrozyten, Riesenthrombozyten oder Fragmentozyten vor, kann die akkurate Messung der PLT im Impedanzkanal (I-PLT) beeinträchtigt sein. Aus diesem Grund wechselt der XE-2100 bei einer abnormalen Thrombozytenverteilungskurve (Abb.6) automatisch auf den optischen Thrombozytenwert (O-PLT, Kapitel 2.2.2). Auch bei einer I-PLT von  $< 50/\text{nl}$  wird auf den O-PLT-Wert gewechselt, da die optische Bestimmung besonders bei niedriger PLT verlässlichere Werte liefert. Aufgrund des möglichen Wechsels zwischen I-PLT und O-PLT kann auch in Patienten mit Thrombozytopenie eine genauer PLT-Werte ermittelt werden, was für diese Arbeit besonders wichtig ist<sup>135</sup>. In Untersuchungen von thrombozytopenischen Patienten konnte zudem beim Vergleich von I-PLT und O-PLT eine

einwandfreie Korrelation nachgewiesen werden<sup>68</sup>. Liegen keine Interferenzen in der Impedanzmessung vor, wird I-PLT übernommen.



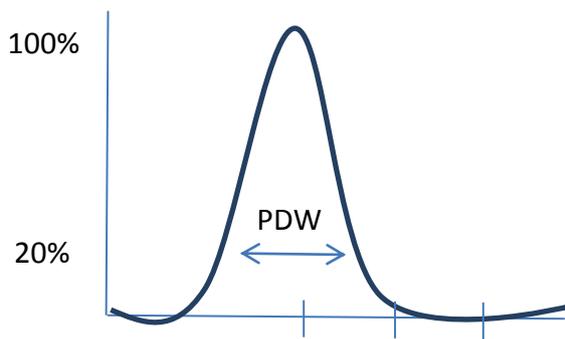
**Abbildung 5** Normale Thrombozytenverteilungskurve.



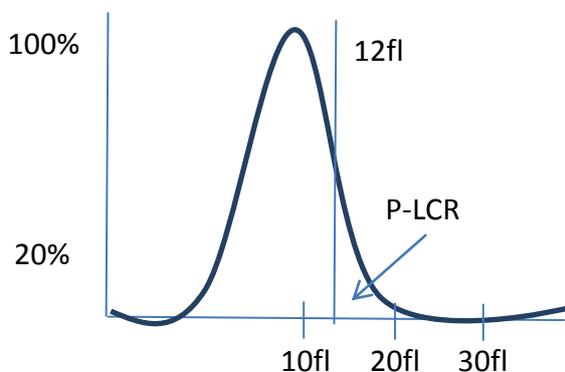
**Abbildung 6** Abnorme Thrombozytenverteilungskurve.

Die automatische Zählung der Thrombozyten im Impedanzkanal erfolgt im XE-2100 zusammen mit den Erythrozyten in einem separaten Messkanal nach dem Gleichstrom-Widerstandsprinzip unter hydrodynamischer Fokussierung. Um die Zellen präzise voneinander zu trennen, werden automatische Diskriminatoren eingesetzt, so dass auch bei extrem niedrigen sowie extrem hohen Konzentrationen eine genaue Analyse der Thrombozyten und Erythrozyten gewährleistet ist. Die während des Durchtrittes der Zellen durch den Impedanzkanal registrierten elektrischen Impulse sind proportional der Zellzahl und die jeweilige Amplitudenänderung proportional der Zellgröße. Auf diese Weise kann das

MPV der jeweiligen Thrombozytenpopulation bestimmt werden. Aus den im Impedanzkanal ermittelten Zellzahlen und Zellvolumina der Thrombozyten wird eine kumulative Thrombozytenverteilungskurve erstellt, aus der die weiteren Thrombozytenparameter PDW (Abb. 7), P-LCR (Abb. 8), und P-MFV (Kapitel 1.2.6) bestimmt werden können.



**Abbildung 7** Platelet deviation width (PDW). Der Wert wird in 20% relativer Höhe der Thrombozytenverteilungskurve, bei einer Gesamthöhe von 100%, abgelesen und in fl angegeben.

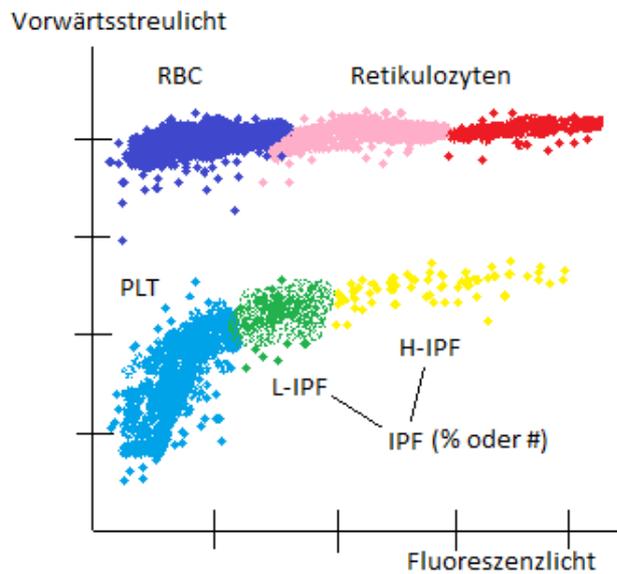


**Abbildung 8** Platelet-Large Cell Ratio (P-LCR). P-LCR gibt den Anteil an Thrombozyten bezogen auf die Gesamthrombozytenzahl in % an, die ein Volumen zwischen 12fl und dem oberen Diskriminator (oft 20 fl) der Thrombozytenverteilungskurve aufweisen.

### 2.2.2 Messung von IPF

Für die Bestimmung der retikulierten Plättchen stehenentweder Vollblut oder plättchenreiches Plasma (PRP) zur Verfügung<sup>136</sup>. Für die durchflusszytometrische Analyse der RP kann u. a. Thiazol-Orange (TO) verwendet werden, das bei 488 nm angeregt wird. Es ist in der Lage, die Thrombozytenmembran ohne weitere Vorbehandlung zu durchdringen und bindet an die RNA der Thrombozyten. Dabei bewirkt es eine 3000-fache Fluoreszenzsteigerung mit einer hohen Quantenausbeute<sup>78</sup>. Problematisch ist, dass TO nicht nur an RNA bindet, sondern auch Nukleotide, die in den  $\delta$ -Granula enthalten sind. Durch den Einsatz von Thrombin-Rezeptor Aktivierende Peptid (TRAP), ein nicht-enzymatischer Thrombozytenagonist, der zu einer Degranulierung führt, kann dieses Problem umgangen werden<sup>69</sup>.

Für diese Arbeit wurden nicht die RP, sondern die IPF bestimmt, da sie im Gegensatz zur RP schnell, einfach und vor allem standardisiert bestimmt werden kann. Die IPF wurde simultan mit der O-PLT und den verschiedenen Reifungsstufen der Erythrozyten im optischen Retikulozyten-Messkanal (RET-Kanal) bestimmt. Ein spezifischer Weichmacher perforiert die Zellmembranen der Zellen, so dass die Fluoreszenzfarbstoffe Polymethin und Oxacin in die Zellen eindringen können. Diese sind in der Lage an DNA sowie RNA im Inneren der Zellen zu binden. Die Zellen werden durch eine Durchflusszelle geleitet und ein Halbleiterlaserstrahl auf sie gerichtet. Dabei wird das Vorwärts-Streulicht des Halbleiterlasers, welches ein Maß für das Volumen der Zellen ist, von einer Photodiode detektiert. Strukturen im Inneren der Zellen werden durch das laterale Streulicht erfasst, welches genau wie das von den Zellen abgegebene Fluoreszenzlicht von einer Fotovertellerröhre registriert wird. Die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichts korreliert mit dem DNA- bzw. dem RNA-Gehalt der Zellen. Das registrierte Licht wird von dem Gerät in elektrische Impulse konvertiert. Die Fraktion der unreifen Thrombozyten weist ein größeres Volumen und einen höheren Gehalt an RNA auf als die reifen Thrombozyten (Kapitel 1.2.7). Ein Computeralgorithmus ist in der Lage, anhand eines speziellen *gatings* die unreifen und die reifen Thrombozyten aufgrund ihrer differenten Volumina und Fluoreszenzintensitäten voneinander zu trennen. Das Analysegerät berechnet aus den gegebenen Informationen ein Scattergramm in dem die Zellen, in Abhängigkeit vom Fluoreszenzlicht und Vorwärtsstreulicht, als Punkte dargestellt werden. Die IPF kann in relativen Zahlen bezogen auf die PLT-Gesamtanzahl (IPF%) sowie in absoluten Zahlen pro Volumen Blut (IPF#/nl) angegeben werden. Zudem kann innerhalb der IPF zwischen einer *High Fluorescent Immature Platelet Fraction* (H-IPF) und *Low Fluorescent Immature Platelet Fraction* (L-IPF) unterschieden werden (Abbildung 9).



**Abbildung 9** Darstellung der verschiedenen Thrombozyten-Fractionen (H-IPF und L-IPF) im Scattergramm des RET-Kanals des XE-2100 (RBC = Red Blood Cells).

### 2.3 Statistische Analysen

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) angegeben, falls nicht anders gekennzeichnet. Für den Vergleich der Thrombozytenparameter in mehr als 2 Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Bei Signifikanz wurde in der Folge ein ungepaarter Mann-Whitney-Wilcoxon Rank-Test für 2 unabhängige Stichproben durchgeführt. Ein p-Wert von  $< 0,05$  bzw. von  $< 0,01$  wurde als signifikant betrachtet ( $< 0,05 = \#$ ;  $< 0,01 = \#\#$ ). Für alle statistischen Analysen, einschließlich der durchgeführten linearen Regressionsanalysen, wurde Prism4 (Graph Pad) für Windows verwendet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Reproduzierbarkeit und Stabilität der Thrombozytenparameter

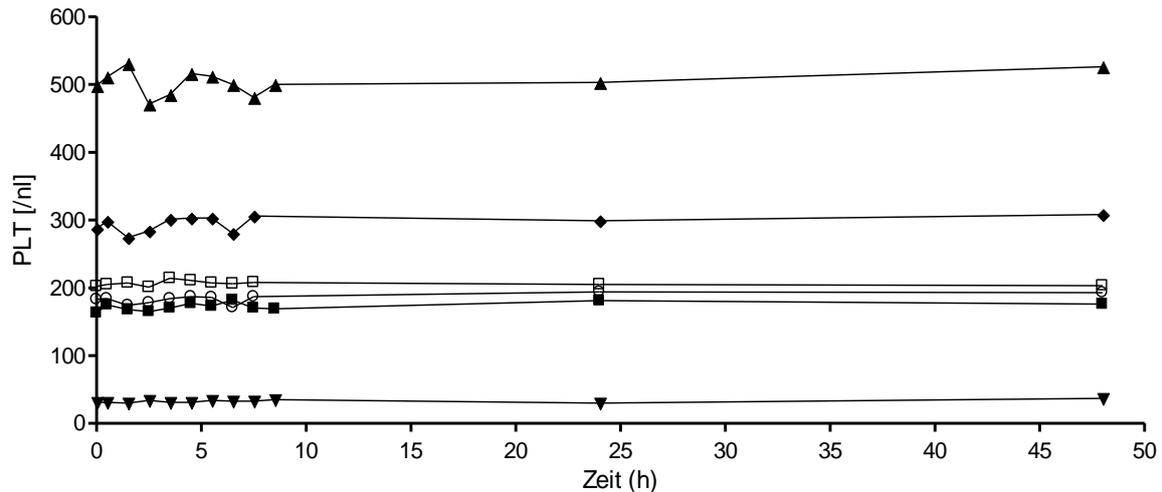
Die für diese Arbeit evaluierten Thrombozytenparameter wurden mit dem automatisierten Blutanalysegerät XE-2100 gemessen. Um die Reproduzierbarkeit von Messungen zu überprüfen, wurden in je einer Probe mit normalen, mit hohen sowie erniedrigten Thrombozytenzahlen PLT und IPF% mehrfach bestimmt (Anzahl der Messungen pro Probe  $n = 15$ ). Anschließend wurden für die Messungen jeder Probe der Mittelwert, die Standardabweichung (SD) und der Variationskoeffizient (CV%) ermittelt. Die Reproduzierbarkeit der Messungen war gut: Die Variationskoeffizienten für die Probe mit normalem PLT-Wert lagen für PLT bei 4,1% und für IPF% bei 3,8%. Die Variationskoeffizienten der Messungen von PLT und IPF% in den Proben mit erhöhter sowie mit erniedrigter PLT waren hiermit vergleichbar oder lagen sogar niedriger. D. h. die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war unabhängig von der Thrombozytenzahl in den Proben (Tabelle 2).

**Tabelle 2.** Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von 15 maliger Messung der Parameter PLT und IPF% in 3 verschiedenen Proben mit variierenden Thrombozytenzahlen (SD = Standardabweichung; CV = Variationskoeffizient).

Blutproben	PLT [/nl]	SD	CV [%]	IPF [%]	SD	CV [%]
	Mittelwert (n = 15)			Mittelwert (n = 15)		
<b>PLT normal</b>	228	9,4	<b>4,1</b>	2,1	0,1	<b>3,8</b>
<b>PLT erhöht</b>	496	9,2	<b>1,9</b>	2,1	0,1	<b>2,2</b>
<b>PLT erniedrigt</b>	57	2,2	<b>3,8</b>	21,3	0,9	<b>4,0</b>

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die IPF%-Werte, aber auch die MPV-Werte durch die Lagerung zwischen Abnahme und Messung Schwankungen unterliegen können<sup>137</sup>. Um Veränderungen der Thrombozytenparameter in den ersten Stunden nach der Abnahme auszuschließen, wurde die Stabilität der Thrombozytenparameter, aus logistischen Gründen mit

Ausnahme des P-MFV, in 6 Proben während der Lagerung bei Raumtemperatur über 48 h ausgewertet. Die Proben 1 bis 4 wiesen eine Thrombozytenzahl im Normalbereich, Probe 5 eine erhöhte und Probe 6 eine erniedrigte Thrombozytenzahl auf. Die PLT zeigte 2,5 Stunden und auch 48 Stunden nach Abnahme in keiner der Proben eine statistisch signifikante Veränderung ( $p > 0,05$ ). Der mittlere CV% aller Proben bei Lagerung über 48 Stunden betrug 3,9% (Abb. 10, Tabelle 3).

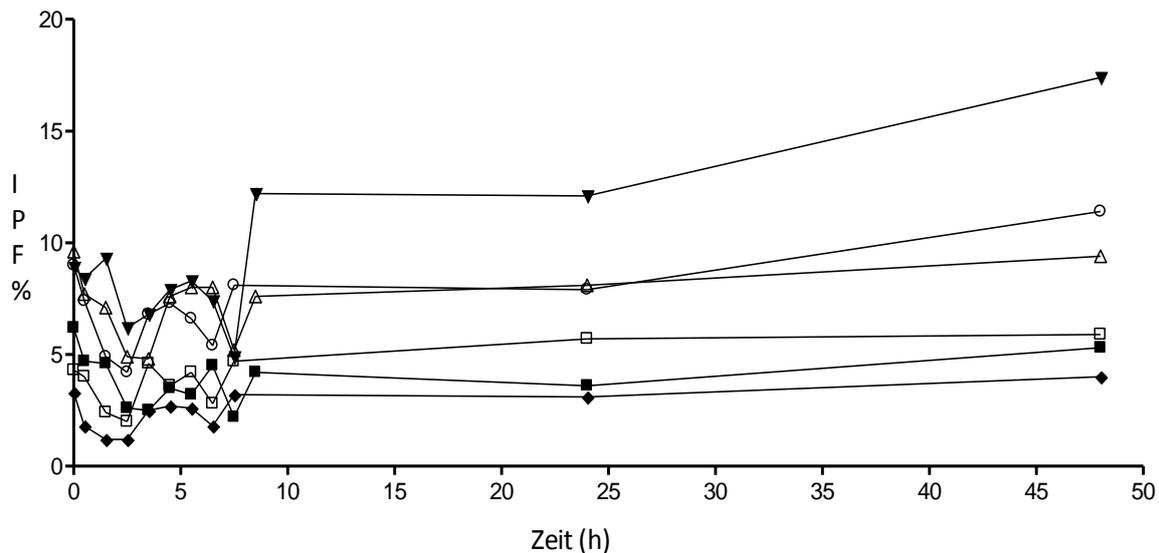


**Abbildung 10.** Stabile Kinetik des PLT-Parameters in 6 verschiedenen Blutproben über 48 Stunden mit geringer Variation der Werte (h = Stunden; 0 h = Zeitpunkt der Entnahme; Lagerung bei Raumtemperatur).

**Tabelle 3.** Numerische PLT-Werte der 6 Blutproben aus Abb. 10 sowie die Variation in % über 48 Stunden (h = Stunden; 0 h = Zeitpunkt der Entnahme; Lagerung bei Raumtemperatur).

PLT/nl	Zeit (h) nach Entnahme								
	0	0,5	1,5	2,5	4,5	6,5	7,5	24	48
Probe 1	163	175	168	165	177	182	170	181	176
Probe 2	287	298	274	284	303	280	306	299	308
Probe 3	183	184	174	178	187	171	187	194	193
Probe 4	202	205	207	201	211	206	208	205	203
Probe 5	498	511	531	471	516	500	481	503	526
Probe 6	31	31	30	34	31	33	33	30	37
Variation %									
Probe 1	100	107,4	103,1	101,2	107,3	111,7	104,3	111,0	108,0
Probe 2	100	103,8	95,5	99,0	106,7	97,6	106,6	104,2	107,3
Probe 3	100	100,5	95,1	97,3	105,1	93,4	102,2	106,0	105,5
Probe 4	100	101,5	102,5	99,5	105,0	102,0	103,0	101,5	100,5
Probe 5	100	102,6	106,6	94,6	109,6	100,4	96,6	101,0	105,6
Probe 6	100	100,0	96,8	109,7	91,2	106,5	106,5	96,8	119,4

Der CV% der Messungen von IPF% bei Lagerung über 48 Stunden lag hingegen bei 31%. Die Werte unterlagen über die Zeit einer Fluktuation. Innerhalb der ersten 2,5 Stunden zeigten die Werte der Proben 2, 4, 5 einen signifikanten Abfall ( $p < 0,05$ ). Nach 48 Stunden konnte in den Proben 3, 4, 5 und 6 ein signifikanter Anstieg nachgewiesen werden (Probe 3  $p < 0,01$ ; Proben 4, 5 und 6  $p < 0,05$ ) (Abb. 11, Tabelle 4).



**Abbildung 11.** Kinetik von IPF% in 6 verschiedenen Blutproben über 48 Stunden mit Fluktuation der IPF%-Werte (h = Stunden; 0 h = Zeitpunkt der Entnahme; Lagerung bei Raumtemperatur).

**Tabelle 4.** Numerische IPF%-Werte der 6 Blutproben aus Abb. 11 sowie die Variation in % über 48 Stunden (h = Stunden; 0 h = Zeitpunkt der Entnahme; Lagerung bei Raumtemperatur).

