

Aus der Charité – Universitätsmedizin Berlin
CharitéCentrum 17 für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin
Klinik für Neonatologie
Direktor: Prof. Dr. med. Christoph Bühner

Habilitationsschrift

Thrombozytopenie, *Immature platelet fraction*, Erythroblasten und
Retikulozyten-Zellindices im Blutbild des Neugeborenen

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Pädiatrie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinische Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Malte Cremer
geboren in Wolfsburg

Eingereicht:	März 2017
Dekan:	Professor Dr. Axel R. Pries
1. Gutachter/in:	Professor Dr. Thorsten Orlikowsky, Aachen
2. Gutachter/in:	Professor Dr. Michael Zemlin, Saarbrücken

Für meine große Liebe Carolin

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungen.....	4
1. Einleitung.....	5
1.1 Inzidenz und Ätiologie der neonatalen Thrombozytopenie	5
1.2 <i>Immature platelet fraction</i>	6
1.3 Erythroblasten.....	7
1.4 Retikulozyten-Zellindices bei Neugeborenen	8
1.5 Hämorrhagie und Thrombozytentransfusion	8
2. Eigene Arbeiten.....	11
2.1 <i>Immature platelet fraction</i> bei Neugeborenen	11
2.2 <i>Immature platelet fraction</i> und Erythroblasten bei Sepsis und nekrotisierender Enterokolitis	15
2.3 Thrombozytopenie und andere Risikofaktoren bei pulmonaler Hämorrhagie	21
2.4 Internationaler Vergleich von Transfusionsgrenzen bei Thrombozytopenie.....	29
2.5 Erythroblasten bei <i>very low birth weight infants</i> als Marker für Morbidität und Mortalität.....	39
2.6 Retikulozyten-Hämoglobingehalt und Delta-Hämoglobingehalt.....	45
3. Diskussion	57
4. Zusammenfassung	63
5. Literaturangaben.....	64
Danksagung.....	71
Erklärung	72

Abkürzungen

AUC	<i>area under the curve</i>
AUT	Österreich
CRIB	<i>clinical risk index for babies</i>
CRP	C-reaktives Protein
Delta-He	Delta-Hämoglobin
ECMO	extrakorporale Membranoxygenierung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELBW	<i>extremely low birth weight infants</i>
FFP	<i>fresh frozen plasma</i>
GER	Deutschland
IL-6	Interleukin-6
IPF	<i>immature platelet fraction</i>
IVH	intraventrikuläre Hämorrhagie
KI	Konfidenzintervall
MCH	<i>mean corpuscular hemoglobin</i>
MPV	<i>mean platelet volume</i>
NEC	nekrotisierende Enterokolitis
NRBC	<i>nucleated red blood cells</i>
PAF-4	Plättchen-aktivierender Faktor 4
Ret-He	Retikulozyten-Hämoglobingehalt
RNA	Ribonukleinsäure
ROP	<i>retinopathy of prematurity</i>
SGA	<i>small for gestational age</i>
SSW	Schwangerschaftswochen
SUI	Schweiz
TK	Thrombozytenkonzentrat
US	Vereinigte Staaten von Amerika
VLBW	<i>very low birth weight infants</i>

1. Einleitung

1.1 Inzidenz und Ätiologie der neonatalen Thrombozytopenie

Die Thrombozytopenie wird definiert durch eine Thrombozytenzahl $< 150 \times 10^9/l$. Der Schweregrad der Thrombozytopenie wird eingeteilt in leicht (Thrombozytenzahl $100 - 149 \times 10^9/l$), moderat ($50 - 99 \times 10^9/l$) und schwer ($< 50 \times 10^9/l$).^{1, 2, 3} Bei Früh- und Neugeborenen, die intensiv-medizinisch betreut werden, sind 18-35% mindestens einmal während ihres stationären Aufenthalts thrombozytopen.^{4, 5} Besonders häufig betroffen sind Frühgeborene, wobei die Inzidenz der Thrombozytopenie negativ mit dem Gestationsalter korreliert.⁶ Bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1000 g (*extremely low birth weight infants*, ELBW) liegt die Inzidenz bei ca. 70%.³ Entwickelt sich eine Thrombozytopenie bei ELBW Frühgeborenen, ist diese in 40% der Fälle schwer.³ Bei einer Thrombozytenzahl unter $20 \times 10^9/l$ erhöht sich das Blutungsrisiko.⁷ Ob ein Zusammenhang zwischen einer Thrombozytenzahl zwischen $50 - 150 \times 10^9/l$ und einem erhöhten Blutungsrisiko besteht, ist unklar.⁸ Daher wird aktuell auch der Referenzbereich für eine „normale“ Thrombozytenzahl in der Literatur diskutiert. Hier stehen sich zwei verschiedene Sichtweisen gegenüber. Auf der einen Seite zeigte sich bei einer großen Kohortenstudie ($n > 47.000$) von Frühgeborenen mit einem Gestationsalter < 32 Schwangerschaftswochen (SSW) eine mediane Thrombozytenzahl von $123 \times 10^9/l$, die 5. Perzentile lag bei $104 \times 10^9/l$.⁶ Diese Autoren argumentieren, dass somit der Referenzbereich der Normalverteilung angeglichen werden sollte.⁶ Hierbei ist zu allerdings bedenken, dass die Frühgeburt *per se* mit einem Krankheitsprozess verbunden ist, welcher eine Thrombozytopenie auslösen könnte. Dem gegenüber steht eine Untersuchung mit wesentlich kleinerer Fallzahl ($n = 229$), bei der die Thrombozytenzahl mittels Cordozentese bei Feten bestimmt wurde und somit eher von einem „gesunden“ Kollektiv ausgegangen werden kann, welches nicht der Frühgeburtlichkeit unterliegt. In dieser Untersuchung lag die mittlere Thrombozytenzahl bei 15 SSW bei $187 \pm 47 \times 10^9/l$ und stieg bis zur 40. SSW auf $274 \pm 47 \times 10^9/l$.⁹