	Zeit (h)								
IPF%	0	0,5	1,5	2,5	4,5	6,5	7,5	24	48
Probe 1	6,2	4,7	4,6	2,6	3,5	4,5	2,2	3,6	5,3
Probe 2	9,6	7,7	7,1	4,9	7,6	8	5,2	8,1	9,4
Probe 3	8,9	8,4	9,3	6,2	7,9	7,4	4,9	12,1	17,4
Probe 4	3,3	1,8	1,2	1,2	2,7	1,8	3,2	3,1	4
Probe 5	9	7,4	4,9	4,2	7,3	5,4	8,1	7,9	11,4
Probe 6	4,3	4	2,4	2	3,6	2,8	4,7	11,4	5,9
	Variation %								
Probe 1	100	75,8	74,2	41,9	56,5	72,6	35,5	58,1	85,5
Probe 2	100	80,2	74,0	51,0	79,2	83,3	54,2	84,4	97,9
Probe 3	100	94,4	104,5	69,7	88,8	83,1	55,1	136,0	195,5
Probe 4	100	54,5	36,4	36,4	81,8	54,5	97,0	93,9	121,2
Probe 5	100	82,2	54,4	46,7	81,1	60,0	90,0	87,8	126,7
Probe 6	100	93,0	55,8	46,5	83,7	65,1	109,3	265,1	137,2

Der mittlere CV% für MPV lag bei Lagerung über 48 Stunden bei 4%. Es zeigte sich eingeringer Anstieg innerhalb der ersten 2,5 Stunden, der in Probe 2, 3 und 4 statistisch signifikant war ( $p < 0,05$ ). Nach 48 Stunden war in allen Proben ein Anstieg zu verzeichnen, der in Probe 2, 4 und 5 signifikant war ( $p < 0,05$ ). Der mittlere CV% für PDW bei Lagerung über 48 Stunden lag bei 7%. Die Werte stiegen innerhalb von 2,5 Stunden in allen Proben leicht an ( $p > 0,05$ ). Nach 48 Stunden zeigte sich in allen Proben, mit Ausnahme der Probe 3, ein signifikanter Anstieg (Probe 2, 4 und 6  $p < 0,01$ ; Probe 1 und 5  $p < 0,05$ ). Der mittlere CV% für P-LCR bei Lagerung über 48 h lag bei 11%. Während der ersten 2,5 Stunden zeigten alle Proben einen Anstieg der Werte, welcher in Probe 2, 3, 4 und 6 signifikant war (Probe 2  $p < 0,01$ ; Probe 3, 4 und 6  $p < 0,05$ ). Nach 48 Stunden war in Probe 1, 2, 4 und 5 ein signifikanter Anstieg der Werte zu verzeichnen (Probe 2 und 4  $p < 0,01$ ; Probe 1 und 5  $p < 0,05$ ). Der mittlere CV% bei Lagerung über 48 Stunden für PCT lag bei 8%. Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen während der ersten 2,5 Stunden ( $p > 0,05$ ). Nach 48 Stunden zeigten die Proben 1,4 und 6 einen signifikanten Anstieg ( $p < 0,05$ ).

Die Ergebnisse legen nahe, dass es zu Alterationen der neuen Thrombozytenparameter, im besonderen der IPF, bereits durch wenige Stunden Lagerung bei Raumtemperatur nach Entnahme kommen kann. Die nach Lagerung bei Raumtemperatur gemessenen Werte können sich signifikant von den direkt nach Entnahme bestimmten Werten unterscheiden. Daher wurden für diese Studie nur Blutproben eingeschlossen, die in den ersten zwei Stunden nach Entnahme gemessen wurden. Aus logistischen Gründen konnten die Parameter nicht immer direkt nach Entnahme gemessen werden und der Zeitraum nicht noch enger gefasst werden.

### **3.2 Thrombozytenparameter in hämatologisch gesunden Kindern**

Bisher gibt es nur wenige Studien zu Thrombozytenparametern in Kindern und keine Referenzwerte für hämatologisch gesunde Kinder<sup>84,85</sup>. Da die Hämatopoese von einem 4 jährigen Jungen und einem Mädchen in der Pubertät Unterschiede aufweisen könnte, erscheint die Untersuchung der Parameter in verschiedenen Altersgruppen hämatologisch gesunder Kinder sinnvoll. Die Etablierung von Referenzwerten bei hämatologisch gesunden Kindern und Jugendlichen erlaubt zudem erst die Interpretation der Thrombozytenparameter bei Patienten mit Erkrankungen des hämatologischen Systems. Daher wurden die Thrombozytenparameter MPV, PDW, PCT, IPF% und IPF# zunächst in 100 hämatologisch gesunden Kindern bestimmt. P-LCR und P-MFV standen aus technischen Gründen nur in 53 bzw. 52 Kindern zur Verfügung.

Tabelle 5 gibt die wesentlichen beschreibenden Statistiken des hämatologisch gesunden Kontrollkollektivs wider, sowie Referenzwerte für Erwachsene der Literatur<sup>57,138</sup>.

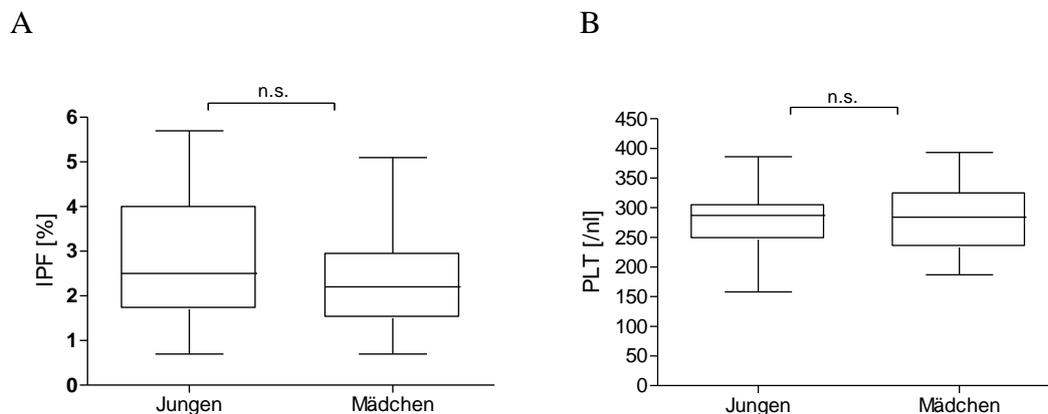
**Tabelle 5.** Referenzwerte der Thrombozytenparameter bei hämatologisch gesunden Kindern (SD = Standardabweichung; N = Anzahl; w = weiblich; m = männlich).

<b>Thrombozytenparameter</b>	<b>N</b>	<b>Mittelwert/ SD; Median</b>	<b>Spannweite</b>	<b>Referenzwerte für Erwachsene</b>
<b>PLT (/nl)</b>	100	279 ± 51; 286	158–393	150–400
<b>MPV (fl)</b>	100	10,3 ± 0,7; 10,2	8,7–11,9	m 9,3–12,1; w 9,1–11,9 [Pekelharing 2009]
<b>PDW (fl)</b>	100	12,3 ± 1,4; 12,2	9,6–15,7	m 10,1–16,1; w 9,9–15,4 [Pekelharing 2009]
<b>PCT (%)</b>	100	0,29 ± 0,05; 0,29	0,16–0,40	m 0,17–0,32; w 0,18–0,39 [Pekelharing 2009]
<b>P-LCR (%)</b>	53	27,3 ± 6,5; 26,9	15,7–41	m 18,5–42,3; w 17,5–42,3 [Pekelharing 2009]
<b>P-MFV (/nl)</b>	52	8,8 ± 0,56; 8,8	7,5–10	7,4–13,4 [Pekelharing, 2009]
<b>IPF (%)</b>	100	2,7 ± 1,3; 2,3	0,7–5,7	1,1–6,1 [Briggs, 2004]
<b>IPF# (/nl)</b>	100	7,2 ± 3,4; 6,6	2,2–16,6	/

Die ermittelten Referenzwerte sind vergleichbar mit den bereits in der Literatur veröffentlichten Werten für gesunde Erwachsene<sup>138</sup>. Daher lässt sich vermuten, dass die Thrombozytose in Erwachsenen und Kindern, mit Ausnahme von sehr jungen Kindern (siehe unten) keine größeren Unterschiede aufweist.

In einer Studie, in die 2135 Kinder zwischen 4 und 19 Jahren eingeschlossen wurden, konnte gezeigt werden, dass Mädchen höhere Thrombozytenzahlen aufweisen als Jungen<sup>41</sup>. Auch bei gesunden weiblichen Neugeborenen und erwachsenen Frauen konnten höhere Thrombozytenzahlen als bei Männern nachgewiesen werden<sup>83</sup>. Möglicherweise deutet dies auf den Einfluss von Hormonen hin, insbesondere auf Kompensationsmechanismen im Zusammenhang mit menstruellem Blutfluss<sup>71</sup>.

Für die in dieser Studie untersuchten hämatologisch gesunden Kinder konnte hingegen keine Abhängigkeit der untersuchten Thrombozytenparameter vom Geschlecht festgestellt werden (Ergebnisse exemplarisch für IPF% und PLT: Abb. 12 A und B; Tabelle 6). Die für diese Studie definierten Referenzwerte können demnach gleichsam für Mädchen und Jungen angewandt werden.



**Abbildung 12. A und B.** IPF% und PLT zeigen keinen signifikanten Unterschied im Vergleich von hämatologisch gesunden Mädchen (n = 41) und Jungen (n = 59).

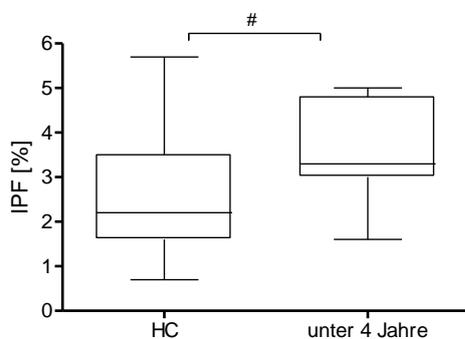
**Tabelle 6.** Referenzwerte der Thrombozytenparameter bei hämatologisch gesunden Mädchen und Jungen (N = Anzahl; SD = Standardabweichung; n.s. = nicht signifikant).

	N Mädchen	Mittelwert/ SD Median	Spann- weite	N Jungen	Mittelwert/ SD Median	Spann- weite	Mann- Whitney Test
<b>PLT</b> (/nl)	41	283,9±53,3 284	187- 393	59	275,8±49,8 287	158- 386	n.s.
<b>MPV</b> (fl)	41	10,41±0,66 10,2	8,7- 11,6	59	10,31±0,75 10,3	8,8- 11,9	n.s.
<b>PDW</b> (fl)	41	12,32±1,31 11,9	9,6- 15,5	59	12,33±1,39 12,2	10,0- 15,7	n.s.
<b>PCT</b> (%)	41	0,29±0,05 0,29	0,21- 0,4	59	0,2±0,05 0,29	0,16- 0,39	n.s.
<b>P-LCR</b> (%)	21	26,98±4,86 26,3	16,0- 38,4	32	27,4±7,35 28,3	15,7- 41,0	n.s.
<b>P-MFV</b> (/nl)	19	8,7±0,45 8,6	8,0-9,7	33	8,8±0,62 8,8	7,5- 10,0	n.s.
<b>IPF</b> (%)	41	2,35±1,17 2,2	0,7-5,1	59	2,85 ±1,39 2,5	0,7-5,7	n.s.
<b>IPF#</b> (/nl)	41	6,4±2,56 6,3	2,3- 12,6	59	7,7±3,76 7,0	2,2- 16,6	n.s.

Für einen Teil der Thrombozytenparameter ist bekannt, dass sie vom Alter abhängig sind. Für PLT und PCT konnte in Kindern eine statistisch signifikante negative Korrelation und für MPV und PDW eine positive Korrelation mit dem Alter nachgewiesen werden<sup>41,42</sup>. Mädchen wiesen zudem einen Anstieg von PCT während der Pubertät auf<sup>41</sup>.

In der für diese Studie untersuchten Kontrollkohorte fielen, in der Gruppe der Mädchen, mit zunehmendem Alter die PLT und der PCT ab ( $p < 0,05$ ), während die Jungen keine Veränderung der beiden Parameter mit dem Alter zeigten ( $p > 0,05$ ). Im Gegensatz stiegen die Parameter MPV, PDW und P-LCR mit zunehmendem Alter in beiden Gruppen an (Mädchen  $p < 0,01$ ; Jungen  $p < 0,05$ ). Das P-MFV zeigte nur in der Gruppe der Jungen einen Anstieg mit dem Alter ( $p < 0,01$ ). IPF% und IPF# waren in beiden Gruppen unabhängig vom Alter.

Da in Neugeborenen eine gesteigerte Thrombozytopoese nachgewiesen werden konnte, wurden zusätzlich die IPF%-Werte der Kinder  $\leq 4$  Jahren mit denen der Kinder zwischen 5-17 Jahren verglichen (Abb. 13)<sup>139</sup>. Es ergaben sich für die Kinder im Alter  $\leq 4$  Jahren statistisch signifikant höhere IPF%-Werte im Vergleich mit den Kindern im Alter zwischen 5-17 Jahren ( $p < 0,05$ ). Dies könnte auf eine verstärkte Stimulation der Thrombozytopoese in den ersten Lebensjahren hinweisen.



**Abbildung 13.** Erhöhte IPF%-Werte in hämatologisch gesunden Kindern  $\leq 4$  Jahren im Vergleich mit Kindern  $> 4$  Jahren weisen auf eine Steigerung der Thrombozytopoese hin.

Zusammenfassend ist für die Anwendung und Interpretation, zumindest eines Teils der Thrombozytenparameter, die Berücksichtigung des Alters von Bedeutung ist.

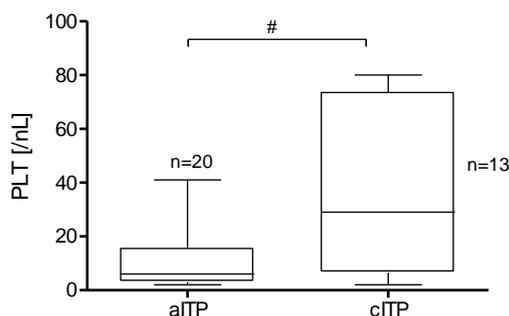
In Studien, welche die Beziehung von PLT und MPV in Kindern untersuchten, konnte bereits gezeigt werden, dass zwischen PLT und MPV eine inverse Korrelation besteht<sup>41,42</sup>. Auch PLT und IPF weisen eine inverse Beziehung auf. Hierfür wird die Reifung der Thrombozyten und der damit verbundene Abbau an intrazellulärer RNA verantwortlich gemacht<sup>57</sup>.

Dieses Verhältnis von PLT zur IPF% zeigte sich auch in der für diese Studie untersuchten Kontrollkohorte. In Probanden mit niedrigen PLT-Werten wurden höhere IPF%-Werte gefunden und vice versa ( $p < 0,01$ ). Die Parameter MPV, P-LCR und P-MFV beschreiben ebenfalls die Größe der Thrombozyten und die PDW die Verteilungsbreite der Thrombozytengröße. Die genannten Parameter korrelierten direkt mit der IPF% ( $p < 0,01$ ). Für sie konnte auch eine inverse Beziehung mit der PLT demonstriert werden (MPV und PDW  $p < 0,01$ ; P-LCR und P-MFV:  $p < 0,05$ ). PLT und PCT zeigten hingegen eine direkte Korrelation ( $p < 0,01$ ). PCT ist als das Produkt von PLT und MPV definiert. Die gegenläufigen Veränderungen von MPV bei Anstieg oder Abfall der PLT scheinen zu gering, um den PCT zu beeinflussen. PLT und IPF# sowie IPF% und PCT zeigten keine Korrelation ( $p > 0,05$ ).

### 3.3 Thrombozytenparameter der ITP-Patienten

Zunächst wurden die Thrombozytenparameter PLT, IPF%, IPF#, MPV und PDW von ITP-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose und ITP-Patienten im chronischen Stadium miteinander verglichen. Das Ziel hierbei war, das Potential der Parameter zur Differenzierung der beiden Krankheitsstadien zu evaluieren.

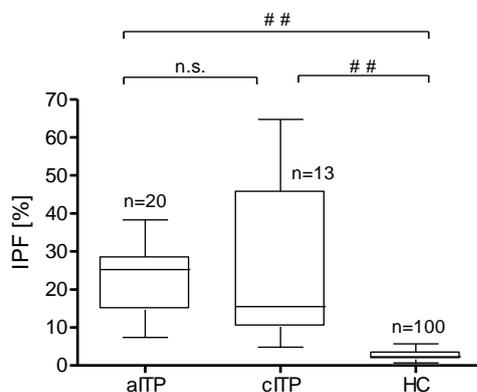
Die Mehrzahl der aITP-Patienten zeigte zum Zeitpunkt der Diagnose eine schwere Thrombozytopenie (PLT =  $10,4 \pm 8/\text{nl}$ ; Median 6/nl). Die Thrombozytenzahlen der cITP-Patienten lagen im Vergleich höher (PLT =  $35,5 \pm 30,8/\text{nl}$ ; Median 29/nl;  $p < 0,05$ ; Abb. 14).



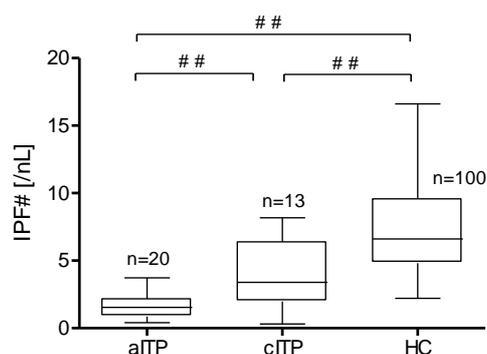
**Abbildung 14.** Boxplot-Analyse der PLT-Werte bei aITP- und cITP-Patienten. PLT ermöglicht eine Diskriminierung von aITP- und cITP-Patienten.

Wie erwartet wurden für beide Gruppen signifikant höhere IPF%-Werte im Vergleich mit der Kontrollgruppe gemessen ( $p < 0,01$ ). Die IPF%-Werte der aITP- und cITP-Patienten unterschieden sich hingegen nicht ( $22,7 \pm 9,5\%$ ; Median 25,2% in aITP- versus  $25,4 \pm 18,7\%$ ; Median 15,5% in cITP-Patienten;  $p > 0,05$ ). Die IPF%-Werte der cITP-Patienten wiesen jedoch eine größere Spannweite auf als die der aITP-Patienten (4,8 - 64,7% für cITP- versus 7,4 - 38,3% für aITP- Patienten; Abb. 15 A). Die IPF#-Werte der aITP-Patienten sowie der cITP-Patienten waren signifikant niedriger als die der Kontrollgruppe ( $p < 0,01$ ). Zudem ergab die statistische Analyse signifikant höhere IPF#-Werte für die Gruppe der cITP-Patienten im Vergleich zu denen der aITP-Patienten ( $1,7 \pm 1/\text{nl}$ ; Median 1,5/nl in aITP- versus  $4,1 \pm 2,7/\text{nl}$ ; Median 3,4/nl in cITP-Patienten;  $p < 0,01$ ; Abb. 15 B).

A



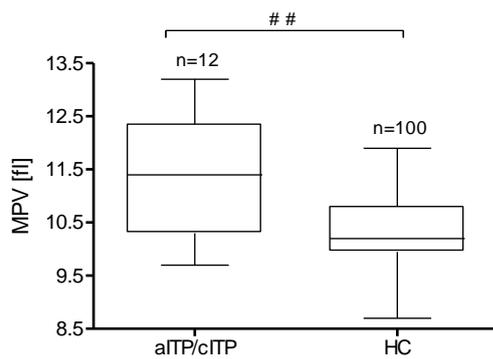
B



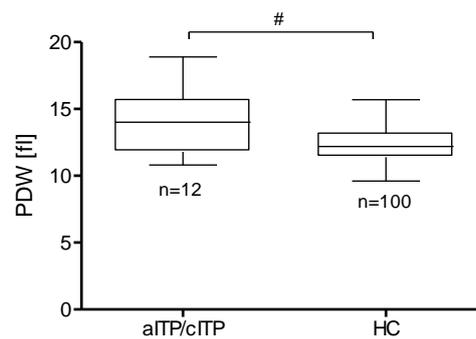
**Abbildung 15.** Boxplot-Analyse der **IPF%- und IPF#-Werte** bei aITP- und cITP-Patienten. A) Erhöhte IPF%-Werte in a-ITP und cITP-Patienten implizieren eine erhöhte Thrombozytenproduktion bei allen ITP-Patienten. IPF% erlaubt keine Diskriminierung zwischen aITP- und cITP-Patienten. B) IPF# ist bei cITP-Patienten signifikant höher als bei aITP-Patienten.

Neben IPF% waren auch das MPV und die PDW der ITP-Patienten (aITP  $n = 7$ ; cITP  $n = 5$ ) im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe erhöht, d.h. die erhöhten IPF%-Werte korrelierten mit einer Zunahme des Thrombozytenvolumens (MPV  $p < 0,01$ ; PDW  $p < 0,05$ ; Abb. 16). Im Vergleich von aITP- und cITP-Patienten zeigten die cITP-Patienten höhere Werte für MPV und PDW ( $p < 0,05$ ). Aufgrund der stark erniedrigten PLT-Werte, konnten das MPV und die PDW im Vergleich zur IPF aus technischen Gründen nur in 12 der ITP-Patienten bestimmt werden. Tabellen 7 und 8 fassen die Patientencharakteristika der aITP und cITP-Patienten noch einmal zusammen.

A



B



**Abbildung 16.** Boxplot-Analyse der MPV- und PDW-Werte bei aITP- und cITP-Patienten. A) MPV diskriminiert zwischen ITP-Patienten und gesunden Kontrollen. B) PDW diskriminiert bedingt zwischen ITP-Patienten und gesunden Kontrollen.

**Tabelle 7.** Patientencharakteristika der aITP-Patienten (n. b. = nicht bestimmt; WBC = *White Blood Cell Count*; Hb = Hämoglobin; w = weiblich; m = männlich; MK's = Megakaryozyten; \*Knochenmarkuntersuchung aufgrund einer Splenomegalie; \*\*Alter bei Messung).

Patientennummer	Geschlecht	Alter **	PLT /nl	IPF%	IPF#	MK's
1	m	12,3	22	14,2	3,1	n.b.
2*	m	6,0	3	35,3	1,0	Anzahl erhöht
3	m	10,7	5	24,6	1,2	n.b.
4	m	4,4	5	25,8	1,3	n.b.
5	m	4,3	22	7,4	1,6	n.b.
6	m	8,0	6	27,1	1,6	n.b.
7*	w	13,6	3	27,5	0,8	Anzahl erhöht
8	m	8,8	11	13,4	1,5	n.b.
9	w	2,4	17	18,2	3,1	n.b.
10	w	2,1	6	27,2	1,6	n.b.
11	m	10,7	2	37,0	0,7	n.b.
12	w	12,7	9	9,3	0,8	n.b.
13	m	16,4	41	9,1	3,7	n.b.
14	m	1,1	22	15,6	3,4	n.b.
15	w	16,4	2	27,6	0,6	n.b.
16	w	14,4	14	15,2	2,1	n.b.
17	m	14,8	3	29,5	0,8	n.b.
18	w	3,9	7	31,8	2,2	n.b.
19	m	1,7	5	38,3	1,9	n.b.
20	w	9,2	22	15,6	3,4	n.b.

**Tabelle 8.** Patientencharakteristika der cITP-Patienten (n. b. = nicht bestimmt; WBC = *White Blood Cell Count*; Hb = Hämoglobin; w = weiblich; m = männlich; MK's = Megakaryozyten; \*\* Alter bei Messung).

Patientennummer	Geschlecht	Alter	PLT/nl	IPF%	IPF#	MK`s
1	w	17,6	2	15,2	0,3	n.b.
2	w	7	29	7,3	2,1	n.b.
3	w	9,8	35	15,5	5,4	n.b.
4	m	13,7	34	14,6	4,7	n.b.
5	w	10	11	16,5	1,8	n.b.
6	w	17	80	9,2	7,4	n.b.
7	w	12,3	29	28,2	8,2	n.b.
8	w	13,8	2	64,7	1,3	n.b.
9	w	18	6	50,8	3	n.b.
10	w	6,8	79	46	36,3	n.b.
11	w	7	7	45,7	3,2	n.b.
12	w	12	72	11,2	8,1	n.b.
13	m	9+3	75	4,8	4,8	n.b.

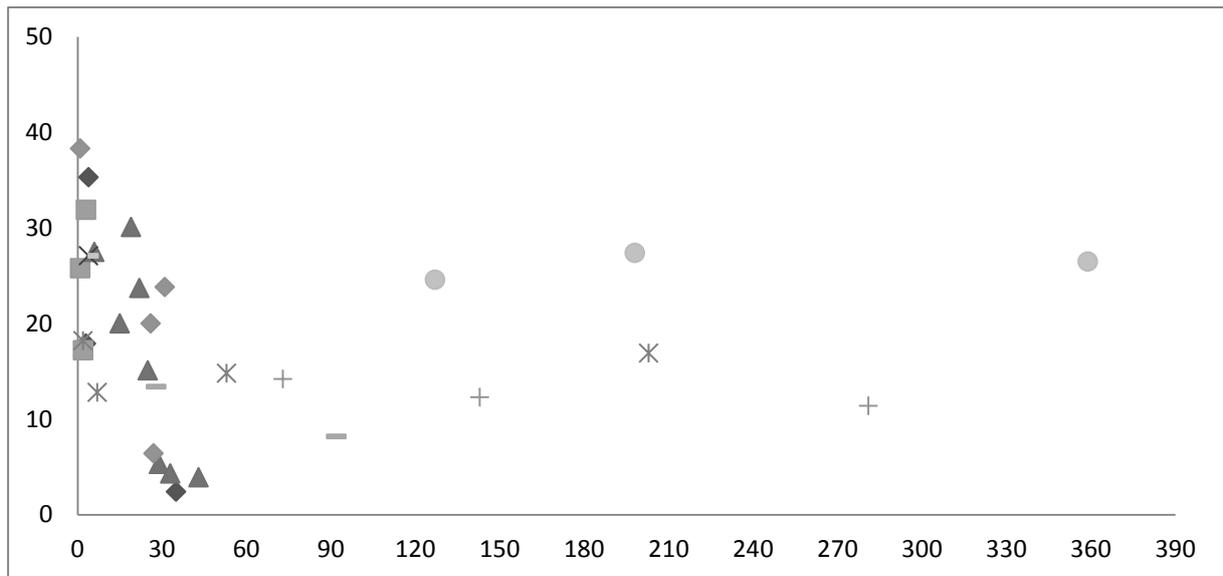
### 3.3.1 Verläufe

In einem nächsten Schritt wurden die IPF%-Werte der Patienten mit akuter und chronischer ITP im zeitlichen Verlauf verglichen, mit dem Ziel, den prädiktiven Wert des Parameters im Bezug auf die Progression der Erkrankung von einer aITP zu einer cITP zu evaluieren. Da die meisten Patienten nicht dazu bereit waren, sich mehrmals im Verlauf Blut abnehmen zu lassen, konnten nur beispielhaft Daten im zeitlichen Verlauf gewonnen werden.

Für vier Patienten mit akuter ITP und vier Patienten mit chronischer ITP standen IPF%-Werte im Verlauf über einen längeren Zeitraum, zur Verfügung. Die IPF%-Werte in der Gruppe mit akuter ITP zeigten zum Zeitpunkt der Diagnose einen starken Anstieg und fielen innerhalb der ersten 50 Tage nach Diagnosestellung wieder in den Normalbereich ab. Gleichzeitig stiegen die PLT-Werte wieder auf ein normales Niveau und die Patienten erreichten eine Remission. Drei dieser vier Patienten erhielten Immunglobuline kurz nach Diagnosestellung.

Die IPF%-Werte der chronischen ITP-Patienten zeigten im Gegensatz zu den Patienten mit akutem Verlauf keinen Abfall in den Normalbereich, sondern waren kontinuierlich erhöht (> 9%). Dementsprechend zeigten die Patienten eine anhaltende, schwere Thrombozytopenie mit stark erniedrigten PLT-Werten (Abb. 17 und 18). Zwei der Patienten wurden im Verlauf mit Immunglobulinen behandelt, sprachen darauf jedoch nicht an.

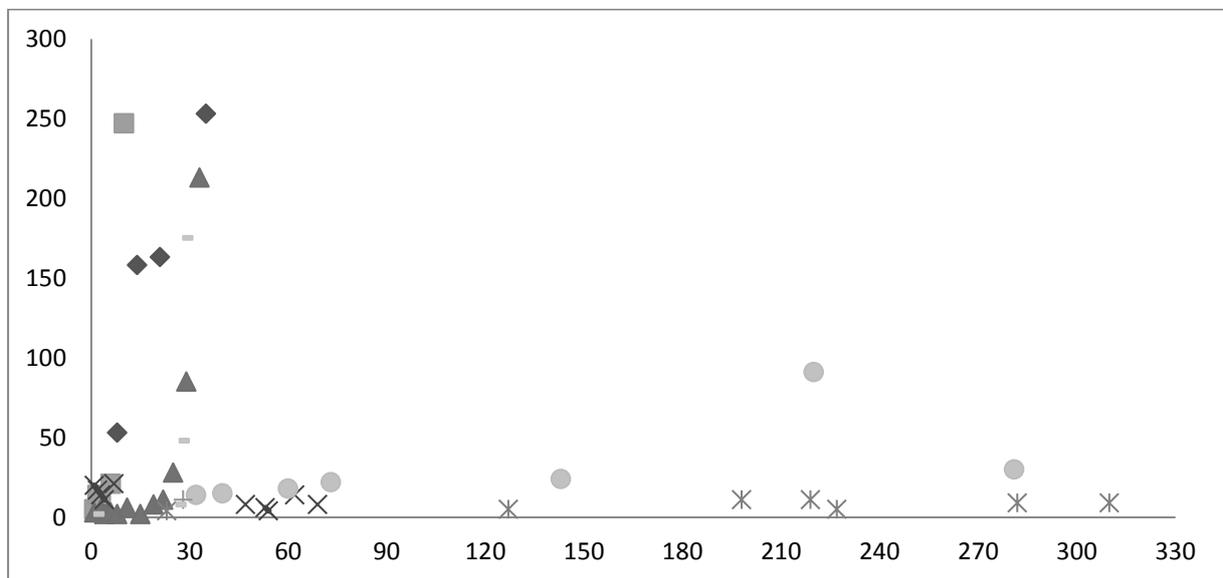
IPF[%]



Tage nach Diagnosestellung

**Abbildung 17 IPF%-Werte der ITP-Patienten im Verlauf.** A) IPF%-Werte von 4 Patienten mit aITP und 4 Patienten mit cITP. 0 = Tag der Diagnose; schwarze Symbole = Patienten mit akutem Verlauf; hellgraue Symbole = Patienten mit chronischem Verlauf.

PLT/nl



Tage nach Diagnostellung

**Abbildung 18 PLT-Werte der ITP-Patienten im Verlauf.** PLT-Werte von 4 Patienten mit aITP und 4 Patienten mit cITP. 0 = Tag der Diagnose; schwarze Symbole = ITP-Patienten mit akutem Verlauf; hellgraue Symbole = ITP-Patienten mit chronischem Verlauf.

### 3.3.2 Beziehung von PLT und IPF zur Blutungsneigung

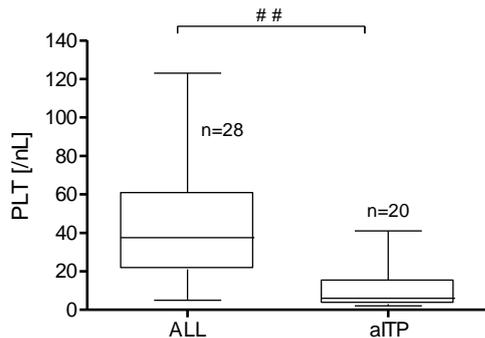
Die Blutungsneigung von Patienten mit ITP adäquat einschätzen zu können, ist essentiell für den richtigen, angemessenen Einsatz von Therapien und die Lebensqualität des Kindes. Für diese Studie wurde untersucht, inwieweit die IPF, neben der PLT-Zahl, in der Einschätzung der Blutungsneigung hilfreich sein kann. Die Blutungsneigung der ITP-Patienten zum Zeitpunkt der Messung der Thrombozytenparameter wurde anhand eines etablierten Blutungsscore (Buchanan *et al.*; *The Journal of Pediatrics*, 2002) bestimmt<sup>112</sup>.

Die IPF%- sowie PLT- und IPF#-Werte konnten in insgesamt 16 ITP-Patienten während des akuten Verlaufes und in 7 mit bereits chronischen Verlauf mit der Blutungsneigung am Tag der Messung korreliert werden.

Zu Beginn der Erkrankung, während des akuten Verlaufes, zeigte sich eine inverse Beziehung von PLT und der Blutungsneigung ( $r = -0,69$ ;  $p = 0,0031$ ). In Patienten mit chronischem Verlauf korrelierte die PLT nicht mit der Blutungsneigung ( $r = -0,3148$ ;  $p = 0,4976$ ). Die IPF%-Werte der akuten ITP-Patienten zeigten interessanterweise einen Anstieg mit der Blutungsneigung ( $r = 0,7485$ ;  $p = 0,0009$ ), wohingegen sich in den Patienten mit chronischem Verlauf keine Korrelation zeigte ( $r = 0,5819$ ;  $p = 0,1667$ ). Für die IPF#-Werte konnte in keiner der Gruppen eine signifikante Korrelation mit der Blutungsneigung nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse könnten, auf ein unterschiedliches Blutungsverhalten von aITP- und cITP-Patienten hindeuten.

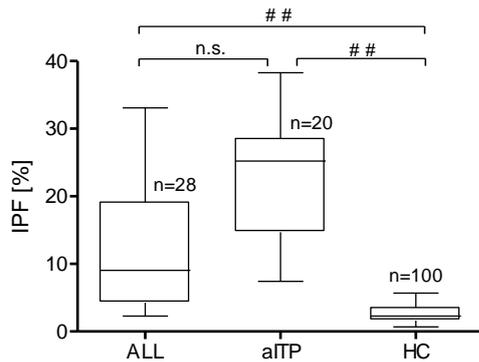
### 3.4 Thrombozytenparameter der ALL-Patienten im Vergleich

Die Mehrheit der ALL-Patienten zeigte zum Zeitpunkt der Diagnose eine mittelgradige Thrombozytopenie, als Zeichen der Verdrängung der Megakaryozytopoese durch leukämische Blasten ( $45,4 \pm 30,9/\text{nL}$ ; Median  $37,5/\text{nL}$ ). Die Thrombozytenzahlen lagen signifikant höher, als die der aITP-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose ( $p < 0,01$ ; Abb. 19).



**Abbildung 19.** Boxplot-Analyse der PLT-Werte bei ALL- und aITP-Patienten. A) ALL-Patienten weisen zum Zeitpunkt der Diagnose durchschnittlich höhere PLT-Werte auf als aITP-Patienten.

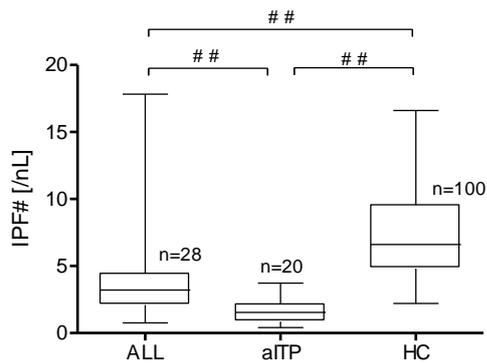
Da die Frequenz der Megakaryozyten im Knochenmark der ALL-Patienten im Rahmen der Suppression der Megakaryopoese niedrig war (siehe unten, Tabelle 9) erwarteten wir normale IPF%-Werte. Erstaunlicherweise waren diese im Vergleich mit der Kontrollgruppe signifikant erhöht ( $12,1 \pm 9,4\%$ ; Median  $9,1\%$ ;  $p < 0,01$ ). Dies legt nahe, dass die Thrombozytopenie während der Entwicklungsphase einer ALL, trotz geringer Megakaryozytenzahlen im Knochenmark, stimuliert wird. Die IPF%-Werte der ALL-Patienten lagen jedoch nicht höher, als die der aITP-Patienten ( $p < 0,01$ ; Abb. 20).



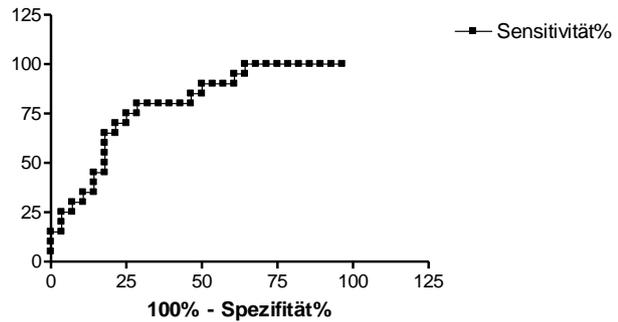
**Abbildung 20.**Boxplot-Analyse der IPF%-Werte bei ALL- und aITP-Patienten. Erhöhte IPF%-Werte in ALL-Patienten weisen auf eine Stimulation der Thrombozytopoese hin. IPF% erlaubt keine Diskriminierung zwischen ALL- und aITP-Patienten.

Um den Zusammenhang zwischen den erhöhten IPF%-Werten der ALL-Patienten und die Möglichkeit von extramedullärer Blutbildung näher zu untersuchen, wurden die IPF%-Werte mit dem Grad der Hepatosplenomegalie korreliert. Hierbei konnte keine Abhängigkeit nachgewiesen werden ( $p > 0,05$ ). Obwohl die Thrombozytenzahlen in den ALL-Patienten weniger stark reduziert waren, als in den aITP-Patienten, waren die IPF%-Werte im Vergleich zu denen der gesunden Kontrollen signifikant erniedrigt ( $p < 0,01$ ; Abb. 21 A). Die Werte der beiden Gruppen zeigten jedoch eine weite Überlappung. Weiterhin erlaubte IPF% eine Diskriminierung von ALL- und aITP-Patienten. Die IPF%-Werte der ALL-Patienten waren signifikant höher, als die der aITP-Patienten ( $4,1 \pm 3,5/\text{nl}$ ; Median  $3,2/\text{nl}$  in ALL-Patienten versus  $1,7 \pm 1,0/\text{nl}$ ; Median  $1,6/\text{nl}$  in aITP-Patienten;  $p < 0,01$ ; Abb. 21 A). Ein Cutoff-Wert von  $< 2,361$  für IPF% ergab eine Sensitivität von 80% und eine Spezifität von 71,4% für die Differenzierung der beiden Erkrankungen zum Zeitpunkt der Diagnose (Abb. 21 B).

A



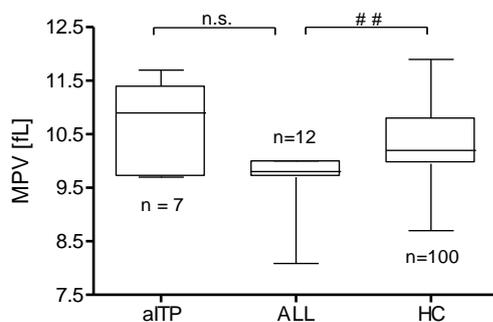
B



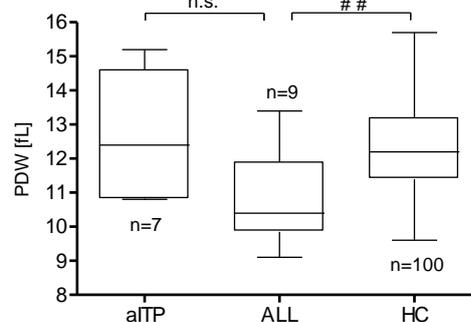
**Abbildung 21.** Boxplot-Analyse von IPF# bei ALL- und aITP-Patienten. A) ALL-Patienten weisen höhere IPF#-Werte auf als aITP-Patienten. Der Parameter ermöglicht die Diskriminierung der beiden Gruppen zum Zeitpunkt der Diagnose. B) Sensitivität und Spezifität für IPF# zur Differenzierung von ALL- und aITP-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose.

MPV und PDW waren keine Hilfe bei der Diskriminierung von ALL- und aITP-Patienten ( $p > 0,05$ ). Jedoch waren beide Parameter in den ALL-Patienten im Vergleich mit den gesunden Kontrollen signifikant erniedrigt ( $p < 0,01$ ; Abb. 22).