Ätiologisch sind bei Thrombozytopenie ein intravaskulärer oder extravaskulärer Verbrauch bzw. Verlust von Thrombozyten, ein Produktionsdefizit der Thrombozyten oder eine Kombination dieser Ursachen möglich.¹⁰ In der klinischen Einteilung der Thrombozytopenie ist der Zeitpunkt des Auftretens entscheidend, da sich Ursachen und Verlauf der Thrombozytopenie grundlegend unterscheiden.² In Analogie zur neonatalen Infektion wird die Thrombozytopenie in die „*early-onset*“-Thrombozytopenie (Beginn vor 72 Lebensstunden) und in „*late-onset*“-Thrombozytopenie (Beginn nach 72 Lebensstunden) unterteilt.²

Die *early-onset* Thrombozytopenie ist meist moderat oder mild.¹¹ In diesem Fall liegt häufig eine Plazentainsuffizienz vor, die zu einer akuten oder chronischen Hypoxie des Feten führt (z.B. Präeklampsie, maternaler Hypertonus).¹¹ Als Ausdruck der Hypoxie findet sich postnatal eine erhöhte Anzahl an erythrozytären Vorläuferzellen (Erythroblasten, *nucleated red blood cells*, NRBC) im Blut des Neugeborenen.¹² Daher wird davon ausgegangen, dass die fetale Hämatopoiese zu

Gunsten der Erythropoiese verschoben ist und die Megakaryopoiese verdrängt wird.¹³ Durch den postnatal deutlich höheren Sauerstoffpartialdruck fehlt zunächst der Stimulus für die Erythropoiese, so dass die Megakaryopoiese sich erholt und die Thrombozytenzahl wieder ansteigt. Eine weitere Ursache der *early-onset* Thrombozytopenie sind intrauterin oder perinatal erworbene bakterielle (Streptokokken, Staphylokokken, E. coli etc.), virale (Zytomegalievirus, Herpes simplex Virus, Humanes Immundefizienz Virus etc.) oder parasitäre Infektionen (Toxoplasma gondii).^{2, 14, 15, 16} Hier ist die Thrombozytopenie oft ausgeprägt und lang anhaltend; und der exakte Pathomechanismus unklar. Bei einem Großteil der Patienten mit *early-onset* Thrombozytopenie kann die Ursache allerdings nicht geklärt werden.

Der Beginn der *late-onset* Thrombozytopenie ist meist plötzlich, und die Thrombozytenzahl fällt rasch auf $< 50 \times 10^9/l$. Die *late-onset* Thrombozytopenie geht oft einer nekrotisierenden Enterokolitis (NEC), bakteriellen, viralen (Cytomegalie, Herpes simplex, Humanes Immundefizienz Virus) oder Pilz-Sepsis voraus.^{17, 18} Auf Grund des Schweregrades und der Dynamik der Thrombozytopenie besteht ein erhöhtes Blutungsrisiko.¹⁸ Ätiologisch kommen des Weiteren ein Thrombozytenverbrauch bei Thrombose oder eine medikamenten-assoziierte Thrombozytopenie (Virusstatika, Heparin) als Ursache in Betracht.¹¹

Auf Grund der unterschiedlichen Ursachen der neonatalen Thrombozytopenie ist es von Interesse, die Bildungsrate der Thrombozyten zu bestimmen, um so den Verlauf der Thrombozytopenie abschätzen zu können.

1.2 Immature platelet fraction

Die „*immature platelet fraction*“ (IPF) stellt den Anteil der RNA-haltigen Thrombozyten im peripheren Blut dar. Im Zytoplasma neu gebildeter, „unreifer“ Thrombozyten ist für circa 24 Stunden RNA nachweisbar. Der Begriff „*immature*“ erscheint in diesem Zusammenhang unpräzise, da es sich um junge Thrombozyten handelt, die ein größeres Zellvolumen aufweisen und ein höheres hämostaseologisches Potential als reife Thrombozyten besitzen. 1969 konnte erstmals im Tierversuch gezeigt werden, dass nach einem artifiziell herbeigeführten Thrombozytenverlust vermehrt RNA-haltige Thrombozyten – mikroskopisch nach geeigneter Färbung als retikulierte Thrombozyten identifizierbar - im peripheren Blut als Ausdruck einer gesteigerten Megakaryopoiese erscheinen.¹⁹ Kienast et al. etablierten dann eine durchflusszytometrische Methode, bei der die zytoplasmatische Thrombozyten-RNA mittels Thiazolorange-Farbstoff gefärbt und quantifiziert werden konnte. Die Anzahl der RNA-haltigen Thrombozyten im Blut korrelierte mit der Anzahl der Megakaryozyten im Knochenmark.²⁰ Seither wurde eine Vielzahl an klinischen Studien zur Untersuchung der retikulierten Thrombozyten durchgeführt, auch bei Neugeborenen. Allerdings sind die Untersuchungen sehr heterogen hinsichtlich der Methodik (Art des Farbstoffs, *Gating*), so dass kaum vergleichbare Resultate entstanden.^{21, 22, 23} Eine Weiterentwicklung dieser Methode mit der Möglichkeit, die Ergebnisse zu vergleichen, ist die Messung der IPF an voll-automatisierten