A



B



**Abbildung 22.** Boxplot-Analyse von MPV und PDW bei ALL- und aITP-Patienten sowie gesunden Kontrollen. A) MPV ermöglicht die Differenzierung der ALL-Patienten von den gesunden Kontrollen, nicht jedoch von den aITP-Patienten. B) PDW ermöglicht die Differenzierung der ALL-Patienten von den gesunden Kontrollen, nicht jedoch von den aITP-Patienten.

Tabelle 9 fasst die wichtigsten Patientencharakteristika und klinischen Parameter der ALL-Patienten noch einmal zusammen.

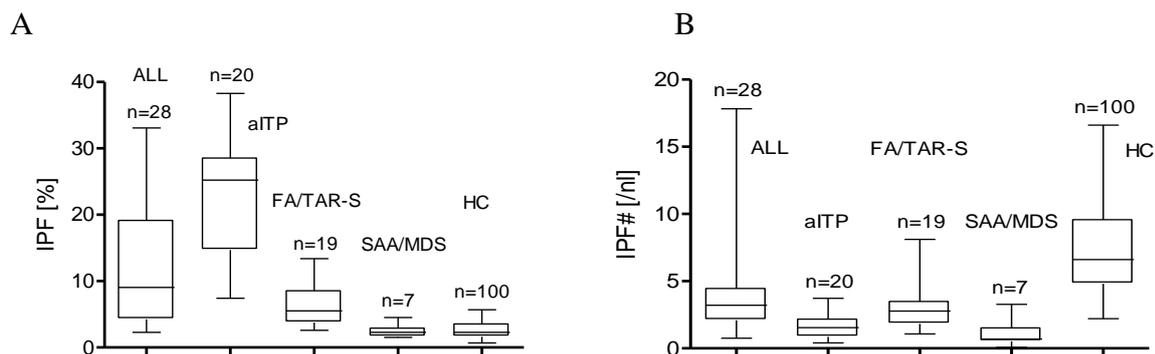
**Tabelle 9.** Patientencharakteristika sowie klinische Parameter der ALL-Patienten. WBC = *White Blood Cell Count*; Hb = Hämoglobin; MK`s = Megakaryozyten: 0 keine, (+): 1 pro Objektträger (Ausstrich); BM FAB = Knochenmark gemäß FAB-Klassifikation; HSM = Hepatosplenomegalie (0 = keine; + = 2-3 cm; ++ = 4-6 cm); RG = Risikogruppe; SR = Standard-Risikogruppe, HR = Hoch-Risikogruppe; n.b.= nicht bestimmt. w = weiblich; m = männlich. \* bei Diagnosestellung.

Patienten-nummer	Geschlecht	Alter * (Jahre)	WBC	Hb [mg /dl]	PLT [nl]	IPF [%]	IPF# [nl]	MK`s	BM FAB	HS M	RG
1	w	13,3	109	6,7	54	33	18	(+)	L1	+	SR
2	m	8,8	4,6	4,8	14	33,1	4,6	0	L1	0	SR
3	m	4,7	7	3,1	5	19,7	0,9	0	L1	+	SR
4	m	15,7	25,6	7	26	31,1	8,1	0	L1	++	SR
5	m	17,6	6,2	10,5	52	18,6	9,7	0	L1	+	SR
6	m	8,5	3,9	10,4	21	10,5	2,2	0	L1	0	SR
7	w	4,2	24,9	6,8	19	8,8	1,7	0	L1	+	SR
8	m	4,4	63,4	4,6	39	8	3,1	0	L1	+	SR
9	m	6,3	27,2	8,5	52	6,4	3,3	0	L1	+	SR
10	m	3,7	62,2	9,9	52	8	4,1	0	L1/L2	++	HR
11	w	4,1	14	8,4	84	3,5	2,9	(+)	L1/L2	+	SR
12	m	3,8	19,4	7,8	56	9,3	5,2	n.b.	L1	n.b.	SR
13	m	1,7	5,5	4,9	41	8,2	3,4	(+)	L1	+	SR
14	w	4,0	13,3	6,7	21	18,6	3,9	0	L1	+	SR
15	m	9,0	2,7	7,8	66	5	3,3	(+)	L1	0	SR
16	w	1,4	122	7,1	16	12,3	1,9	(+)	L1	+	SR
17	m	8,2	8,44	8,6	123	2,3	2,8	(+)	L1	0	HR
18	w	4,2	18,7	3,5	6	20,3	1,2	0	L1	+	SR
19	w	11,2	125	7,9	30	2,9	0,8	0	L1	+	SR
20	m	11,0	6,1	10	36	22	7,9	(+)	L1/L2	0	SR
21	m	3,6	8,8	11,3	108	2,7	2,9	(+)	L1	+	SR
22	m	2,6	37	7,5	96	2,4	2,4	0	L1/L2	+	SR
23	m	2,7	86	6,2	32	11,3	3,6	(+)	L1/L2	0	SR
24	w	15,2	8,8	6,9	34	20,2	6,8	0	L1	+	SR
25	m	15,6	4,9	6,6	26	2,9	0,7	0	L1	0	SR
26	m	13,5	6,2	8,1	70	6,1	4,2	(+)	L1	0	SR
27	m	2,7	1,9	9,4	78	3,3	2,5	(+)	L2	0	SR
28	w	3,3	57	9,4	15	9,3	1,3	0	L1	+	HR

### 3.5 Relative und absolute *Immature Platelet fraction*

Um die Frage zu beantworten, ob IPF% den Status der Thrombozytopoese reflektiert, wurden zum einen zusätzlich Daten von Patienten mit FA (n = 10) und TAR-S (n = 9) erhoben, die an einer kongenitalen Thrombozytopenie leiden, zum anderen von Patienten mit Myelodysplastischen Syndrom (MDS) (n = 4) und schwerer aplastischer Anämie (SAA) (n = 3). Bei ihnen liegt wie bei den ALL-Patienten eine erworbene Thrombozytopenie mit einer erheblichen Störung der Megakaryozytopoese vor. Da MDS- und AA-Patienten niedrige IPF%-Werte im Normalbereich, aufwiesen, welche den Defekt der Thrombozytopoese widerspiegeln, scheint IPF% tatsächlich den Status der Thrombozytopoese zu reflektieren (Abb. 23 A).

IPF# war in allen Patientengruppen signifikant niedriger als in der Gruppe der Kontrollen ( $p < 0,01$ ). Wie bereits in Kapitel 3.4 dargestellt kann der Parameter zur Differenzierung von aITP- und ALL-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose dienen (Abb. 23 B)

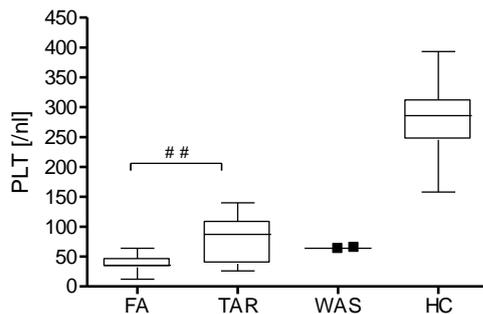


**Abbildung 23.** A) Ein niedriger IPF%-Wert spiegelt einen Defekt der Thrombozytenbildung wider. B) IPF# ist hilfreich für die Differenzierung von aITP- und ALL-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose.

#### 3.5.1 Kongenitale Thrombozytopenien

In einem nächsten Schritt sollte die Frage beantwortet werden, ob einer der Thrombozytenparameter einen Beitrag zur Differenzierung der kongenitalen Thrombozytopenien bei FA und TAR-S leisten kann, um eine frühe und adäquate Behandlung zu ermöglichen. Neben diesen Patienten konnten die Parameter zusätzlich bei zwei Patienten mit Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) gemessen werden. Das WAS ist eine seltene Thrombozytopenie, die durch kleine Thrombozyten, einen Immundefekt mit rekurrenden Infektionen und Ekzeme

charakterisiert ist. Zudem besteht ein erhöhtes Risiko für Autoimmunerkrankungen und maligne Tumoren<sup>140</sup>. Die Mehrheit der FA-Patienten zeigte eine mittelgradige Thrombozytopenie mit einer PLT von  $37,5 \pm 13,7/\text{nl}$  (Median:  $35,5/\text{nl}$ ; Spannweite: 12-64/nl). Die PLT-Werte der TAR-S-Patienten lagen im Vergleich mit  $79,3 \pm 38,8/\text{nl}$  (Median:  $87/\text{nl}$ ; Spannweite: 26-140/nl) höher ( $p < 0,01$ ; Abb. 24). In drei TAR-S-Patienten lag der PLT-Wert über 100/nl. Jedoch war ein höherer PLT-Wert nicht automatisch mit höherem Alter assoziiert.

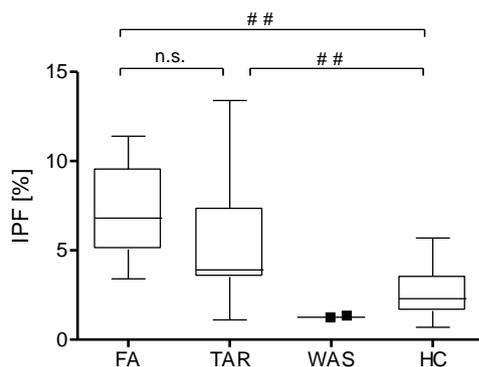


**Abbildung 24.** PLT-Werte bei FA- und TAR-Patienten. PLT ermöglicht die Differenzierung zwischen FA- und TAR-S-Patienten.

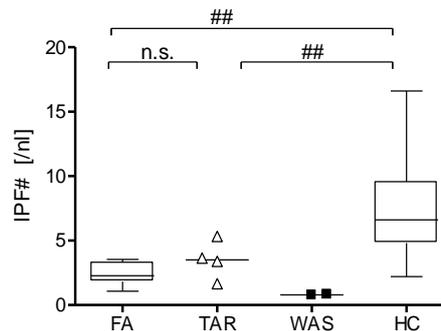
Die IPF%-Werte der FA-Patienten lagen überraschenderweise mit  $7,0 \pm 2,5\%$ , genau wie die der TAR-S-Patienten mit  $5,5 \pm 3,6\%$ , deutlich höher als in der Kontrollgruppe ( $p < 0,01$ ). Der Wert war jedoch nicht hilfreich zur Differenzierung von FA- und TAR-S-Patienten ( $p > 0,05$ ; Abb. 25 A). Die IPF%-Werte der beiden WAS-Patienten lagen im Normalbereich und waren somit signifikant niedriger als jene der FA- oder TAR-S-Patienten. Da die Parameter jedoch nur in zwei WAS-Patienten zur Verfügung standen, bedarf es Messungen von einer größeren Patientenzahl, um mit Sicherheit sagen zu können, ob IPF% zur Differenzierung der Erkrankungen hilfreich sein könnte.

IPF# war in den FA-Patienten ( $2,3 \pm 0,8/\text{nl}$ ) sowie in den TAR-S-Patienten ( $3,6 \pm 1,9/\text{nl}$ ) signifikant reduziert ( $p < 0,01$ ; Abb. 25 B).

A



B



**Abbildung 25.** Boxplotanalyse der IPF%-Werte bei FA, TAR-S und WAS-Patienten. A) IPF% ist hilfreich um FA- und TAR-S-Patienten von gesunden Kontrollen und WAS-Patienten zu differenzieren. Der Wert ist nicht aussagekräftig, um FA- und TAR-S-Patienten voneinander zu differenzieren. B) Die IPF#-Werte waren in allen drei Patientengruppen (FA, TAR-S und WAS) im Vergleich mit den gesunden Kontrollen reduziert.

### 3.5.2 Thrombozytenparameter in Patienten mit Reaktiver Thrombozytose (RT)

Eine RT ist ein häufiger Befund bei Kindern mit Infektionen und/oder Eisenmangel, im Gegensatz zur der im Kindesalter selten auftretenden essentiellen Thrombozythämie (ET). Da die ET, als klonale Erkrankung zu thromboembolischen und hämorrhagischen Komplikationen führen kann, ist es wichtig, die Erkrankung rechtzeitig zu erkennen und von einer RT abzugrenzen. Der erhöhte Umsatz von Thrombozyten in Patienten mit ET führt zu einer Erhöhung der relativen und absoluten Werte der IPF im Vergleich mit gesunden Kontrollen. Ob dieser Befund hilfreich in der Differenzierung von ET und RT sein kann, ist bisher noch unklar<sup>64,141</sup>. Für diese Studie wurden die Thrombozytenparameter bei neun Kindern mit RT, aufgrund einer anderen, zumeist entzündlichen Grunderkrankung, bestimmt. IPF stand nur in sieben der neun Kinder zur Verfügung. Die Patienten zeigten eine milde (PLT:500-700/nl) bis moderate (PLT:700-900/nl) Thrombozytose (PLT =  $651 \pm 69,9$ /nl, Median 647/nl). Diese bildete sich in allen Patienten mit der Behandlung und dem Abklingen der zugrunde liegenden Erkrankung wieder zurück. Dementsprechend waren auch der PCT ( $0,6 \pm 0,09$  %; Median 0,55 % . $p < 0,01$ ) und die IPF# ( $9,9 \pm 3,7$ /nl; Median 9,8/nl; $p < 0,05$ ) im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die IPF%-Werte der RT-Patienten waren sehr niedrig, jedoch nicht signifikant niedriger als die der Kontrollgruppe ( $1,5 \pm 0,6$  %; Median 1,5 %;  $p > 0,05$ ). Die Werte für MPV ( $9,1 \pm 0,8$  fl; Median 9 fl; $p < 0,01$ ) und PDW ( $9,9 \pm 1,1$  fl; Median 9,9 fl;  $p < 0,01$ ) waren im Vergleich mit der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt.

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Thrombozytenparameter: Reproduzierbarkeit und Stabilität

Die Thrombozytenzahl ist ein Routineparameter und essentiell für die Diagnosestellung von Thrombozytopenien. Neben der Thrombozytenzahl ist das MPV bisher der einzige Thrombozytenparameter der, vor allem in der Diagnosestellung von Mikro- oder Makrothrombozytopenien, in der Klinik zum Einsatz kommt<sup>142</sup>. Um das Blutungsrisiko bei Kindern mit Thrombozytopenie einschätzen zu können ist die Thrombozytenzahl in der Regel nicht ausreichend<sup>143-146</sup>. Ein einfacher Parameter zur Evaluation der Thrombozytenproduktion kann deshalb helfen, zwischen Thrombozytopenien aufgrund von Knochenmarkversagen, in welchen die Blutungswahrscheinlichkeit hoch ist und Thrombozytopenien aufgrund erhöhter peripherer Thrombozytendestruktion, mit insgesamt geringerem Blutungsrisiko, zu unterscheiden<sup>147</sup>.

Verschiedene Parameter, welche die Thrombozytenproduktion und den Thrombozytenumsatz beschreiben, wie die Bestimmung der Thrombozytenlebensdauer, des Glycocalicinindex und des TPO-Spiegels, wurden in der Vergangenheit untersucht<sup>148,149,150</sup>. Der Glycocalicinindex ist der lösliche extrazelluläre Teil der Glykoprotein-(GP)-1b alpha-Untereinheit des GP-1b-IX-V-Komplex und ein Indikator für Thrombozyten- und Megakaryozytendestruktion. Jedoch wurden in Patienten mit SAA und hypoplastischer Anämie falsch hohe Werte beschrieben und die Werte von ITP-Patienten zeigten eine sehr große Spannweite<sup>151,152</sup>. Auch die Bestimmung der Thrombozytenlebensdauer weist Probleme im Zusammenhang mit der Manipulation der Thrombozyten und der zum Einsatz kommenden Radioaktivität auf<sup>153</sup>. Die Analyse von TPO ist hilfreich in der Bewertung der Thrombozytenkinetik, aber in der Klinik bisher nicht routinemäßig durchführbar<sup>57</sup>.

Eine Reihe von Publikationen der letzten Jahre haben sich mit der Messung der retikulierten Plättchen beschäftigt. Es wurde gezeigt, dass in thrombozytopenen Patienten, der RNA-Gehalt der Thrombozyten mit der megakaryozytären Aktivität korreliert<sup>57</sup>. Die Bestimmung der retikulierten Plättchen ist jedoch eine unpräzise, teure und zeitaufwendige Methode, die zudem beträchtliche Fachkenntnisse erfordert. Weiterhin mangelt es an adäquaten Qualitätskontrollen und die ermittelten Referenzwerte für Gesunde zeigen eine erhebliche Variation (0,9-16,4 %) <sup>57,79,80,154</sup>. Daher wurde für diese Studie der Schwerpunkt auf die *Immature Platelet Fraction* gelegt. Sie beschreibt - wie die Retikulierten Plättchen - die Fraktion der jungen, unreifen Thrombozyten, welche einen höheren RNA-Gehalt sowie ein größeres Volumen aufweisen, als

reife Thrombozyten. Im Gegensatz zu denen aus der Thrombozytenverteilungskurve des Sysmex-XE und mit Hilfe von Impedanz ermittelten Thrombozytenparametern, kann die IPF auch bei sehr niedrigen Thrombozytenzahlen verlässlich im optischen RET-Kanal bestimmt werden.

Für diese Studie wurde zunächst die Reproduzierbarkeit der IPF% sowie der PLT in einer Probe mit normaler und in einer mit erhöhter und erniedrigter PLT untersucht (Messungen pro Probe  $n = 15$ ). Die Variationskoeffizienten der Messungen waren gering und die Reproduzierbarkeit in allen Proben, unabhängig von der Thrombozytenzahl, gut. Ein Nachteil dieser Untersuchung ist die geringe Probenanzahl. Briggs *et al.* (2004) konnten jedoch bereits eine gute Reproduzierbarkeit der Messergebnisse für IPF% aus Blutproben von 7 verschiedenen Individuen mit variierenden PLT-Werten (Messungen pro Probe  $n = 10$ ) nachweisen. Die numerischen Werte für IPF% waren in allen Proben klein, so dass höhere Variationskoeffizienten erwartet wurden. Jedoch waren die Variationskoeffizienten kleiner, wenn IPF hoch war<sup>57</sup>.

Weiterhin wurde für diese Studie die Stabilität der Thrombozytenparameter IPF%, PLT, MPV, PDW und P-LCR in sechs Proben über 48 h bei Raumtemperatur untersucht. PLT zeigte in keiner der Proben über 48 h eine signifikante Veränderung. Dies stimmt mit bisherigen Studienergebnissen überein, welche zu dem Ergebnis kamen, dass der PLT-Wert über 24 bzw. 48 h stabil blieb<sup>137,155</sup>.

Die IPF%-Werte zeigten bereits nach 2,5 Stunden in drei Proben einen signifikanten Abfall. Nach 48 h konnte hingegen in allen Proben ein Anstieg nachgewiesen werden, der in vier Proben signifikant war. Osei-Bimpong *et al.* kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass sich die in gelagerten Proben gemessenen IPF% Werte signifikant ( $p < 0.001$ ) von denen direkt nach Entnahme gemessenen Werten unterschieden<sup>156</sup>. Im Gegensatz dazu berichtete Briggs *et al.*, dass IPF% in sieben Blutproben während der Lagerung bei Raumtemperatur über 0,5-48 h nach Entnahme keine Veränderung zeigte<sup>57</sup>. Weiterhin kamen Ruisi *et al.* zu dem Ergebnis, dass IPF% in 103 Proben von ITP-Patienten, welche über 24 h gelagert wurden stabil blieb<sup>157</sup>. Die Ergebnisse zur Stabilität von IPF% sind demnach nicht einheitlich. Es wäre denkbar, dass diese Unterschiede zumindest teilweise durch unterschiedliche Definitionen und Interpretationen von Stabilität sowie verschiedener statistischer Verfahren zur Bestimmung zustande kommen. Weiterhin sollte bedacht werden, dass die Thrombozyten verschiedener Erkrankungsgruppen Unterschiede aufweisen könnten und sie deshalb auf die Lagerung möglicherweise nicht in gleichem Maße reagieren. So stellten z.B. Ruisi *et al.* fest, dass sich die Stabilität von IPF über

die Zeit bei Lagerung verschlechterte, wenn der Anfangswert für IPF% > 40% und für IPF# > 30/nl lag<sup>157</sup>.