hämatologischen Analysegeräten der Firma Sysmex (Kobe, Japan).²⁴ Diese basiert auf der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie nach Zusatz eines patentierten Fluoreszenz-Farbstoffes auf der Basis von Polymethin/Oxazin und einem weltweit standardisiertem *Gating* im sogenannten Retikulozyten-Kanal.²⁴ Die IPF kann als prozentualer Anteil (IPF%) der Thrombozytenzahl angegeben werden oder als absolute Zahl (IPF# $\times 10^9/l$). Die Interpretation des prozentualen IPF% muss immer unter Berücksichtigung der Thrombozytenzahl vorgenommen werden. Die Bestimmung des absoluten IPF-Wertes ermöglicht eine Interpretation unabhängig von der Thrombozytenzahl. Dies kann im Falle einer Thrombozytopenie hilfreich sein. Es konnte gezeigt werden, dass die IPF# verringert ist bei einer Thrombozytopenie durch einen Produktionsmangel (nach Chemotherapie) bzw. bei einer Thrombozytopenie auf Grund eines gesteigerten Verbrauchs erhöht ist, wie bei der Immun-Thrombozytopenie.²⁴

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Etablierung der IPF-Messung bei neonataler Thrombozytopenie hilfreich sein kann, um ein verbessertes Management zum Beispiel hinsichtlich der Häufigkeit von Blutentnahmen zur Kontrolle der Thrombozytenzahl zu erreichen.

1.3 Erythroblasten

Erythroblasten (*nucleated red blood cells*, NRBC) sind Vorläuferzellen der Erythrozyten, die noch den Zellkern aufweisen. Vor dem Verlassen aus der hämatopoietischen Nische des Knochenmarks wird der Zellkern ausgestoßen. Im Gegensatz zu Erwachsenen finden sich bei Neugeborenen und Frühgeborenen physiologischerweise NRBCs in der peripheren Zirkulation.^{12, 25, 26} In der Neonatalperiode ist das Ausmaß des Auftretens der NRBC mit fetalem Stress oder intrauteriner Wachstumsretardierung assoziiert.²⁵ Damit korreliert eine erhöhte Erythropoietin-Konzentration als Folge einer Hypoxie.^{27, 28, 29} In klinischen Studien in der Erwachsenenmedizin konnte interessanterweise das Outcome während einer intensivmedizinischen Behandlung mit dem Auftreten von NRBC in der peripheren Zirkulation korreliert werden.^{30, 31}

Heutzutage kann die Anzahl der NRBC mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie auch bei niedriger Konzentration bestimmt werden.³² Diese Methode wird üblicherweise bei der Analyse des neonatalen Blutbilds angewandt, da in der Routinediagnostik im hämatologischen Analyseautomat die Leukozyten und NRBC auf Grund ihrer ähnlichen Größe schlecht unterschieden werden können und somit die NRBC-Anzahl mit der Leukozytenzahl interferiert. Die Analyse der NRBC in EDTA-Blut im vollautomatischen Blutanalysator Sysmex XE-2100™ (Sysmex, Kobe, Japan) beinhaltet zwei Schritte: Lyse und Färbung mit Fluoreszenzfarbstoff (STROMATOLYSER-WH™, Sysmex).³² Im ersten Schritt lysiert das Reagenz die Zellmembran der NRBC komplett, so dass nur der Zellkern übrig bleibt. Die Zellmembran der Erythrozyten wird ebenfalls komplett lysiert. Die Membran der Leukozyten wird durch das Lysereagenz zwar perforiert, bleibt aber im Wesentlichen erhalten. Der Fluoreszenzfarbstoff färbt nun den Zellkern, so dass in der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie diese drei Zellpopulationen eindeutig voneinander getrennt werden können: Die Leukozyten stellen sich

als große Zellen mit hoher Fluoreszenz dar, die NRBC-Zellkerne als kleine Zellen mit mittlerer Fluoreszenz und die lysierten Erythrozyten als sehr kleine Partikel mit geringer Fluoreszenz. Auf Grund der großen Anzahl von ausgezählten Zellen können im Gegensatz zur manuellen mikroskopischen Auszählung im Blutausschlag auch geringe Veränderungen der NRBC-Konzentration detektiert werden.