Alle weiteren für diese Studie untersuchten Parameter zeigten bereits nach 2,5 sowie nach 48 h Lagerung bei Raumtemperatur in mehreren Proben einen signifikanten Anstieg. Auch Vogelaar *et al.* konnten einen Anstieg des MPV von Thrombozyten von Erwachsenen bei Lagerung über 48 h von 8,8 auf 10,3fl nachweisen<sup>138</sup>. Untersuchungen mit einer höheren Anzahl an Proben wären sinnvoll, um das Ergebnis dieser Pilotstudie zu bestätigen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der mit dem XE-2100 bestimmte IPF-Wert einen zuverlässigen Parameter darstellt und zur Evaluation der zugrunde liegenden Pathophysiologie in Patienten mit kongenitaler und erworbener Thrombozytopenie standardmäßig bestimmt werden sollte. Aufgrund konträrer Ergebnisse zur Stabilität bei Lagerung nach der Entnahme, scheint es wichtig, den Parameter möglichst zügig nach Abnahme zu bestimmen und länger gelagerte Proben kritisch zu bewerten.

## 4.2 Referenzwerte

Aus ethischen Gesichtspunkten ist es problematisch, Blutentnahmen von gesunden Kindern, zur Bestimmung von Referenzwerten, durchzuführen. Aus diesem Grund liegen bisher keine aussagekräftigen Studien zu Referenzwerten der Thrombozytenparameter einer ausreichend großen Gruppe (hämatologisch) gesunder Kindern vor.

Saigo *et al.* bestimmte die Referenzwerte für IPF% bei 30 kranken Kindern, bei denen das Knochenmark eine normale Funktion aufwies, sich die Thrombozyten und Leukozyten im Normalbereich befanden und kein G-CSF gegeben wurde. Der Mittelwert für IPF% lag bei 2,6% und PLT und IPF zeigten eine signifikante negative Korrelation<sup>84</sup>. Für die Studie von Rajantie *et al.* wurden die Werte für PLT, RP und MPV in gesunden Kindern bestimmt, jedoch wurden insgesamt nur sechs Kinder eingeschlossen. Der Median für RP lag bei 1,5% und für das MPV bei 9 fl<sup>85</sup>. In gesunden Kontrollen wurde keine Korrelation von RP% und IPF% gefunden<sup>158</sup>. Deshalb sollte der RP%-Wert dieser Studie nicht direkt mit den IPF%-Werten der anderen Studien verglichen werden. Für weitere Thrombozytenparameter gibt es bisher keine Studien zu Referenzwerten.

Für diese Studie wurden die Thrombozytenparameter PLT, IPF (% , #), MPV und PDW in 100 und P-LCR und P-MFV in 53 bzw. 52 hämatologisch gesunden Kindern bestimmt. Dabei wurde auf eine gleichmäßige Alters- sowie Geschlechterverteilung geachtet. Der mittlere IPF%-Wert

lag bei 2,7%. Es ist zu beachten, dass die Kinder aus sozialen, diätischen, neurologischen oder endokrinologischen Gründen an der Charité untersucht wurden. Daher sind Einflüsse der jeweiligen, individuellen, potentiell vorliegenden pathologischen Veränderungen (und der in diesem Zusammenhang eingenommenen Medikamente) auf einzelne Thrombozytenparameter nicht vollständig auszuschließen. Die im Vergleich zu Saigo *et al.* etwas höher liegenden IPF%-Werte dieser Studie könnten sich u.a. hierin begründen. Weiterhin könnten ethnische Variationen eine Rolle spielen. Auch bei gesunden Erwachsenen waren die IPF%-Werte in Studien von koreanischen Arbeitsgruppen niedriger als in jener japanischer oder britischer Arbeitsgruppen<sup>49,57,159</sup>. Höhere Mittelwerte könnten zudem durch den Einschluss von Ausreißern im oberen Messbereich zustande kommen.

U.a. durch den Einfluss von Hormonen in der Pubertät wären Unterschiede im IPF% sowie der anderen Thrombozytenparameter zwischen Mädchen und Jungen vorstellbar. In der vorliegenden Studie konnte kein statistisch signifikanter Unterschied der IPF%-Werte zwischen Mädchen und Jungen festgestellt werden. Alle anderen für diese Studie untersuchten Thrombozytenparameter zeigten ebenfalls keine geschlechtsspezifischen Unterschiede. Sieben hämatologisch gesunde Kinder unter vier Jahren wurden in die Kontrollkohorte eingeschlossen. Ihre IPF%-Werte lagen signifikant höher, als die der älteren Kinder. Dies könnte eine erhöhte megakaryopoetische Aktivität in diesen Kindern widerspiegeln. Auch in Neonaten wurden im Vergleich zu Erwachsenen sowie zu unserer Kontrollgruppe höhere IPF%-Werte sowie erhöhte TPO-Spiegel gefunden<sup>139,160</sup>. Ein kontinuierlicher Abfall der megakaryopoetischen Aktivität in den ersten Lebensjahren wäre demnach vorstellbar.

Das mittlere MPV der Kontrollkohorte lag bei 10,3 fl und damit leicht über dem von Rajantie *et al.* ermittelten Wert<sup>85</sup>. Die Referenzwerte von MPV sowie der restlichen Thrombozytenparameter waren mit denen gesunder Erwachsener vergleichbar<sup>138</sup>. Zusammengefasst ist dies die erste Studie, welche Referenzwerte der neuen Thrombozytenparameter in einer großen (n = 100) pädiatrischen Kontrollkohorte zur Verfügung stellt.

### **4.3 Pathophysiologie der akuten und chronischen ITP**

Verschiedene Pathomechanismen werden als Ursache für die Entstehung der ITP diskutiert. Zum einen wird ein immunologisch bedingter Abbau von mit Autoantikörpern beladenen Thrombozyten in der Milz und durch das retikuloendotheliale System als Ursache für die

Thrombozytopenie angesehen. Damit einhergehen eine verkürzte Thrombozytenlebenszeit und eine kompensatorisch gesteigerte Thrombozytenproduktion<sup>161,162</sup>. Es gibt jedoch auch Studien, welche darauf hinweisen, dass in einem Teil der ITP-Patienten die Produktion von Thrombozyten reduziert sein könnte<sup>163</sup>. Dies konnte mittels radioaktivmarkierter Thrombozyten nachgewiesen werden<sup>163,164</sup>. Die reduzierte Thrombozytenproduktionsrate könnte durch Thrombozytenantikörper bedingt sein, die an Megakaryozyten im Knochenmark binden<sup>95</sup>. In vitro Studien unterstützen das Konzept, dass die Formation megakaryozytärer Kolonien sowie der Proplättchenbildung im Knochenmark von ITP-Patienten inhibiert werden und dass die Expansion der megakaryozytären Vorläuferzellen, vor allem in der Anwesenheit von Thrombozytenantikörpern, reduziert ist<sup>165</sup>. Yang *et al.* kamen zu dem Ergebnis, dass es unter dem Einfluss von Plasma von ITP-Patienten zu einer Reduktion apoptotischer Megakaryozyten und im Zusammenhang damit zu einer Abnahme der Ploidie der Megakaryozyten sowie der Thrombozytenproduktion kam<sup>166</sup>.

Bei Kindern mit cITP wurde im Vergleich zu aITP-Patienten eine verminderte Prozentzahl apoptotischer Megakaryozyten festgestellt. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Reifung der Megakaryozyten in cITP-Patienten supprimiert wird, da die terminale Phase der megakaryozytären Überlebenszeit durch Aspekte der Apoptose gekennzeichnet ist. Allerdings zeigte die Anzahl an apoptotischen MK's keine Korrelation mit der PLT in den untersuchten Individuen und die Gesamtanzahl an Megakaryozyten der beiden Gruppen unterschied sich nicht<sup>167</sup>. Trotz dieser Ergebnisse findet sich in vielen ITP-Patienten eine normale oder leicht erhöhte Anzahl an Megakaryozyten. Das bedeutet, dass man nicht von einer direkten Korrelation der Aktivität der Thrombozytopoese und der Anzahl an Megakaryozyten ausgehen kann. So konnten Chen *et al.* in 64 ITP-Patienten nachweisen, dass die RP%-Werte bei Patienten mit normaler im Vergleich zu Patienten mit erhöhter Megakaryozytenzahl gleichermaßen erhöht waren (> 20%)<sup>168</sup>.

Weiterhin gibt es Hinweise, dass die Thrombozytopenie auch durch den direkten Abbau von Thrombozyten durch zytotoxische T-Zellen bedingt sein könnte<sup>90,95</sup>.

Durch die reduzierte Thrombozytenzahl in der Peripherie sinkt die Gesamtanzahl an c-Mpl-Rezeptoren. Konsekutiv kann weniger TPO an seinen Rezeptor binden und der TPO-Spiegel steigt zunächst an. Der erhöhte TPO-Spiegel sollte zu einer verstärkten Stimulation der Megakaryozytopoese führen, insoweit diese nicht durch Autoantikörper inhibiert wird. In der Folge erhöht sich die Produktion von jungen, großen Thrombozyten und IPF% steigt an. Bei Persistenz der Erkrankung überwiegt der Thrombozytenabbau und die Thrombozytopenie kann, trotz der gesteigerten Thrombozytenproduktion, nicht kompensiert werden. Deshalb bleiben die

PLT- und IPF#-Werte weiterhin niedrig. In ITP-Patienten mit megakaryozytärer Hyperplasie liegen normale oder im Vergleich mit gesunden Kontrollen nur leicht erhöhte TPO-Werte vor<sup>169,170,171</sup>. Durch die Hyperplasie steigt die Anzahl an c-Mpl-Rezeptoren in diesen Patienten kompensatorisch wieder an und der temporär erhöhte TPO-Spiegel fällt wieder auf ein normales Niveau. In ITP-Patienten ohne megakaryozytärer Hyperplasie wurden dementsprechend deutlich über dem Normbereich liegende TPO-Spiegel nachgewiesen<sup>168</sup>.

Die IPF%-Werte der ITP-Patienten dieser Studie waren im Vergleich mit den gesunden Kontrollen signifikant erhöht ( $p < 0,01$ ) und die IPF#-Werte signifikant erniedrigt ( $p < 0,01$ ). Die mittleren IPF%-Werte der beiden Gruppen (aITP und cITP) unterschieden sich hingegen nicht. Dies weist auf eine gesteigerte Thrombozytenproduktion durch MK in beiden Gruppen hin. Die Schwankungen der IPF%-Werte zwischen den einzelnen ITP-Patienten (Spannweite aITP: 7,4-35,3%; cITP: 7,4-64,7%) könnten sich in einer unterschiedlich starken Behinderung der Megakaryozytopoese und Proplättchenbildung durch Autoantikörper begründen. Hier könnte zukünftig eine Korrelation mit den Epitopen der Autoantikörper GPIIb/IIIa und GPIb/V/IX sowie die Human Platelet Antigen (HPA) bestimmt werden. Nachgewiesen werden konnte bereits, dass die Anzahl an Anti-GPIIb/IIIa-Antikörpern und ihre Bindungsrate in pädiatrischen Patienten mit cITP sehr viel höher ist als in aITP-Patienten<sup>106</sup>.

Die PLT-Werte der cITP-Patienten lagen mit  $35,5 \pm 30,8/\text{nl}$  im Vergleich zu denen der aITP-Patienten mit  $10,4 \pm 8/\text{nl}$  signifikant höher ( $p < 0,05$ ). Unterschiede in der Pathophysiologie beider Gruppen erscheinen daher möglich. Da die IPF%-Werte beider Gruppen sich nicht signifikant unterschieden, könnte ein verstärkter peripherer Abbau von Thrombozyten in der Peripherie die im Vergleich niedrigeren PLT-Werte der aITP-Patienten erklären. Es konnte gezeigt werden, dass in ITP-Patienten das Komplementsystem deutlich häufiger aktiviert ist, als in Patienten mit nicht immunvermittelter Thrombozytopenie. Die Aktivierung war mit niedrigeren PLT- und IPF#-Werten assoziiert, so dass eine erhöhte Clearance der Thrombozyten in der Peripherie angenommen werden kann. Zudem kann es durch das Komplementsystem zur direkten Schädigung von Thrombozyten und Megakaryozyten kommen<sup>172</sup>. Es wäre denkbar, dass sich die Aktivierung des Komplementsystems auch in aITP- und cITP-Patienten unterscheidet und zu den unterschiedlich stark verminderten PLT-Werten sowie zur Chronifizierung beiträgt.

Weiterhin könnte ein andauernder Verlust peripherer Selbsttoleranzmechanismen, eine Rolle für die Persistenz der Erkrankung spielen. Es konnte nachgewiesen werden, dass sogenannte CD4 CD25 T-Zellen, welche für die Erhaltung der peripheren Selbsttoleranz verantwortlich sind, in akuten sowie chronischen pädiatrischen ITP-Patienten vermindert sind und eine positive

Korrelation der Zellen mit der Thrombozytenzahl und somit mit der Aktivität der Erkrankung vorliegt. Die Zellen waren in aITP-Patienten stärker vermindert als in cITP-Patienten. Dies könnte die niedrigeren PLT-Werte der aITP-Patienten im Vergleich mit den cITP-Patienten erklären. In 7 Patienten, welche in Remission gingen, stieg die Anzahl der genannten Zellen wieder an<sup>173</sup>.

Eine weitere Studie gibt Hinweise darauf, dass der Q63R Polymorphismus des Cannabinoidrezeptors CNR2 eine Rolle für die Progression der Erkrankung spielt. Es ist bekannt, dass Cannabinoidrezeptoren die adaptive Immunantwort modulieren und Einfluss auf das Verhältnis von Th1 zu Th2-Zellen haben. Rossi *et al.* konnten zeigen, dass ITP-Patienten, welche homo- oder heterozygot für das R Allel von CNR2 waren, ein erhöhtes Risiko für einen chronischen Verlauf der Erkrankung zeigten<sup>174</sup>.

Da einige cITP-Patienten, im Vergleich zu den aITP-Patienten vor der Messung bereits eine Therapie erhalten hatten, ist weiterhin der Einfluss der Therapeutika, auch wenn sie einige Zeit vor der Messung administriert wurden, auf die Erkrankung und die PLT und IPF-Werte nicht vollständig auszuschließen. Weiterhin wurden sowohl Patienten in die Studie eingeschlossen, welche sich beim Auftreten von neuen Blutungszeichen in der Klinik vorstellten und andere, welche nur zur Routinekontrolle kamen ohne neue Blutungszeichen aufzuweisen. Dies könnte ebenfalls Einfluss auf die Ergebnisse genommen haben und zu individuellen Unterschieden der Thrombozytenparameter geführt haben.

Die Mittelwerte der IPF%-Werte bisher veröffentlichter Studien für erwachsene ITP-Patienten lagen bei 17,4% (Abe *et al.*), 12,1% (Cho *et al.*), Jung *et al.* 10,28% und 22,3% (Briggs *et al.*)<sup>49,159,175,57</sup>. Die mittleren IPF%-Werte der pädiatrischen ITP-Patienten dieser Studie lagen über diesen Werten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich die akute sowie die chronische Erkrankung im Kindesalter, von der im Erwachsenenalter unterscheidet.

Die MPV- und PDW-Werte der ITP-Patienten waren im Vergleich mit den gesunden Kontrollen erhöht.

#### **4.3.1 Verläufe**

Es sind bisher nur wenige Marker bekannt, welche helfen, den Verlauf von Patienten mit ITP vorherzusehen. Daher war es das Ziel dieser Studie, den prädiktiven Wert von PLT und IPF in Bezug auf die Progression der Erkrankung zu untersuchen. Dafür wurde in dieser Studie nur eine geringe Anzahl an Proben im Verlauf akquiriert werden konnte, kann diese Frage nicht abschließend

beantwortet werden. Trotz der geringen Fall- bzw. Probenanzahl waren Unterschiede zwischen den aITP- und cITP-Patienten zu erkennen.

Die Patienten mit akutem Verlauf zeigten im Vergleich zu den Patienten mit chronischem Verlauf einen raschen Anstieg der PLT-Werte, welche innerhalb von 30 Tagen nach Diagnosestellung wieder normale Werte erreichten. Die PLT-Werte der Patienten mit chronischem Verlauf hingegen stiegen während des gesamten Beobachtungszeitraumes nicht über 50/nl an. Parallel zu den PLT-Werten fielen die zu Beginn stark erhöhten IPF%-Werte der aITP-Patienten innerhalb der ersten 30 Tage nach Diagnosestellung wieder in den Normbereich ab, wohingegen die IPF%-Werte der cITP-Patienten passend zur anhaltenden Thrombozytopenie während des Beobachtungszeitraumes nicht unter 9% abfielen. Ein länger als 30 Tage nach Diagnosestellung anhaltend erhöhter IPF%-Wert könnte demnach ebenfalls ein Risikofaktor für eine Chronifizierung sein.

Leider liegen in dieser Studie zu wenig Daten vor, um sagen zu können, ob es Unterschiede zwischen dem initialen Anstieg von IPF% und den initialen PLT-Werten in aITP- und cITP-Patienten gibt. Del Vecchio fand keine Unterschiede von RP% sowie der Plasma-TPO-Konzentration zum Zeitpunkt der Diagnose zwischen aITP- und cITP-Patienten<sup>176</sup>. Bezüglich des PLT-Wertes konnten Kühne *et al.* nachweisen, dass Kinder mit cITP zu Anfang der Erkrankung einen höheren mittleren PLT-Wert aufweisen als Kinder mit aITP<sup>104</sup>.

#### **4.3.2 Blutungsneigung**

Für unsere Studie konnten die Thrombozytenparameter PLT, IPF% und IPF# in 16 aITP- und 7 cITP-Patienten mit der Blutungsneigung am Tag der Messung der Parameter korreliert werden. Für die Gruppe der aITP-Patienten zeigte sich eine positive Korrelation von Blutungsneigung und IPF-Werten und eine negative Korrelation von Blutungsneigung und PLT-Werten (Kapitel 3.3.2). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Studienergebnissen, die belegen konnten, dass der Blutungsgrad in ITP-Patienten mit dem Abfall der PLT-Werte deutlich zunimmt.

In der Gruppe der cITP-Patienten konnte keine Beziehung der Blutungsneigung, weder zu den PLT- noch zu den IPF%-Werten nachgewiesen werden (Kapitel 3.3.2). Dies weist daraufhin, dass Unterschiede im Blutungsverhalten von aITP- und cITP-Patienten bestehen und die Blutungsneigung durch zusätzliche Mechanismen moduliert werden könnte.

Normalerweise basieren Therapieentscheidungen bei ITP-Patienten neben den PLT-Werten auch auf der Blutungsneigung, obgleich die Beziehung der Thrombozytenzahlen und der

Blutungsneigung weiterhin Gegenstand kontroverser Diskussionen ist. Es gibt Hinweise darauf, dass in ITP-Patienten keine direkte Korrelation von PLT-Werten und Blutungsneigung vorliegt. Patienten mit PLT-Werten um die 5/nl, können im Vergleich mit Patienten, in denen PLT-Werte um die 20/nl gemessen werden, weniger Blutungen aufweisen. Dieses Phänomen wird u. a. auf den größeren Anteil an großen, unreifen Thrombozyten zurückgeführt, welche funktionsfähiger und metabolisch sowie enzymatisch aktiver sind als reife, ältere Thrombozyten. Die für unsere Patienten ermittelten IPF%-Werte von aITP- und cITP-Patienten unterschieden sich jedoch nicht signifikant, so dass nicht alleine der IPF%-Wert für die Blutungsneigung verantwortlich zu sein scheint.

In einem Mausmodell konnte demonstriert werden, dass die, durch verschieden hohe Dosen von Anti-Plättchen-IgG, induzierten Thrombozytopenie gleichermaßen stark ausgeprägt war. Jedoch zeigten sich nur in jener Gruppe, welche hohe Dosen an Anti-Plättchen-IgG erhalten hatten, auch externe Blutungen<sup>177</sup>. Dieser Befund legt nahe, dass neben dem PLT-Wert noch andere Mechanismen, wie die Anzahl an gegen Thrombozyten gerichteten Autoantikörper, Einfluss auf die Blutungsneigung haben könnten. Da es Hinweise darauf gibt, dass sich die Anzahl an Anti-GPIIb/IIIa-Antikörpern und ihre Bindungsratio in cITP und aITP unterscheiden, könnten diese Unterschiede das veränderte Blutungsverhalten der cITP-Patienten dieser Studie im Vergleich mit den aITP-Patienten erklären<sup>106</sup>.

Anti-Plättchen-IgG können auch an Endothelzellen binden, da Thrombozyten und Endothelzellen aufgrund ihrer gemeinsamen Herkunft aus einer Vorläuferstammzelle, ähnliche Membranproteine aufweisen (z.B.  $\beta$ -Integrin = CD61). Dieser Vorgang könnte ebenfalls mit dem hämostatischen Gleichgewicht in ITP-Patienten interferieren und die Blutungsneigung in unterschiedlichem Ausmaß beeinflussen.

Als weiterer wichtiger Aspekt ist zu beachten, dass der Blutungsscore auf der Grundlage der vom jeweiligen Arzt während der Untersuchung dokumentierten Blutungen festgelegt wurden und daher Fehler bei der Dokumentation den Blutungsscore verfälscht haben könnten.

#### **4.4 Akzelerierte Thrombozytopenie in ALL-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose?**

In Kindern mit ALL liegt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung meist eine Panzytopenie vor, welcher die Verdrängung der normalen Hämatopoese durch das Vorherrschen leukämischer Blasten im Knochenmark zugrunde liegt. Die Beeinflussung der einzelnen Zelllinien kann variieren, so dass durchaus einige Blutparameter im Normalbereich liegen können, was die

Diagnosestellung erschwert. Im Kontrast zu anderen Studien, welche sich meist auf Messungen unter Therapie beziehen, ist das besondere dieser Studie, dass sie sich auf Messungen zum Zeitpunkt der Diagnose ohne Therapie konzentriert. Bisher ist nur wenig über die Megakaryozytopoese in ALL-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose bekannt. Kalmanti *et al.* konnten nachweisen, dass die Anzahl an Megakaryozyten-Kolonien von Kindern mit ALL zum Zeitpunkt der Diagnose signifikant reduziert ist<sup>116</sup>. Die TPO-Werte waren zum Zeitpunkt der Diagnose leicht erhöht<sup>118,119</sup>.

Bei allen ALL-Patienten dieser Studie wurde die Diagnose durch eine Knochenmarkaspiration bestätigt. Die Patienten wiesen entweder keine oder eine stark verminderte Frequenz von Megakaryozyten im Knochenmark auf (Tabelle 9). Dies schließt jedoch eine extramedulläre Thrombozytopoese nicht aus (siehe unten). Da Patienten unter Chemotherapie, in welchen die Megakaryozytopoese supprimiert wird, niedrige IPF%-Werte nachgewiesen wurden<sup>57</sup>, erwarteten wir ähnliche Werte für die ALL-Patienten. Entgegen unseren Erwartungen waren die IPF%-Werte der Mehrheit der ALL-Patienten im Vergleich mit der Kontrollgruppe jedoch erhöht. In ALL-Patienten wurde zum Zeitpunkt der Diagnose eine inverse Beziehung von TPO und PLT demonstriert<sup>118,119</sup>. Dies lässt vermuten, dass die verbleibenden Megakaryozyten adäquat auf TPO reagieren können, ihre Proplättchenproduktion stimuliert wird und in der Folge die relativen IPF%-Werte ansteigen. Da die Masse an Megakaryozyten aber insgesamt reduziert ist, ist ein deutlicher Anstieg der PLT- und IPF#-Werte anscheinend nicht möglich. Durch die reduzierte Masse an Megakaryozyten im Knochenmark und Thrombozyten im peripheren Blut können auch die leicht erhöhten TPO-Werte erklärt werden, da die Gesamtanzahl an TPO-Rezeptoren in gleichem Maße abfällt.

Humane, reife Megakaryozyten, die erhöhten Scherkräften ausgesetzt wurden, zeigten einen Anstieg der Proplättchenbildung<sup>178</sup>. Es wäre denkbar, dass die Megakaryozyten der ALL-Patienten erhöhten Scherkräften im Zusammenhang mit der Blastenbildung im Knochenmark ausgesetzt sind und dies zu den erhöhten IPF%-Werten beiträgt. Weiterhin könnten im Rahmen der Erkrankung auftretende Veränderungen des Mikroenvironments und des Knochenmarkstromas die Thrombozytenbildung alterieren. Auch könnte die Reifung der Thrombozyten in ALL-Patienten, aus noch ungeklärten Gründen, verzögert stattfinden und sich so die Fraktion der unreifen Thrombozyten im Vergleich erhöhen. Cannavo *et. al* konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass die von ihnen in 17 von 22 ALL-Patienten gemessenen erhöhten IPF%-Werte (Median = 9,7%; Spannweite: 0,9-41,9%) auf die verzögerte Reifung der retikulierten Thrombozyten zurückzuführen waren. Unspezifische Färbungen als Ursache für den Anstieg der IPF%-Werte schloss die Arbeitsgruppe hingegen aus<sup>179</sup>.

Bei den meisten ALL-Patienten konnten gar keine Megakaryozyten im Knochenmark nachgewiesen werden (Tabelle 9). Daher stellt sich die Frage, wo die Megakaryozytopoese bei diesen Patienten stattfindet. Eine Möglichkeit wäre das Vorliegen von extramedullärer Hämatopoese in Leber oder Milz. Beide Organe waren jedoch nicht übermäßig vergrößert und es konnte keine Korrelation zwischen den IPF%-Werten und der Größe der Organe demonstriert werden. Es ist bekannt, dass in Organen des retikuloendothelialen Systems, wie z. B. Lunge oder Lymphknoten, extramedullärer Hämatopoese stattfinden könnte<sup>180,181</sup>. Das retikuloendotheliale System käme daher als Ort der Bildung von Thrombozyten in ALL-Patienten in Betracht.

Weiterhin muss ein systematischer Messfehler als Ursache für die erhöhten IPF%-Werte ausgeschlossen werden. Es wäre vorstellbar, dass andere Zellen als unreife Thrombozyten klassifiziert werden und eine unspezifische Färbung erfolgt. Um dies auszuschließen, wäre eine FACS-Analyse der Thrombozyten in ALL-Patienten sinnvoll, welche mittels eines Linien-spezifischen Markers nur die Thrombozyten nachweist.

Zusammenfassend stellt die Analyse der relativen und absoluten IPF-Werte eine wertvolle, einfache, nicht-invasive Methode dar, um den bisher nur zum Teil verstandenen Ablauf der Thrombozytopoese bei ALL-Patienten besser zu verstehen. Weiterführende vergleichende Studien mit pädiatrischen ALL-Patienten sowie pädiatrischen Patienten mit akuter Myeloischer Leukämie (AML) mit höheren Patientenzahlen sind geplant.

#### **4.5 Differenzierung von aITP- und ALL-Patienten**

Bei der Evaluation der Thrombozytenparameter im Vergleich von aITP- und ALL-Patienten lag der Fokus auf der Auswertung der IPF-Werte. Die erhöhten IPF%-Werte weisen auf eine Stimulation der Thrombozytopoese in beiden Gruppen hin. Jedoch waren die IPF%-Werte der ALL-Patienten weniger stark erhöht wie die der aITP-Patienten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Megakaryozytopoese der ITP-Patienten besser arbeitet, als die der ALL-Patienten. Die PLT-Werte der ALL-Patienten waren signifikant höher als die der aITP-Patienten. Dies könnte vermutlich darin begründet sein, dass es in den ALL-Patienten nicht zu einem vermehrten Abbau von Thrombozyten in der Peripherie kommt.

Entsprechend der höheren PLT-Werte der ALL-Patienten lagen auch die IPF#-Werte signifikant höher als die der aITP-Patienten. Keiner der aITP-Patienten wies einen IPF#-Wert von über 3,5/nl auf. Die Ergebnisse legen nahe, dass IPF# hilfreich in der Differenzierung dieser beiden Patientengruppen bei Diagnosestellung sein kann. Ein Cutoff-Wert von  $< 2.361$  für IPF# ergab

eine Sensitivität von 80% und eine Spezifität von 71,43% für die Differenzierung der beiden Erkrankungen. Während des Prozesses der Diagnosestellung sollten deshalb dem absoluten IPF-Wert besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden und bei einem erhöhten IPF#-Wert die Diagnose einer ITP in Frage gestellt werden. Beide IPF-Parameter (sowohl IPF% als auch IPF#) bergen großes Potential für die Diagnosefindung und Differenzierung von ALL- und aITP-Patienten bei Erstdiagnose. Durch die Verbesserung der Differenzierung der beiden Erkrankungen können zudem invasive (und belastende) Knochenmarkuntersuchungen in aITP-Patienten vermieden werden.

#### 4.6 Kongenitale Thrombozytopenien

Die Mehrheit der für diese Studie untersuchten FA-Patienten wiesen eine mittelgradige Thrombozytopenie auf ( $36,7 \pm 13,7/nl$ ). Parallel dazu waren die IPF#-Werte erniedrigt. Interessanterweise zeigten sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe etwas erhöhte IPF%-Werte ( $7,03 \pm 2,49 \%$ ), die auch eine Diskriminierung von WAS-Patienten erlauben (Abb. 25). Die IPF%-Werte waren jedoch nicht so stark erhöht wie die der ALL und aITP-Patienten (Abb. 23). Obwohl in FA-Patienten eine dysplastische Megakaryopoese und morphologische Veränderungen der Megakaryozyten nachgewiesen werden konnten, weist dieses Ergebnis auf eine zumindest quantitativ zum Teil erfolgreiche Stimulation von Megakaryo- und Thrombozytopoese hin. Die moderate Erhöhung von TPO im Serum könnte den Status der Knochenmarkhypoplasie widerspiegeln<sup>105</sup>.

Die hier untersuchten TAR-S-Patienten zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigte PLT und IPF#-Werte sowie ebenfalls erhöhte IPF%-Werte ( $5,5 \pm 3,6\%$ ). Wie bereits einleitend erwähnt, wurden in TAR-S-Patienten ebenfalls erhöhte TPO-Werte gemessen, welche einen Produktionsdefekt von TPO als Ursache der Thrombozytopenie ausschließen<sup>105</sup>.

Unsere Daten zu IPF weisen auf einen Defekt in der Megakaryozytopoese hin, dem eine Störung des Signaltransduktionsweges des TPO-Rezeptors c-Mpl in Megakaryozyten zugrunde liegt. Es konnten bisher keine Mutationen des cMpl-Rezeptors noch der Protein Tyrosin Kinase Jak2, welche für die TPO-induzierte megakaryozytäre Proliferation und Differenzierung benötigt wird, nachgewiesen werden. Die Fähigkeit des c-MPL-Rezeptors TPO zu binden, ist erhalten. Letestu *et al.* konnten eine frühe Blockade der megakaryozytären Differenzierung in TAR-S-Patienten sowie eine Verminderung der c-Mpl-mRNA Expression in TAR-S-Thrombozyten aufzeigen<sup>182</sup>. Albers *et al.* demonstrierten zudem erst kürzlich eindrücklich, dass dem TAR-Syndrom ein Defekt des *Exon-*

*Junction-Complex* (EJC) durch eine insuffiziente Funktion des Proteins Y14 zugrunde liegen könnte. Der genaue Pathomechanismus bleibt jedoch weiterhin unklar<sup>132</sup>.

Die in TAR-Patienten vorliegenden Störungen führen zu einer Abnahme der Megakaryozyten im Knochenmark, sowie dem vermehrten Vorliegen von unreifen Megakaryozyten. Es ist anzunehmen, dass hieraus primär eine Einschränkung der Proplättchenbildung resultiert, da es ansonsten nicht zu einer Thrombozytopenie kommen würde. Die reduzierte Zahl an Thrombozyten bzw. Megakaryozyten und die damit verbundene Reduktion an c-Mpl-Rezeptoren, zieht einen Anstieg des TPO-Spiegels im Plasma nach sich. Es kommt zu einer relativen Stimulation der Thrombozytopoese mit IPF%-Werten über dem Normbereich, die jedoch nicht ausreicht, um die Thrombozytopenie zu kompensieren. Unklar bleibt warum in 70% der Patienten die PLT nach 1-2 Jahren wieder ansteigt, ohne allerdings Normwerte zu erreichen<sup>183</sup>.

Interessanterweise lagen die IPF%-Werte von FA- und TAR-S-Patienten signifikant höher als die von AA- und MDS-Patienten (Abb. 23). Im Vergleich scheint in AA- und MDS-Patienten die Thrombozytopoese stärker gestört zu sein, was sich in den wesentlich niedrigeren IPF%-Werten widerspiegelt. In beiden Gruppen wurden stark erhöhte TPO-Konzentrationen im Serum gemessen<sup>105,184</sup>. Dies lässt auf eine erhebliche Reduktion der c-Mpl-Rezeptoren im Knochenmark schließen, wenn man davon ausgeht, dass die Gesamtheit der c-Mpl-Rezeptoren an der Clearance von TPO aus der Zirkulation beteiligt ist<sup>105</sup>.

Die IPF%-Werte der WAS-Patienten dieser Studie waren sehr niedrig und lagen im unteren Normbereich. Zudem wurden signifikant niedrigere IPF%-Werte im Vergleich mit den gesunden Kontrollen gemessen und es bestand eine Thrombozytopenie mit einer PLT von 50-100/nl. Cremer *et al.* wiesen bei WAS-Patienten TPO-Serumkonzentrationen im Normbereich nach<sup>106</sup>. Da sich die MPV und PLT-Werte von WAS-Patienten nach Durchführung einer Splenektomie nicht vollständig normalisieren, wurde bisher davon ausgegangen, dass ein vermehrter Abbau von Thrombozyten mit abnormaler Morphologie in der Milz die Ursache für die Thrombozytopenie in diesen Patienten ist<sup>185</sup>. Wäre der verstärkte Abbau von Thrombozyten der alleinige Auslöser der Thrombozytopenie wären die TPO-Spiegel im Normbereich hiermit vereinbar.

Die in dieser Studie niedrigen IPF%-Werte deuten jedoch auf eine parallel vorliegende Thrombozytenproduktionsstörung hin und stehen im Einklang mit Befunden, die zeigen konnten, dass die Bildung von megakaryozytären Kolonien und die Proplättchenbildung von WAS-Patienten *in vitro* verringert sind<sup>186</sup>. Zudem liegt in WAS-Patienten ein Mangel an thrombozytären alpha-Granula vor, welche Proteine enthalten (*platelet-derived growth factor* und *fibroblast growth factor*), die nach Sekretion die TPO-Expression in Knochenmarkstromazellen verstärken<sup>187,188</sup>. Diese fehlende Verstärkung könnte unter anderem die im Vergleich zur vorliegenden Thrombozytopenie inadäquate Stimulation der Thrombozytopoese erklären.

## 4.7 Reaktive Thrombozytose

In Patienten mit RT aufgrund eines entzündlichen Prozesses scheint eine veränderte Produktion von TPO verantwortlich für den Thrombozytenanstieg zu sein. Da die TPO-Expression in der Leber durch eine veränderte Thrombozytenzahl nicht alteriert, könnten hier andere Faktoren Einfluss auf die TPO-Produktion zu nehmen. Studien zeigen, dass die TPO-Produktion auch auf transkriptioneller Ebene reguliert werden kann. So führte die Gabe von IL-6 im Menschen zu einem Anstieg der TPO-Konzentration im Plasma und verstärkte in Mäusen die hepatische mRNA Expression sowie die Proteinsynthese von TPO<sup>189</sup>. Die IL-6- Spiegel in Patienten mit RT sind im Vergleich zu gesunden Kontrollen deutlich erhöht. Das Zytokin ist einer der Hauptmediatoren der Akute-Phase-Reaktion. Zudem ist es in der Lage, die Proliferation von CD34<sup>+</sup> Zellen und Megakaryozyten zu fördern<sup>190,191</sup>.

In Abgrenzung zur RT geht die essentielle Thrombozytämie (ET) einher mit einer monoklonalen autonomen Proliferation der Thrombozytopoese und gehört zur Gruppe der myeloproliferativen Erkrankungen mit Mutationen in MPL, JAK2 oder TET2<sup>191</sup>. Das Knochenmark zeigt eine starke Zunahme an Megakaryozyten, welche sehr groß sind. Hierzu passend wurden erhöhte Werte für IPF% und IPF# in erwachsenen ET-Patienten beschrieben<sup>141,64</sup>.

Die für diese Studie untersuchten pädiatrischen RT-Patienten wiesen sehr niedrige IPF%-Werte im unteren Normbereich auf. Dies suggeriert, dass die Thrombozytenproduktion der RT-Patienten zum Zeitpunkt der Messung nicht gesteigert, sondern, da die Werte im unteren Normbereich lagen, vielleicht sogar geringgradig supprimiert war. Da die RT, im Vergleich zur chronisch verlaufenden ET, einen transitorischen Verlauf zeigt, ist anzunehmen, dass die niedrigen IPF%-Werte bestimmt wurden, nachdem die im Rahmen der Entzündungsreaktion gesteigerte Thrombozytopoese, bereits wieder normalisiert, die Thrombozytenwerte jedoch noch erhöht waren. Untersuchungen aus anderen Studien ergaben eine signifikante Korrelation von der TPO-Konzentration im Serum mit verschiedenen Akute-Phase-Proteinen wie Fibrinogen, CRP und Il-6 in Patienten mit RT<sup>193</sup>. So kann angenommen werden, dass TPO zum Zeitpunkt unserer Messung ebenfalls wieder abgefallen war und zu einer Normalisierung der IPF%-Werte geführt hatte.

Die IPF#-Werte der RT-Patienten dieser Studie waren im Vergleich zu den gesunden Kontrollen signifikant erhöht. Da für PLT und IPF# eine positive Korrelation demonstriert werden konnte, reflektieren diese Werte die lineare Beziehung der beiden Parameter.

Unter der Annahme, dass die IPF%-Werte in pädiatrischen ET-Patienten ebenfalls erhöht sind, kann der Parameter in der Differenzierung von pädiatrischen ET- und RT-Patienten hilfreich

sein. Liegen niedrige bis sehr niedrige IPF%-Werte verbunden mit einer moderaten Thrombozytose sowie erniedrigten MPV und PDW-Werte vor, ist eine ET sehr unwahrscheinlich. Da in der Akutphase der RT jedoch auch erhöhte IPF%-Werte vorstellbar sind, sollte der Zeitpunkt der Messung sorgfältig evaluiert werden.

Die MPV- und PDW-Werte der für diese Studie untersuchten Patienten waren im Vergleich zu den gesunden Kontrollen erniedrigt. Dies steht im Einklang mit den niedrigen IPF%-Werten und der im Vergleich nur geringgradigen Stimulation der Thrombozytopoese. Untersuchungen von Cerutti *et al.* ergaben erhöhte TPO-Serum Konzentrationen in ET- sowie RT-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen, welche eine Differenzierung mittels TPO-Bestimmung ausschließen<sup>194</sup>.