1.4 Retikulozyten-Zellindices bei Neugeborenen

Der Hämoglobingehalt der Retikulozyten (Ret-He) kann im hämatologischen Analyse-Automaten verschiedener Hersteller (Siemens, Beckman-Coulter, Abbott, Sysmex) gemessen werden.^{33, 34} Nach der Perforation der Zellmembran durch ein selektives Lysereagenz markiert der gleiche Fluoreszenz-Farbstoff, der bei der IPF-Messung verwendet wird (Ret-Search II, Sysmex), die intrazelluläre RNA. Die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie detektiert dann im Seitwärtsstreulicht die Fluoreszenzintensität und im Vorwärtsstreulicht die Zellgröße. Der Hämoglobingehalt der reifen Erythrozyten (MCH) wird dann vom Hämoglobingehalt des Retikulozyten (Ret-He) subtrahiert und ergibt das Delta-Hämoglobin (Delta-He):

$$\text{Delta Hämoglobin} = \text{Hämoglobingehalt des Retikulozyten} - \text{MCH}$$

Bei gesunden Erwachsenen ist das Delta-He immer positiv, da die Retikulozyten größer sind als reife Erythrozyten und mehr Hämoglobin enthalten. Der Normwert bei Erwachsenen liegt zwischen +2 pg und + 8 pg pro Zelle (Herstellerangabe). Durch die kurze Lebensdauer der Retikulozyten von durchschnittlich ein bis drei Tage können Veränderungen des Retikulozyten-Hämoglobingehalt und des Delta-He zeitnah im Blutbild detektiert werden. Beide Parameter, Ret-He und Delta-He, sind geeignet, die funktionelle Verfügbarkeit von Eisen zusammen mit klinisch-chemischen Parametern wie dem Ferritin, dem Transferrin sowie der Transferrin-Sättigung bei erwachsenen Patienten zu messen.^{35, 36, 37, 38, 39} Bei einer Eisenmangelanämie ist Delta-He reduziert, bleibt aber im positiven Bereich. Bei der Anämie bei chronischer Entzündung oder Tumoranämie wird der Delta-He auf Grund der Sequestrierung des Eisens durch den Inflamationsprozess häufig negativ.^{40, 41} Bei Neugeborenen und *very low birth weight* Frühgeborenen (VLBW, Geburtsgewicht < 1500g) existieren Daten zum Ret-He,⁴² aber nicht zum Delta-He. Die Messung des Ret-He und des Delta-He könnte hilfreich sein, um die Effektivität der Erythropoiese bei der Anämie des Frühgeborenen oder anderen Anämien mit vermindertem Hämoglobingehalt in den Retikulozyten abzuschätzen.

1.5 Hämorrhagie und Thrombozytentransfusion

Die Transfusion von Thrombozytenkonzentrat (TK) ist bislang die einzige Möglichkeit, die neonatale Thrombozytopenie zu therapieren. Die Transfusion wird insbesondere bei sehr unreifen Frühgeborenen oder immunologisch bedingter Thrombozytopenie meistens prophylaktisch durchgeführt, sobald die Thrombozytenzahl unter einen bestimmten Wert sinkt.^{43, 44, 45} Bislang ist

unklar, ob eine prophylaktische Thrombozytentransfusion eine Blutung bei Neugeborenen verhindern oder das Blutungsrisiko senken kann.⁴⁴ Die schwerwiegendste Blutung in der Neonatalperiode ist die intraventrikuläre Hämorrhagie (IVH).⁴⁶ Der Zusammenhang zwischen Schweregrad der Thrombozytopenie und Auftreten einer Blutung, insbesondere der IVH, ist unklar.^{47, 48} Es ist anzunehmen, dass andere Risikofaktoren eine wichtige Rolle spielen.^{48, 49} Ein wesentlicher Risikofaktor für das Auftreten einer IVH ist das Gestationsalter.^{44, 49} Die Inzidenz der IVH korreliert invers mit dem Gestationsalter bzw. mit dem Geburtsgewicht, betroffen sind im wesentlichen Frühgeborene mit dem Geburtsgewicht <1500g (Inzidenz 10-15%).⁴⁸ Für das Auftreten einer IVH sind etliche andere Risikofaktoren identifiziert, wie zum Beispiel postnatale Hypothermie, Geminigravidität, Amnioninfektionssyndrom oder fehlende antenatale Steroidgabe zur Lungenreifeinduktion.^{50, 51, 52, 53, 54} Die IVH zieht oft bleibende neurologische Schäden nach sich und ist mit einer hohen Mortalität assoziiert.⁵⁵ Es existiert eine einzige randomisierte, kontrollierte Studie aus dem Jahr 1993 zu der Frage, ob eine prophylaktische Transfusion eine IVH bei VLBW Frühgeborenen verhindern kann.⁵⁶ Randomisiert wurde in zwei Gruppen: Transfusion bei einer Thrombozytenzahl < 50 × 10⁹/l oder bei einer Thrombozytenzahl < 150 × 10⁹/l. Die Inzidenz der IVH war in den Gruppen gleich (25% versus 28%).⁵⁶ Eine weitere schwere Form der Hämorrhagie ist die Lungenblutung.⁴⁴ Die Inzidenz der Lungenblutung ist wesentlich niedriger als die der IVH.⁵⁷ Die pulmonale Hämorrhagie ist mit einer hohen Mortalität von 50 - 68% assoziiert.^{58, 59, 60} Verschiedene klinische Risikofaktoren (niedriges Geburtsgewicht und Gestationsalter, Lungenhypoplasie, Sepsis, intrauterine Wachstumsrestriktion) sowie Thrombozytopenie und Koagulopathie sind für das Auftreten einer Lungenblutung beschrieben.^{59, 60} Inwieweit die Transfusion von TK oder *fresh frozen plasma* (FFP) mit einer Lungenblutung assoziiert ist, ist bislang unklar.

In Ermangelung besserer evidenz-basierter Daten, beruhen Empfehlungen zur Thrombozytentransfusion im Wesentlichen auf Expertenmeinung.^{8, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67} Die Empfehlungen sehen in der Regel eine Transfusionsgrenze mit Angabe einer bestimmten Thrombozytenzahl unter Berücksichtigung einer klinischen Situation vor, die allerdings oft unscharf definiert ist. Die aktuellen Empfehlungen britischer und amerikanischen Experten berücksichtigen bei nicht-blutenden Neugeborenen drei klinische Situationen: prä- und postoperativ oder ECMO (Transfusionsgrenze <100.000 × 10⁹/l), klinisch instabil (Transfusionsgrenze < 50.000 × 10⁹/l) und klinisch stabil (Transfusionsgrenze <20.000 × 10⁹/l).^{68, 69, 70} Hierbei meint der Begriff „klinisch instabiles Neugeborenes“ ein Neugeborenes mit erhöhtem Risiko für eine Hämorrhagie, wie zum Beispiel Frühgeborene in der ersten Lebenswoche.⁶⁹ Diesen Empfehlungen wird der Evidenzgrad 2B bis 3 zugeordnet.⁷⁰ Ein weiteres interessantes Konzept zur Festlegung der Transfusionsgrenze wird von Christensen et al. vorgeschlagen:⁷¹ Die Transfusionsgrenze wird abhängig von der vorliegenden mittleren Thrombozytengröße, dem *mean platelet volume* (MPV) und der Thrombozytenzahl festgelegt. Bei diesem Konzept wird die sogenannte Thrombozytenmasse berechnet, indem die Thrombozytenzahl mit dem MPV multipliziert wird. Die Autoren argumentieren, dass größere Thrombozyten ein höheres hämostaseologisches Potential als kleinere Thrombozyten

aufweisen und somit eine niedrigere Thrombozytenzahl zur Bestimmung der Transfusionsgrenze herangezogen werden kann. Diese Hypothese wurde in einer quasi-experimentellen Studie an zwei US-Zentren untersucht, wobei zwei Zeiträume verglichen wurden. Im ersten Zeitraum wurde die Transfusionsgrenze konventionell anhand der Thrombozytenzahl festgelegt, in den anschließenden zwölf Monaten anhand der berechneten Thrombozytenmasse. Es zeigte sich in beiden Zeiträumen eine vergleichbare Blutungsinzidenz, jedoch eine geringere Anzahl an Thrombozytentransfusionen, wenn die Thrombozytenmasse berücksichtigt wurde.⁷¹ Problematisch an dieser Herangehensweise könnte sein, dass es bei einer schweren Thrombozytopenie zu einer schiefen Verteilung der Thrombozytengröße kommen kann und somit die MPV nicht berechnet werden kann. Im Gegensatz zur Messung des MPV durch elektrische Impedanzänderung ist bei der Bestimmung der IPF die Normalverteilung der Thrombozytengröße keine Voraussetzung.⁷²

2. Eigene Arbeiten

2.1 *Immature platelet fraction* bei Neugeborenen

Cremer M, Paetzold J, Schmalisch G, Hammer H, Loui A, Dame C, Weimann A.

„Immature platelet fraction as novel laboratory parameter predicting the course of neonatal thrombocytopenia.“ Br J Haematol. 2009 Feb;144(4):619-21.

Über einen Zeitraum von sechs Monaten wurde bei allen Patienten, die auf die Neugeborenen-Intensivstation aufgenommen wurden, mit dem Blutbild die IPF während der ersten Lebenswoche untersucht. Ziel dieser Untersuchung war es, Referenzwerte für Neugeborene zu etablieren, sowie einen Zusammenhang zwischen der Thrombozytenzahl und der IPF herzustellen. Insgesamt wurden 612 Neugeborene in die Studie aufgenommen. Im Mittel wurde 2,18-mal das Blutbild während der ersten Lebenswoche untersucht, so dass insgesamt 1339 Blutbilder vorlagen, bei denen in 1045 Fällen Thrombozyten- und IPF-Werte simultan gemessen wurden. 156 (25%) Neugeborene wiesen während der ersten Lebenswoche mindestens einmalig eine Thrombozytopenie auf (Thrombozytopenie-Gruppe). 456 Neugeborene waren nicht-thrombozytopen (Kontroll-Gruppe). Die Thrombozytopenie-Gruppe hatte signifikant höhere IPF-Werte als die Kontroll-Gruppe. Die mittlere IPF war in der Thrombozytopenie-Gruppe am ersten Lebenstag (IPF: 8,7%) fast doppelt so hoch wie in der Kontroll-Gruppe (IPF: 4,5%). In der Thrombozytopenie-Gruppe kam es zunächst zu einem stetigen Abfall der Thrombozytenzahl bis zum fünften Lebenstag und dann zu einem Wiederanstieg an Lebenstag 6 und 7. Die IPF fiel zunächst vom ersten zum zweiten Lebenstag und stieg ab Tag 3 kontinuierlich wieder an. In der Kontroll-Gruppe blieb die Thrombozytenzahl bis zum 5. Lebenstag konstant und stieg an Tag 6 und 7 an. Die IPF stieg kontinuierlich ab Tag 4. Zur Etablierung eines Referenzwertes wurde in der Kontrollgruppe der Median des IPF während der ersten Lebenswoche errechnet (4,8%; 95%-Konfidenzintervall: 0,7 – 7,9%). In der Thrombozytopenie-Gruppe kam es bei nur fünf von 99 Patienten (5%) zu einem ausgeprägten Thrombozytenabfall ($> 50 \times 10^9/l$) am Folgetag, wenn die IPF $>8\%$ war und somit eine gesteigerte Bildungsrate vorlag. Lag die IPF $<8\%$, kam es bei 71 von 299 Patienten (24%) zu einem schweren Thrombozytenabfall (Relatives Risiko 4,7; 95%-Konfidenzintervall: 1,9 – 11,8).