## 5 Zusammenfassung

Thrombozyten gehören zu den korpuskulären Bestandteilen des Blutes und sind essentiell für die Blutstillung (primäre Hämostase). Die molekular- und zellbiologischen Mechanismen, die ihrer Bildung aus zytoplasmatischen Abschnürungen von Megakaryozyten im Knochenmark zu Grunde liegen, sind weitgehend unbekannt. Thrombozytopenien, bei denen die Thrombozytenzahl definitionsgemäß unter den physiologischen Normwert abfällt, sind mit einem erhöhten Blutungsrisiko verbunden und können angeboren oder erworben sein. Bei der Immuntrombozytopenie (ITP) werden aufgrund von erworbenen Autoantikörpern Thrombozyten über das retikuloendotheliale System abgebaut. Bei der akuten Leukämie (ALL) im Kindesalter werden die Megakaryozyten, welche die Thrombozyten bilden, durch Blasten im Knochenmark verdrängt. Im Gegensatz dazu kann die Thrombozytopenie angeboren sein. Dies ist z.B. der Fall bei seltenen Syndromen wie der Fanconi-Anämie oder dem Thrombozytopenie-Absent-Radius-Syndrom. In beiden Fällen liegt der Thrombozytopenie ein Defekt der Thrombozytenproduktion zu Grunde. Die Bestimmung der Thrombozytenkonzentration im Blut ist bisher der wichtigste Parameter in der Diagnose von Thrombozytopenien, jedoch gibt die Zahl allein keinen Hinweis auf den zu Grunde liegenden Pathomechanismus und die damit assoziierte Blutungsneigung. In den letzten Jahren wurden verschiedene zusätzliche Thrombozytenparameter entwickelt, die mittels automatisierter Blutzählgeräte bestimmt werden können und Auskunft über die Größe, Granularität und Reife der Thrombozytenpopulation liefern. Zu diesen Parametern gehört auch die "Immature Platelet Fraction" (IPF), die die Fraktion der jungen, neu synthetisierten Thrombozyten an der Gesamtpopulation beschreibt. Aufgrund ihrer erhöhten Größe und der Expression residueller RNA können sie von den reifen Thrombozyten maschinell differenziert werden. Die IPF wird als Surrogatmarker für die Thrombozytopoese verstanden und könnte neben der Bestimmung des *Mean Platelet Volume* (MPV), der *Platelet Deviation Width* (PDW) und der *Platelet-Large Cell Ratio* (P-LCR) wichtig für die Erkennung der Differentialdiagnose von Thrombozytopenien sein. In dieser Arbeit wurden zunächst Referenzwerte dieser zusätzlichen Thrombozytenparameter in 100 hämatologisch gesunden Kindern etabliert und deren Abhängigkeit von Geschlecht und Alter untersucht. Darauf basierend wurde analysiert, inwieweit diese Parameter für die Differenzierung von 87 Kindern mit Thrombozytopenien unterschiedlicher Genese geeignet sind. Dazu wurden IPF, MPV, PDW, P-LCR sowie der *Plateletcrit* (PCT) und das *Platelet-Mean Frequent Volume* (P-MFV) bestimmt. Grundsätzlich waren die etablierten Referenzwerte mit denen aus Studien mit Erwachsenen vergleichbar. Der mediane IPF%-Werte der Kontrollkohorte

lag bei 2,3%. Im Gegensatz zu vorherigen Studien konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede festgestellt werden. Die IPF%-Werte der ITP-Patienten waren als Zeichen eines erhöhten Thrombozytenumsatzes signifikant erhöht (Median 25,2%). Interessanterweise waren auch die IPF%-Werte von ALL-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose erhöht (Median 10%). Dies legt eine Stimulation der Thrombozytopoese, trotz stark verminderter Anzahl an Megakaryozyten im Knochenmark, nahe. Die absolute Zahl unreifer Thrombozyten (IPF#) zeigte sich hingegen hilfreich in der Differenzierung von akuten ITP-Patienten und ALL-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose ( $p < 0,01$ ). In Kindern mit Thrombozytenproduktionsdefekten war hingegen der IPF% niedrig. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der relative IPF-Wert ein Marker für Thrombozytopenien ist, die auf einer defekten Thrombozytenproduktion beruhen. Hingegen ist IPF# hilfreich bei der Differentialdiagnose von akuten ITP-Patienten und ALL-Patienten. Die hier evaluierten Thrombozytenparameter, insbesondere die IPF, können in Zukunft bei der Differenzialdiagnose von Thrombozytopenien helfen, auch nicht-invasiv unter Vermeidung von Knochenmarkbiopsien. Die Herausforderung der kommenden Jahre liegt darin, die Parameter für den klinischen Gebrauch weiter zu validieren und insbesondere in prospektiven Studien mit den klinischen Parametern wie dem Blutungsrisiko zu korrelieren, um ihr Potential optimal zu nutzen.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1) Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., et al. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* (2000);404:193-7.
- 2) Bryder, D., Rossi, D.J. & Weissman, I.L. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol* (2006);169:338-46.
- 3) Gainsford, T., Nandurkar, H., Metcalf, D., et al. The residual megakaryocyte and platelet production in c-mpl-deficient mice is not dependent on the actions of interleukin-6, interleukin-11, or leukemia inhibitory factor. *Blood* 95 (2000);(2) 528-34.
- 4) Robin, C. Note sur anatomiques apples myeloplaxes. *J Anat Physiol* (1864);1:88
- 5) Tavassoli, M. Megakaryocyte--platelet axis and the process of platelet formation and release. *Blood* (1980); 55:537-45.
- 6) Howell, W.W. Observations upon the occurrence, structure and function of the giant cells of the marrow. (1890).
- 7) Schulze, H. Neue Erkenntnisse zur Zellbiologie der Thrombozytose und Pathophysiologie kongenitaler Thrombozytopenien. Habilitationsschrift; Charité-Universitätsmedizin Berlin (2008).
- 8) Meyer, Imke. Untersuchungen zur Funktion von RanBP10 in der Thrombopoese: Charakterisierung der Bindungseigenschaften und enzymatischen Aktivität. Diplomarbeit; Universität Potsdam (2008).
- 9) Lüllmann-Rauch, R. Histologie. *Georg Thieme Verlag*; Stuttgart (2003).
- 10) Long, M.W., Williams, N. & Ebbe, S. Immature megakaryocytes in the mouse: physical characteristics, cell cycle status, and in vitro responsiveness to thrombopoietic stimulatory factor. *Blood* (1982); 59:569-75.
- 11) Nagata, Y., Muro, Y., Todokoro, K. Thrombopoietin-induced polyploidization of bone marrow megakaryocytes is due to a unique regulatory mechanism in late mitosis. *J Cell Biol* (1997);139(2):449-457.
- 12) Vitrat, N., Cohen-Solal, K., Pique, C., et al. Endomitosis of human megakaryocytes are due to abortive mitosis. *Blood* (1998);91(10):3711-23
- 13) Jones, O.P. Origin of megakaryocyte granules from Golgi vesicles. *Anat Rec* (1960);138:105-13
- 14) JH, W. The origin and nature of blood platelets. *Boston Med Surg J* (1906).
- 15) Radley, J.M. & Haller, C.J. The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood* (1982);60:213-9.
- 16) Handagama, P.J., Feldman, B.F., Jain, N.C., et al. In vitro platelet release by rat megakaryocytes: effect of metabolic inhibitors and cytoskeletal disrupting agents. *Am J Vet Res* (1987);48:1142-6.
- 17) Italiano, J.E., Jr., Lecine, P., Shivdasani, R.A., et al. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol* (1999);147:1299-312.
- 18) Bizzozero. Ueber neuen Bestandteil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und Blutgerinnung. *Virchow Path Arch Anat Physiol* (1882); 90:267.
- 19) Tavassoli, M. Megakaryocyte--platelet axis and the process of platelet formation and release. *Blood* (1980);55:537-45.
- 20) Roberts I.A., Murray, N.A. Management of thrombocytopenia in neonates. *British journal of haematology* (1999);105(4):864-70.
- 21) Kaushansky, K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest* (2005);115:3339-47.

- 22) Hartwig, J.H., Barkalow, K., Azim, A. et al. The elegant platelet: signals controlling actin assembly. *Thromb Haemost* (1999);82:392-8.
- 23) Fox, J.E. The platelet cytoskeleton. *Thromb Haemost* (1993);70:884-93.
- 24) Fox, J.E. Linkage of a membrane skeleton to integral membrane glycoproteins in human platelets. Identification of one of the glycoproteins as glycoprotein Ib. *J Clin Invest* (1985);76:1673-83.
- 25) Ts'ao, C.H. Rough endoplasmic reticulum and ribosomes in blood platelets. *Scand J Haematol* (1971);8:134-40.
- 26) Booyse, F.M., Hoveke, T.P. & Rafelson, M.E., Jr. Studies on human platelets. II. Protein synthetic activity of various platelet populations. *Biochim Biophys Acta* (1968);157:660-3.
- 27) Debili, N., Wendling, F., Cosman, D. et al. The Mpl receptor is expressed in the megakaryocytic lineage from late progenitors to platelets. *Blood* (1995);85:391-401.
- 28) Kelemen, E., Cserhati, I. & Tanos, B. Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythaemic sera. *Acta Haematol* (1958);20:350-5.
- 29) Groopman, J.E. Thrombopoiesis. Capturing the unicorn. *Curr Biol*. 4(11) (1994);1016-8.
- 30) Ogden, J.E. Thrombopoietin –the erythropoietin of platelets?. *Trends Biotechnol.* (1994);12(10):389-90.
- 31) Nomura, S., Ogami, K., Kawamura, K. et al. Cellular localization of thrombopoietin mRNA in the liver by in situ hybridization. *Exp Hematol.* (1997);25:565-572.
- 32) Stoffel, R., Wiestner, A., Skoda, R.C. Thrombopoietin in thrombocytopenic mice: evidence against regulation at the mRNA level and for a direct regulatory role of platelets. *Blood* (1996);87:567-573.
- 33) Tahara, T., Usuki, K., Sato, H. et al. A sensitive sandwich ELISA for measuring thrombopoietin in human serum: serum thrombopoietin levels in healthy volunteers and in patients with haemopoietic disorders. *Br J Haematol.* (1996);93:783-788.
- 34) Sungaran, R., Markovic, B., Chong, BH. Localization and regulation of thrombopoietin mRNA expression in human kidney, liver, bone marrow, and spleen using in situ hybridization. *Blood* (1997);89:101.
- 35) Nagahisa, H. et al. Bone marrow stromal cells produce thrombopoietin and stimulate megakaryocyte growth and maturation but suppress proplatelet formation. *Blood* (1996);87:1309-16.
- 36) Kuter, D.J. & Rosenberg, R.D. The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit. *Blood* (1995);85:2720-30.
- 37) Heins, M. Influence of storage time and temperature on haematological measurements using a Sysmex NE 8000 analyzer. *J Lab Med* (2000);24:236-42.
- 38) Costongs, G.M. et al. Short-term and long-term intra-individual variations and critical differences of haematological laboratory parameters. *J Clin Chem Clin Biochem* (1985);23:69-76.
- 39) Kemon, H., Prokopowicz, J. & Wotosowicz, N. The count of blood platelets and sex in humans. *Experientia* (1978);34:257.
- 40) Butkiewicz, A. Does menopause affect thrombocytopoiesis and platelet activation? *Przegl Lek* (2006);63(12):1291-3.
- 41) Taylor, M.R. et al. Haematological reference ranges for schoolchildren. *Clin Lab Haematol* (1997);19:1-15.
- 42) Becerra-Flores, M.C., Farfan-Canto, J.M., Nieva-Garcia, B. et al. Platelet reference values in healthy children living in Mexico City. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* (2006);44:121-30.
- 43) Giles, C. The platelet count and mean platelet volume. *Br J Haematol* 48, 31-7 (1981).

- 44) Bessman, J.D., Gilmer, P.R. & Gardner, F.H. Use of mean platelet volume improves detection of platelet disorders. *Blood Cells* (1985);11:127-35.
- 45) Trowbridge, E.A., Reardon, D.M., Hutchinson, D., et al. The routine measurement of platelet volume: a comparison of light-scattering and aperture-impedance technologies. *Clin Phys Physiol Meas* (1985);6:221-38.
- 46) Bain, B.J. Platelet count and platelet size in males and females. *Scand J Haematol* (1985), 35:77-9.
- 47). Bessman, J.D., Williams, L.J. & Gilmer, P.R., Jr. Mean platelet volume. The inverse relation of platelet size and count in normal subjects, and an artifact of other particles. *Am J Clin Pathol* (1981);76:289-93.
- 48) Buckley, M.F. et al. A novel approach to the assessment of variations in the human platelet count. *Thromb Haemost* (2000);83:480-4.
- 49) Abe, Y. et al. A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF). *Thromb Res* (2006);118:463-9.
- 50) Ntaios, G. et al. Increased values of mean platelet volume and platelet size deviation width may provide a safe positive diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Acta Haematol* (2008);119:173-7.
- 51) Najean, Y. & Lecompte, T. Hereditary thrombocytopenias in childhood. *Semin Thromb Hemost* (1995);21:294-304.
- 52) Osselaer, J.C., Jamart, J. & Scheiff, J.M. Platelet distribution width for differential diagnosis of thrombocytosis. *Clin Chem* (1997);43:1072-6.
- 53) Kaito, K. et al. Platelet size deviation width, platelet large cell ratio, and mean platelet volume have sufficient sensitivity and specificity in the diagnosis of immune thrombocytopenia. *Br J Haematol* (2005);128:698-702.
- 54) Alswedan, S.A., Al-Shurman, A. & Mahmoud, A.S. Diagnostic value of platelet indices in children with leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* (2008);30:953-5.
- 55) Babu, E. & Basu, D. Platelet large cell ratio in the differential diagnosis of abnormal platelet counts. *Indian J Pathol Microbiol* (2004);47:202-5.
- 56) Ingram, M. & Coopersmith, A. Reticulated platelets following acute blood loss. *British Journal of Haematology*(1969);17:225–229.
- 57) Briggs, C., Kunka, S., Hart, D., et al. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol* (2004);126:93-9.
- 58) Kienast, J. & Schmitz, G. Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood* (1990);75:116-21.
- 59) Dale, G.L., Friese, P., Hynes, L.A., et al. Demonstration that thiazole-orange-positive platelets in the dog are less than 24 hours old. *Blood* (1995);85:1822-5.
- 60) Thompson, C.B., Love, D.G., Quinn, P.G., et al. Platelet size does not correlate with platelet age. *Blood* (1983);62:487-94.
- 61) Ault, K.A. et al. The significance of platelets with increased RNA content (reticulated platelets). A measure of the rate of thrombopoiesis. *Am J Clin Pathol* (1992);98:637-46.
- 62) Richards, E.M. & Baglin, T.P. Quantitation of reticulated platelets: methodology and clinical application. *Br J Haematol* (1995);91:445-51.
- 63) O'Malley, C.J. et al. Administration of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor to humans stimulates the production of functional platelets that show no evidence of in vivo activation. *Blood* (1996);88:3288-98.
- 64). Rinder, H.M. et al. Correlation of thrombosis with increased platelet turnover in thrombocytosis. *Blood* (1998);91:1288-94.
- 65) Ault, K.A. & Knowles, C. In vivo biotinylation demonstrates that reticulated platelets are the youngest platelets in circulation. *Exp Hematol* (1995);23:996-1001.

- 66) Takami, A. et al. Immature platelet fraction for prediction of platelet engraftment after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* (2007);39(8):501-7.
- 67) Moneagudo, M. et al. Reticulated platelets as a screening test to identify thrombocytopenia aetiology. *QJM* (2008); 101(7):549-55.
- 68) Kickler, T.S., Oguni, S. & Borowitz, M.J. A clinical evaluation of high fluorescent platelet fraction percentage in thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol* (2006);125:282-7.
- 69) Thomas-Kaskel, A.K., Mattern, D., Kohler, G. et al. Reticulated platelet counts correlate with treatment response in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura and help identify the complex causes of thrombocytopenia in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cytometry B Clin Cytom* (2007);72:241-8.
- 70) Salvagno, G.L. et al. Evaluation of platelet turnover by flow cytometry. *Platelets* (2006);17(3):170-7.
- 71) Butkiewicz, A.M. et al. Platelet count, mean platelet volume and thrombocytopenic indices in healthy women and men. *Thromb Res* (2006);118:199-204.
- 72) Saxonhouse, M.A. et al. Reticulated platelet percentages in term and preterm neonates. *J Pediatr Hematol Oncol* (2004);26(12):797-802.
- 73) Macchi, I. et al. Comparison of reticulated platelet count and mean platelet volume determination in the evaluation of bone marrow recovery after aplastic chemotherapy. *Eur J Haematol.* (2002); 69(3):152-7.
- 74) Robinson et al. Two colour analysis of reticulated platelets. *Clin Lab Haematol.* (2000);22(4):211-3.
- 75) Saxon et al. Reticulated platelet counts in the diagnosis of acute immune thrombocytopenic purpura. *J Pediatr Hematol Oncol.* (1998);20(1):44.8.
- 76) Koike et al. Evaluation of thrombopoiesis in thrombopenic disorders by simultaneous measurement of reticulated platelets of whole blood and serum thrombopoietin concentrations. *Thromb Haemost* (1998);79(6):1106-10.
- 77) Ogata, H. Measurement of reticulated platelets in thrombocytopenia—methodology and clinical utility. *Kurume Med J.* (1998);45(2):165-70.
- 78) Harrison, P., Robinson, M.S., Mackie, I.J. et al. Reticulated platelets. *Platelets* 1997;8(6):379-83.
- 79) Rinder, H.M., Munz, U.J., Ault, K.A. et al. Reticulated Platelets in the Evaluation of Thrombopoietic Disorders. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* (1993a); 117:606–610.
- 80) Ault et al. Flow cytometric measurement of platelet function and reticulated platelets. *ANN N Y Acad Sci* Mar 1993;20:677:293-308.
- 81) Abe, Y. et al. Usefulness of fully automated measurement of reticulated platelets using whole blood. *Clin Appl Thromb Hemost* (2005);11:263-70.
- 82) Bonan, J.L., Rinder, H.M., Smith, B.R. Determination of the percentage of thiazole orange (TO)-positive, "reticulated" platelets using autologous erythrocyte TO fluorescence as an internal standard. *Cytometry* (1993);14(6):690-4.
- 83) Wasiluk A. Thrombocytopenia in healthy term newborns. *Journal of perinatal medicine* (2005);33(3):252-4.
- 84) Saigo, K., Sakota, Y., Masuda, Y. et al. Automatic detection of immature platelets for decision making regarding platelet transfusion indications for pediatric patients. *Transfusion and Apheresis Science* (2008);38:127–132.
- 85) Rajantie, J., Javela, K., Joutsu-Korhonen, L. et al. Chronic thrombocytopenia of childhood: use of non-invasive methods in clinical evaluation. *Eur J Haematol* (2004);72:268-72.
- 86) Aster, R.H. Pooling of platelets in the spleen: role in the pathogenesis of "hypersplenic" thrombocytopenia. *J Clin Invest* (1966);45:645-57.