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07485.x>

2.2 *Immature platelet fraction* und Erythroblasten bei Sepsis und nekrotisierender Enterokolitis

Cremer M, Weimann A, Szekessy D, Hammer H, Bühner C, Dame C.

„Low immature platelet fraction suggests decreased megakaryopoiesis in neonates with sepsis or necrotizing enterocolitis”. J Perinatol. 2013 Aug;33(8):622-6.

Im Gegensatz zur *early-onset* Thrombozytopenie kommt es bei der *late-onset* Thrombozytopenie (> 72 h post natum) häufiger zu einer schweren Thrombozytopenie ($<50 \times 10^9/l$). Circa 6-10% aller Neugeborenen auf einer Intensivstation sind von einer *late-onset* Thrombozytopenie betroffen. Die bakterielle Sepsis und die nekrotisierende Enterokolitis (NEC) sind die häufigsten Auslöser. Der Pathomechanismus dieser Thrombozytopenie ist nicht geklärt. Denkbar sind ein Thrombozytenverbrauch, eine Bildungsstörung oder eine Kombination dieser Mechanismen. Bei der NEC ist die Anzahl der im Zuge der Thrombozytopenie verabreichten TKs mit einem schlechteren Outcome verknüpft (erhöhte Mortalität, Kurzdarmsyndrom). Ob die Thrombozytentransfusion bei NEC ursächlich oder Ausdruck der Schwere der Erkrankung ist, ist unklar. Es könnte daher bedeutsam sein, die Bildungsrate bei der *late-onset* Thrombozytopenie zu bestimmen, um möglicherweise TKs restriktiv zu verabreichen.

Untersucht wurden 21 Neugeborene mit Blutkultur positiver Sepsis und 11 Neugeborene mit NEC, die in einer Laparotomie bestätigt wurde. Bei den Patienten wurde zu vier verschiedenen Zeitpunkten die Thrombozytenzahl, der IPF-Wert und die Anzahl der NRBCs bestimmt: T0 = letzte Blutwert vor Beginn der Symptome; T1 = Zeitpunkt der Diagnosestellung; T2 = drei bis fünf Tage nach Diagnosestellung; T3 = acht bis zwölf Tage nach Diagnosestellung. Der Thrombozyten-Nadir trat bei T2 ein. Parallel zum Abfall der Thrombozyten kam es zu einem Abfall der IPF#. Bei Patienten mit niedriger IPF ($< 2 \times 10^9/l$) kam es zu keinem Wiederanstieg der Thrombozyten zum Zeitpunkt T3. Neugeborene mit NEC, die verstarben, hatten signifikant niedrige IPF# als die Überlebenden. NRBC wurden bei 29 (88%) der Patienten mit Sepsis/NEC detektiert. Die NRBC korrelierten invers mit der IPF# ($r=0,52$; $p<0,001$). Der Quotient aus NRBC/IPF# war bei verstorbenen Patienten höher als bei Überlebenden (0,483 versus 0,0053; $P<0,008$).

Niedrige IPF# während einer Sepsis/NEC Episode spiegeln eine supprimierte Megakaryopoiesis wider.

<https://doi.org/10.1038/jp.2013.21>

2.3 Thrombozytopenie und andere Risikofaktoren bei pulmonaler Hämorrhagie

Usemann J, Garten L, Bühner C, Dame C, Cremer M.

„Fresh-frozen plasma transfusion - a risk factor for pulmonary hemorrhage in extremely low birth weight infants?“ J Perinat Med. 2017 Feb [epub ahead of print]

Wie auch bei anderen Blutungsereignissen bei Frühgeborenen, ist der Zusammenhang zwischen der Thrombozytenzahl und dem Risiko für eine Lungenblutung unklar. Aus diesem Grund wurden in einer retrospektiven Fall-Kontroll-Studie Patienten mit einem Geburtsgewicht < 1000 g (n=20, ELBW) analysiert, bei denen sich eine schwere Lungenblutung ereignete. Diese Patienten wurden mit Kontrollpatienten im Verhältnis von 1:2 und entsprechendem Gestationsalter und Geburtsgewicht *gematcht*. Erhoben wurden epidemiologische Daten, Ergebnisse aus der Gerinnungsanalyse, der Thrombozytenzahl, sowie die transfundierten Blutprodukte (TKs und *fresh frozen plasma*, FFP) vor Auftreten der Lungenblutung. Blutuntersuchung wurden am ersten Lebenstag und nach 24 – 96 h post natum miteinander verglichen.

Die Lungenblutung trat im Median am 3. Lebenstag auf (Spannweite: 2. – 5. Lebenstag). Die Mortalität (35 %) bis zum 7. Lebenstag war im Vergleich zur Kontrollgruppe (10 %) signifikant erhöht. ELBW Frühgeborene mit späterer Lungenblutung erhielten signifikant seltener antenatale Steroide zur Lungenreifeinduktion. Die Häufigkeit der Intubation und Surfactantapplikation während der Erstversorgung waren nicht verschieden. Der CRIB-Score (*clinical risk index for babies*), ein Score zur Prädiktion der frühen Mortalität, war in den Gruppen nicht unterschiedlich. Bei den klinischen Parameter unterschied sich lediglich der maximale Sauerstoffbedarf in den ersten 12 Lebensstunden; dieser lag bei Frühgeborenen mit späterer Lungenblutung höher.

Die Gerinnungsanalyse am ersten Lebenstag zeigte bei der *international normalized ratio* (INR) und der Fibrinogenkonzentration keinen Unterschied zwischen den Gruppen. Die mittlere aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) war bei ELBW Frühgeborenen mit späterer Lungenblutung verlängert, jedoch war der Anteil der Patienten mit einer aPTT außerhalb des Referenzbereichs im Vergleich zu den Kontrollen nicht erhöht. Die initiale Thrombozytenzahl zwischen den Gruppen war nicht unterschiedlich. Zum Zeitpunkt der Lungenblutung lag die Thrombozytenzahl signifikant niedriger als bei Patienten der Kontrollgruppe, allerdings war der Anteil der Patienten mit einer schweren Thrombozytopenie in den Gruppen gleich. Die Anzahl und die Häufigkeit der vor einer Lungenblutung transfundierten TKs waren gleich. Patienten mit späterer Lungenblutung erhielten signifikant häufiger FFP vor Auftreten der Lungenblutung im Vergleich zu den Kontrollen. In der multivariaten Regressionsanalyse wurden fehlende Lungenreifeinduktion, maximaler Sauerstoffbedarf sowie FFP Transfusion vor Auftreten der Lungenblutung als unabhängige Risikofaktoren für eine spätere Lungenblutung identifiziert.

<https://doi.org/10.1515/jpm-2016-0309>

2.4 Internationaler Vergleich von Transfusionsgrenzen bei Thrombozytopenie

Cremer M, Sola-Visner M, Roll S, Josephson CD, Yilmaz Z, Bühler C, Dame C

„Platelet transfusions in neonates: practices in the United States vary significantly from those in Austria, Germany, and Switzerland“. Transfusion. 2011; 51:2634-2641

Im Jahr 2009 wurde eine Umfrage bei Neonatologen (n=2700) in den Vereinigten Staaten (US) zur Praxis und Indikationsstellung der Thrombozytentransfusion durchgeführt. Es wurden 11 verschiedene klinische Fallvignetten beschrieben und daran abgefragt, bei welcher Thrombozytenzahl der Neonatologe ein TK transfundieren würde. Die Fallbeispiele wurden so konstruiert, dass sie verschiedene Risikofaktoren zur Blutung beinhalteten.⁶²

Die Transfusionsgrenzen innerhalb einer Fallvignette, die von den nordamerikanischen Kollegen ausgewählt wurden, waren sehr unterschiedlich. Häufig wurde die Indikation zur Thrombozytentransfusion bei einer Thrombozytenzahl $> 50 \times 10^9/l$ bei nicht-blutenden Patienten gestellt. Diese Ergebnisse veranlassten uns, die identische web-basierte Umfrage bei leitenden Neonatologen (n=116) in Österreich (AUT), der Schweiz (SUI) und in Deutschland (GER) durchzuführen. Die Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen der nordamerikanischen Umfrage verglichen. Insgesamt wählten die deutschsprachigen Neonatologen signifikant niedrigere Transfusionsgrenzen in allen 11 Szenarien, zugleich gab es auch hier eine große Heterogenität hinsichtlich der gewählten Transfusionsgrenzen.