- 87) Bizzaro, N. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: a clinical and epidemiological study of 112 cases, with 10-year follow-up. *Am J Hematol* (1995);50:103-9.
- 88) Lilleyman, J.S. Management of childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* (1999);105:871-5.
- 89) Nugent, D., McMillan, R., Nichol, J. Pathogenesis of chronic immune thrombocytopenia: increased destruction and/or decreased platelet production. *British Journal of Haematology* (2009);146:585-596.
- 90) Zhou, B., Zhao, H., Yang, R.C. et al. Multi-dysfunctional pathophysiology in ITP. *Crit Rev Oncol Hematol* 54, 107-16 (2005).
- 91) Cremer, M., Schulze, H., Linthorst, G. et al. Serum levels of thrombopoietin, IL-11, and IL-6 in pediatric thrombocytopenias. *Ann Hematol.* (1999);78(9):401-7.
- 92) Blanchette, V. & Bolton-Maggs, P. Childhood immune thrombocytopenic purpura: diagnosis and management. *Pediatr Clin North Am* (2008);55:393-420.
- 93) Harrington, W.J., Minnich, V., Hollingsworth, J.W. et al. Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. 1951. *J Lab Clin Med* (1990);115:636-45.
- 94) Shulman, N.R., Marder, V.J. & Weinrach, R.S. Similarities between known antiplatelet antibodies and the factor responsible for thrombocytopenia in idiopathic purpura. Physiologic, serologic and isotopic studies. *Ann NY Acad Sci* (1965);124: 499-542.
- 95) McMillan, R., Wang, L., Tomer, A., et al. Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. *Blood* (2004);103:1364-9.
- 96) Takahashi, R., Sekine, N. & Nakatake, T. Influence of monoclonal antiplatelet glycoprotein antibodies on in vitro human megakaryocyte colony formation and proplatelet formation. *Blood* (1999);93(6):1951-8.
- 97) Tonnes, H. et al. Clonal chromosomal aberrations in bone marrow cells of Fanconi anemia patients: gains of the chromosomal segment 3q26q29 as an adverse risk factor. *Blood* (2003);101:3872-4.
- 98) George, J.N. et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood* (1996);88:3-40.
- 99) Del Vecchio, G.C. et al. Management of acute childhood idiopathic thrombocytopenic purpura according to AIEOP consensus guidelines: assessment of Italian experience. *Acta Haematol* (2008);119, 1-7.
- 100) Eden, O.B. & Lilleyman, J.S. Guidelines for management of idiopathic thrombocytopenic purpura. The British Paediatric Haematology Group. *Arch Dis Child* (1992);67:1056-8.
- 101). Buchanan, G.R. & Adix, L. Current challenges in the management of children with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Pediatr Blood Cancer* (2006);47:681-4.
- 102). Imbach, P. et al. Childhood ITP: 12 months follow-up data from the prospective registry I of the Intercontinental Childhood ITP Study Group (ICIS). *Pediatr Blood Cancer* (2006);46:351-6.
- 103) Rodeghiero, F., Stasi, R., Gernsheimer, T. et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood.* (2009);113(11):2386-93.
- 104) Kuhne, T. et al. Newly diagnosed idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood: an observational study. *Lancet* (2001);358:2122-5.
- 105) Cremer, Malte. Serumkonzentrationen von Thrombopoetin, Interleukin-6 und Interleukin-11 bei pädiatrischen und fetalen Thrombozytopenien. Dissertation; Med. Hochschule Hannover (2003)

- 106) Berchtold, P., McMillan, R., Tani, P. et al. Autoantibodies against platelet membraneglycoproteins in children with acute and chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* (1989);74(5):1600-2.
- 107) Semple, JW. Differences in serum cytokine levels in acute and chronic autoimmune thrombocytopenic purpura: relationship to platelet phenotype and antiplatelet T-cell reactivity. *Blood* (1996);87:4245-4254.
- 108) Ogawara, H., Handa, H., Morita, K. et al. High Th1/Th2 ratio in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol.* (2003);71(4):283-8.
- 109) Kurata, Y. et al. Diagnostic value of tests for reticulated platelets, plasma glycofibrin, and thrombopoietin levels for discriminating between hyperdestructive and hypoplastic thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol* 82001);115:656-64.
- 110) Dickerhoff, R., von Ruecker A. The clinical course of immune thrombocytopenic purpura in children who did not receive intravenous immunoglobulins or sustained prednisone treatment. *J Pediatr* (2000);137:629-32.
- 111) Blanchette, V., Carcao, M. Approach to the investigation and management of immune thrombocytopenic purpura in children. *Semin Hematol* (2000);37:299-314.
- 112) Buchanan, G.R. et al. Grading of hemorrhage in children with idiopathic thrombocytopenic purpura. *The Journal Of Pediatrics* (2002);141(5):683-8.
- 113) Pui, C.H., Campana, D. & Evans, W.E. Childhood acute lymphoblastic leukaemia--current status and future perspectives. *Lancet Oncol* (2001);2:597-607.
- 114) Pui, C.H. & Evans, W.E. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* (1998);339: 605-15.
- 115) Jonsson, O.G., Sartain, P., Ducore, J.M. et al. Bone pain as an initial symptom of childhood acute lymphoblastic leukemia: association with nearly normal hematologic indexes. *J Pediatr* (1990);117:233-7.
- 116) Kalmanti, M. et al. Assessment of megakaryopoiesis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Acta Haematol* (2005);114:91-4.
- 117) Hirt, A., Schmid, A.M., Luethy, A.R. et al. Recovery of megakaryocytopoiesis in vitro in children with acute lymphoblastic leukemia during induction of remission. *Exp Hematol* (1990);18:37-40.
- 118) Cernelc, P. et al. Serum thrombopoietin levels in acute myeloid leukaemia. *Pflugers Arch* (2001);442:200-1.
- 119) Hsu, H.C. et al. Circulating levels of thrombopoietic and inflammatory cytokines in patients with acute myeloblastic leukemia and myelodysplastic syndrome. *Oncology* (2002);63:64-9.
- 120) Holzhauser S. et al. Decreased platelet reactivity identified by whole blood flow cytometry in Fanconi anaemia patients. *Thromb Haemost* (2007);98:1291-7.
- 121) Joenje, H. & Patel, K.J. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nat Rev Genet* (2001);2:446-57.
- 122) Kennedy, R.D. & D'Andrea, A.D. The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. *Genes Dev* (2005);19:2925-40.
- 123) Berger, R., Le Coniat, M. & Schaison, G. Chromosome abnormalities in bone marrow of Fanconi anemia patients. *Cancer Genet Cytogenet* (1993);65:47-50.
- 124) Tamary, H. & Alter, B.P. Current diagnosis of inherited bone marrow failure syndromes. *Pediatr Hematol Oncol* (2007);24:87-99.
- 125) Klopocki, E. et al. Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia-absent radius syndrome. *Am J Hum Genet* (2007);80:232-40.
- 126) Alter, B.P. Diagnosis, genetics, and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* (2007);29-39.

- 127) Whitfield, M.F. & Barr, D.G. Cows' milk allergy in the syndrome of thrombocytopenia with absent radius. *Arch Dis Child* (1976);51:337-43.
- 128) Geddis, A.E. Inherited thrombocytopenia: Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia and thrombocytopenia with absent radii. *Semin Hematol* (2006);43:196-203.
- 129) Tonelli, R. et al. Hereditary thrombocytopenia due to reduced platelet production--report on two families and mutational screening of the thrombopoietin receptor gene (c-mpl). *Thromb Haemost* (2000);83:931-6.
- 130) Strippoli, P. et al. Mutational screening of thrombopoietin receptor gene (c-mpl) in patients with congenital thrombocytopenia and absent radii (TAR). *Br J Haematol* (1998);103:311-4.
- 131) Ballmaier, M. et al. Thrombopoietin in patients with congenital thrombocytopenia and absent radii: elevated serum levels, normal receptor expression, but defective reactivity to thrombopoietin. *Blood* (1997);90:612-9.
- 132) Albers et al. Compound inheritance of low-frequency regulatory SNP and rare null mutation in exon-junction complex subunit RBM8A causes TAR syndrome. *Nat Genet.* (2012);44(4):435-9.
- 133) Lawrence, J.B. et al. Reliability of automated platelet counts: comparison with manual method and utility for prediction of clinical bleeding. *Am J Hematol* (1995);48:244-50.
- 134) Ghys, T., Malfait, R., VAN den Bossche, J. Performance evaluation of the Sysmex XS-1000i automated haematology analyser. *Int J Lab Hematol.* (2008);31(5):560-6.
- 135) Orito, M. et al. [Reliability of low platelet counts--comparison of microscopic counts with automated hematology analyzer XE-2100]. *Rinsho Byori* (2005);53:793-801.
- 136) Jimenez, M.M. et al. Measurement of reticulated platelets by simple flow cytometry: An indirect thrombopoietic marker. *Eur J Intern Med* (2006);17:541-4.
- 137) Vogelhaar, S.A., Posthuma, D., Boomsma, D. Blood stability at room temperature for counting red and whiteblood cells and platelets. *Vascular Pharmacology* (2002); 39:123-125.
- 138) Pekelharing, J.M., Jonge, Rd., Lokhoff, J. et al. Reference values for 67 hematocytometry parameters as determined by sysmex XE-500. Analyser. *Nederlandse Tijdschrift voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde* (2009);34:89.
- 139) Cremer, M. et al. Immature platelet fraction as novel laboratory parameter predicting the course of neonatal thrombocytopenia. *Br J Haematol.* (2009);144(4):619-21.
- 140) Ochs, H.D. The Wiskott-Aldrich syndrome. *Isr Med Assoc J* (2002);4:379-84.
- 141) Robinson, M.S., Harrison, C., Mackie, I.J. et al. Reticulated platelets in primary and reactive thrombocytosis. *Br J Haematol* (1998);101, 388-9.
- 142) Drachman, J.G. Inherited thrombocytopenia: When a low platelet count does not mean ITP. *Blood* (2004); 103:390-398.
- 143) Gaydos, L.A., Freireich, E.J., Mantel, N. The quantitative relation between platelet count and hemorrhage in patients with acute leukemia. *N Engl J Med* (1962);266:905-909.
- 144) Harker, L.A., Slichter, S.J. The bleeding time as a screening test for evaluation of platelet function. *N Engl J Med* (1972);287:155-159.
- 145) Slichter, S.J. Relationship between platelet count and bleeding risk in thrombocytopenia patients. *Transfus Med Rev* (2004);18:153-167.
- 146) Ancliff, P.J. & Machin, S.J. Trigger factors for the prophylactic platelet transfusion. *Blood Reviews* (1998),12:234-238.
- 147) Norfolk, D.R., Ancliffe, P.J., Contreras, M. et al. Consensus Conference on Platelet Transfusion, Royal College of Physicians of Edinburgh 27-28 November. *British Journal of Haematology*(1997),101:609-617.

- 148) de Vries, R.A., de Bruin, M., Marx, J.J. et al. Radioisotopic labels for blood cell survival studies: a review. *Nuclear Medicine and Biology* (1993);20(7):809–17.
- 149) Steinberg, M.H., Kelton, J.G. & Collier, B.S. Plasma glycofibrinogen –an aid in the classification of thrombocytopenic disorders. *New England Journal of Medicine* (1987),17:1037–1042.
- 150) Porcelijn, J.L., Folman, C.C., Bossers, B. et al. *Thrombosis and Haemostasis* (1998);79: 1101–1110.
- 151) Hayashi, S., Oshida, M., Kiyoi, T. et al. Comparison of reticulated platelet count with plasma glycofibrinogen concentration as a marker of platelet turnover in patients with thrombocytopenic disorders. *Rinsho Ketsueki* (2000);41(9):705–711.
- 152) Steffan, A., Pradella, P., Cordiano, I. et al. Glycofibrinogen in the diagnosis and management of immune thrombocytopenia. *European Journal of Haematology* (1998);6:77–83.
- 153) Danpure, H.J., Osman, S. & Brady, F. The labelling of blood cells in plasma with <sup>111</sup>In-tropolonate. *British Journal of Radiology* (1982);55:247–249.
- 154) Robinson, M.S.C., Mackie, I.J., Khair, K. et al. Flow cytometric analysis of reticulated platelets: evidence for a large proportion of non-specific labelling of dense granules by fluorescent dyes. *British Journal of Haematology* (1998), 100:351–357.
- 155) Fatime Imeri, Roberto Herklotz, Lorenz Risch. Stability of hematological analytes depends on the hematology analyser used: A stability study with Bayer Advia 120, Bechman Coulter LH 750 and sysmex Xe 2100. *Clinica Chimica Acta* (2008);397:68-71.
- 156) Osei-Bimpong, A. The effect of storage on the clinical utility of the immature platelet fraction. *Hematology* (2009);14:118–121.
- 157) Ruisi, M.M., Psaila, B., Ward, M.J. et al. Stability of measurement of the immature platelet fraction. *Am J Hematol.* (2010);85(8):622-4.
- 158) Pons, I., Monteagudo, M., Lucchetti, G. et al. Correlation between immature platelet fraction and reticulated platelets. Usefulness in the etiology diagnosis of thrombocytopenia. *Eur J Haematol.* (2010);85(2):158-63.
- 159) Cho, Y.G., Lee, J.H., Kim, D.S. et al. Clinical usefulness of the simple technique to diagnose thrombocytopenia using immature platelet fraction. *Korean J Lab Med.* (2007);27(1):1-6.
- 160) Dame, C. Developmental biology of thrombopoietin in the human fetus and neonate. *Acta Paediatr Suppl.* (2002);91(438):54-65.
- 161) Branehög, I., Ridell, B., Weinfeld, A. On the analysis of platelet survival curves and the calculation of platelet production and destruction. *Scand J Haematol.* (1977);19(3):230-41.
- 162) Ridell, B., Branehög, I. The ultrastructure of the megakaryocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) in relation to thrombokinetics. *Pathol Eur.* (1976);11(3):179-87.
- 163) Grossi, A., Vannucchi, A.M., Casprini, P. et al. Different patterns of platelet turnover in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Scand J Haematol.* (1983);31(3):206-14.
- 164) Ballem, P.J., Segal, G.M., Stratton, J.R. et al. Mechanisms of thrombocytopenia in chronic autoimmune thrombocytopenic purpura. Evidence of both impaired platelet production and increased platelet clearance. *J Clin Invest.* (1987);80(1):33-40.
- 165) Chang, M., Nakagawa, P.A., Williams, S.A. et al. Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood.* (2003);102(3):887-95.
- 166) Yang, L., Wang, L., Zhao, C.H. et al. Contributions of TRAIL-mediated megakaryocyte apoptosis to impaired megakaryocyte and platelet production in immune thrombocytopenia. *Blood.* (2010);116(20):4307-16.

- 167) Uçar, C., Oren, H., Irken, G. et al. Investigation of megakaryocyte apoptosis in children with acute and chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol.* (2003);70(6):347-52.
- 168) Chen, J.F., Yang, L.H., Feng, J.J. et al. The clinical significance of immune-related marker detection in idiopathic thrombocytopenic purpura]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* (2010);49(9):765-8.
- 169) Chang, M., Suen, Y., Meng, G. et al. Differential Mechanisms in the Regulation of Endogenous Levels of Thrombopoietin and Interleukin-11 during Thrombocytopenia: Insights Into the Regulation of Platelet Production. *Blood.* (1996);88:3354-3362.
- 170) Ichikawa, N., Ishida, F., Shimodaira, S. et al. Regulation of serum thrombopoietin levels by platelets and megakaryocytes in patients with aplastic anaemia and idiopathic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost.* (1996);76:156-160.
- 171) Kosugi, S., Kurata, Y., Tomiyama, Y. et al. Circulating thrombopoietin level in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* (1996);93:704-706.
- 172) Peerschke, E.I., Andemariam, B., Yin, W. et al. Complement activation on platelets correlates with a decrease in circulating immature platelets in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* (2010);148(4):638-45.
- 173) Aboul-Fotouh, Lel-M., Abdel Raheem, M.M., El-Deen, M.A. et al. Role of CD4+CD25+ T cells in children with idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Pediatr Hematol Oncol.* (2011);33(2):81-5.
- 174) Rossi, F., Mancusi, S., Bellini, G. et al. CNR2 functional variant (Q63R) influences childhood immune thrombocytopenic purpura. *Haematologica* (2011);96(12):1883-5.
- 175) Jung, H., Jeon, H.K., Kim, H.J. et al. Immature platelet fraction: establishment of a reference interval and diagnostic measure for thrombocytopenia. *Korean J Lab Med.* (2010);30(5):451-9.
- 176) Del Vecchio, G.C., Giordano, P., Tesse, R. et al. Clinical significance of serum cytokine levels and thrombopoietic markers in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood Transfus.* (2012);10(2):194-9.
- 177) Domínguez, V., Govezensky, T., Gevorkian, G. et al. Low platelet counts alone do not cause bleeding in an experimental immune thrombocytopenic purpura in mice. *Haematologica.* 2003 Jun;88(6):679-87.
- 178) Dunois-Lardé, C., Capron, C., Fichelson, S. et al. Exposure of human megakaryocytes to high shear rates accelerates platelet production *Blood.* (2009);114(9):1875-83.
- 179) Cannavo, I., Ferrero-Vacher, C., Sudaka, I. et al. Assessment of an immature platelet fraction (IFP%) in the diagnosis of thrombocytopenia.[Article in French]. *Ann Biol Clin (Paris)* (2010);68(4):415-20.
- 180) Kopecky, K.K., Moriarty, A.T., Antony, A.C. et al. Extramedullary hematopoiesis in acute lymphocytic leukemia masquerading as hepatic, renal, and splenic microabscesses. *AJR Am J Roentgenol.* (1986);147(4):846-7.
- 181) Yusen, R.D., Kollef, M.H. Acute respiratory failure due to extramedullary hematopoiesis. *Chest.* (1995);108(4):1170-2.
- 182) Letestu, R., Vitrat, N., Masse, A. et al. Existence of a differentiation blockage at the stage of a megakaryocyte precursor in the thrombocytopenia and absent radii (TAR) syndrome. *Blood.* (2000);95:1633-1641.
- 183) Fiedler, J. et al. Two pattern of thrombopoietin signaling suggest no coupling between platelet production and thrombopoietin reactivity in thrombocytopenia absent radii syndrome. *Haematologica* (2012);97(1):73.81.
- 184) Lopez, I., Guerci, A., Bouscary, D. et al. Elevated thrombopoietin serum concentrations in myelodysplasias. *Platelets.* (1998);9(5):287-90.

- 185) Mullen, C.A., Anderson, K.D., Blaese, R.M. Splenectomy and/or bone marrow transplantation in the management of the Wiskott-Aldrich syndrome: long-term follow-up of 62 cases. *Blood*. (1993);82:2961-2966.
- 186) Kajiwara, M., Nonoyama, S., Eguchi, M. et al. WASP is involved in proliferation and differentiation of human haemopoietic progenitors in vitro. *Br J Haematol*. (1999);107:254-262.
- 187) Grøttum, K.A., Holvig, T., Holmsen, H. et al. Wiskott-Aldrich syndrome:Qualitative platelet defects and short platelet survival. *Br J Haematol*. (1969);17:373-388.
- 188) Sungaran, R., Chisholm, O.T., Markovic, B. et al. The role of platelet alpha-granular proteins in the regulation of thrombopoietin messenger RNA expression in human bone marrow stromal cells. *Blood*. (2000);95:3094-3101.
- 189) Arthur Kaser, Gerald Brandacher, Wolfgang Steurer. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin:role in inflammatory thrombocytosis. *Blood* (2001);98:2720-2725.
- 190) Navarro, S., Debili, N., Le Couedic, J.P. et al. Interleukin-6 and its receptor are expressed by human megakaryocytes: in vitro effects on proliferation and endoreduplication. *Blood*. (1991);77:461-471.
- 191) Ishibashi, T., Kimura, H., Uchida, T. et al. Human interleukin 6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1989);86:5953-5957.
- 192) Kaushansky, K. The chronic myeloproliferative disorders and mutation of JAK2: Dameshek's 54 year old speculation comes of age. *Best Pract Res Clin Haematol*. (2007);20(1):5-12.
- 193) Cerutti, A., Custodi, P., Mduranti et al. Circulating thrombopoietin in reactive conditions behaves like an acute phase reactant. *Clin Lab Haematol*. 1999 Aug;21(4):271-5.
- 194) Cerutti, A., Custodi, P., Duranti, M. et al. Thrombopoietin levels in patients with primary and reactive thrombocytosis. *Br J Haematol*. 1997 Nov;99(2):281-4.

## **7 Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Gerhard Gaedicke für seine Unterstützung und den Kontakt zu PD Dr. Harald Schulze bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt PD Dr. Harald Schulze für die Bereitstellung des von mir bearbeiteten Dissertationsthemas, seine herausragende Betreuung, unermüdlich fortwährenden Einsatz und seine Motivation.

Ich möchte mich auch bei Dr. med. Dipl. biochem. Andreas Weimann und PD Dr. Andreas Lun aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin der Charité für ihre Hilfe und konstruktive Zusammenarbeit bedanken.

Dr. med. Gabriele Strauss danke ich für ihre Unterstützung und den Kontakt zu den pädiatrischen Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Klinik für pädiatrische Hämatologie und Onkologie der Charité, insbesondere Dr. Arend von Stackelberg und Dr. Barbara Schütz, die zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben.

Schließlich danke ich allen die mich während der Entstehung meiner Dissertation uneingeschränkt unterstützt und motiviert haben. Hierfür möchte ich mich vor allem bei meiner Familie und, im Besonderen, bei Johannes bedanken.

## **8 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

„Ich, Cora Vollert, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema“Immature Platelet Fraction“: Evaluation eines neuen Thrombozytenparameters in der Differentialdiagnose von Thrombozytopenien bei Kindern“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

## **9 Lebenslauf:**

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



## 10 Publikationsliste

- 1) Strauß, G., Vollert, C. *et al.* 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.