Es wurden das Transfusionsverhalten bei drei übergeordneten klinischen Konstellationen abgefragt: (stabiles Frühgeborenen, instabiles Frühgeborenen, reifes Neugeborenes). Beispielhaft werden nun die Ergebnisse ausgewählter Fälle präsentiert: Die ersten Fallbeispiele bezogen sich auf ein klinisch stabiles, nicht-blutendes Frühgeborenes (27 SSW, 950 g Geburtsgewicht). Fall 1 (27 SSW, 950 g, zweiter Lebenstag, klinisch stabil): Die Transfusionsgrenze der AUT/SUI/GER Neonatologen lag im Median bei $30 \times 10^9/l$, wohingegen die Transfusionsgrenze der nordamerikanischen Neonatologen $50 \times 10^9/l$ ($p < 0,0001$) betrug. Fall 4 (gleicher Patient, vor Lumbalpunktion): In AUT/SUI/GER lag die mediane Transfusionsgrenze bei $50 \times 10^9/l$, US Neonatologen wählten im Median $75 \times 10^9/l$ ($p < 0,001$). Die nächsten Fallbeispiele bezogen sich auf ein instabiles, kritisches krankes Frühgeborenes (27 SSW, 950g). Fall 6 (Sepsis, Katecholamin-Therapie, beatmet, IVH): In AUT/SUI/GER wurde im Median $50 \times 10^9/l$ als Transfusionsgrenze gewählt, die US Neonatologen wählten im Median $100 \times 10^9/l$ ($p < 0,0001$). Als nächstes wurde ein Fall eines reifen Neugeborenen präsentiert, bei dem die Anamnese eine Allo-Immuntrombozytopenie suggerierte: Hier lag in beiden Gruppen die mediane Transfusionsgrenze bei $30 \times 10^9/l$ mit engen Interquartilen-Abstand. Um die Ergebnisse des Transfusionsverhaltens zu quantifizieren, kalkultierten wir die Odds-Ratio, mit der US-Neonatologen im jeweiligen Szenario eine höhere Kategorie als AUT/SUI/GER Neonatologen wählen. In 9 von 11 Szenarien lag die Odds-

Ratio zwischen 3,25 und 5,05; gleichbedeutend mit der höheren Wahrscheinlichkeit, dass US-Neonatologen eine höhere Thrombozytenzahl als Grenze für die Transfusionsindikation wählen. Nur bei zwei Szenarien (vor Lumbalpunktion und beim Neugeborenen mit Allo-Immuntrombozytopenie) lag die Odds-Ratio <2 , welches ähnlich ausgewählte Transfusionsgrenzen zeigt. Durch die Ermittlung der Inzidenz der Thrombozytopenie auf unserer Intensivstation wurde anhand der gegebenen Antworten zur Transfusionsgrenze die Häufigkeit einer Thrombozytentransfusion extrapoliert: In AUT/SUI/GER wären 167 von 1000 Patienten, in US 299 von 1000 Patienten transfundiert worden, entsprechend einer 1,8-fach höheren Transfusionsrate.

<https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03208.x>

2.5 Erythroblasten bei *very low birth weight infants* als Marker für Morbidität und Mortalität

Cremer M, Roll S, Gräf C, Weimann A, Bühner C, Dame C

„Nucleated red blood cells as marker for an increased risk of unfavorable outcome and mortality in very low birth weight infants” *Early Hum Dev.* 2015 Okt; 91(10):559-63.

Die Konzentration von Erythroblasten (NRBC) im peripheren Blut ist bei Neugeborenen mit dem Auftreten von verschiedenen, das Outcome beeinflussenden Erkrankungen assoziiert. Verschiedene Studien konnten einen Zusammenhang einer erhöhten Konzentration von NRBC und der Inzidenz von NEC, periventrikulären Leukomalazie, Zerebralparese oder Tod bei reifen Neugeborenen nach Asphyxie herstellen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Assoziation zwischen der Anzahl der NRBC am ersten Lebenstag (d1) sowie im Zeitraum zwischen dem zweiten und fünften Lebenstag (d2-5) und dem Outcome (Mortalität sowie zusammengesetztes Outcome aus Mortalität und schwerer Morbidität) bei einer Kohorte von 438 VLBW Frühgeborenen untersucht. Insgesamt verstarben 46 VLBW Frühgeborene und 65 wiesen eine schwere Morbidität auf. Im Median trat der Tod am 13. Lebenstag ein. Die verstorbenen VLBW Frühgeborenen zeigten eine höhere NRBC-Konzentration als Überlebende. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen dem Geburtsgewicht und der NRBC-Anzahl an d1 ($r = -0,247$; $p < 0,001$) und an d2-5 ($r = -0,536$; $p < 0,001$). VLBW Frühgeborene mit schwerer IVH, späterer Laparotomie und Retinopathie (ROP)-Intervention zeigten eine höhere NRBC-Anzahl zum Zeitpunkt d2-5, aber nicht an d1. Die NRBC-Anzahl blieb bei Patienten am d2-5 ($7,9 \times 10^9/l$; Spannweite $0,2-42,7 \times 10^9/l$) im Vergleich zu den Überlebenden erhöht ($0,9 \times 10^9/l$; Spannweite $0-29,1 \times 10^9/l$). Ein Anstieg von $10 \times 10^9/l$ der mittleren NRBC-Anzahl am zweiten bis fünften Lebenstag zeigte eine Odds-Ratio für die Mortalität von 6,92 (95%-Konfidenzintervall 2,21 – 21,86) und einer Odds-Ratio von 3,43 (95%-Konfidenzintervall 1,43 – 8,24) für das zusammengesetzte Outcome aus Mortalität und schwerer Morbidität. Der prädiktive Wert für die Sterblichkeit im Krankenhaus war für die NRBC-Anzahl an Tag d2-5 höher als der des Geburtsgewichts. Die entsprechende *area under the curve* Werte (95% KI) waren 0,87 (0,81–0,93) für NRBC und 0,82 (0,74–0,90) für das Geburtsgewicht. Der optimale Cut-off Wert für NRBC war $2 \times 10^9/l$, welches eine Sensitivität von 83% und eine Spezifität von 75% ergab. 85,4% der Verstorbenen hatten einen NRBC-Wert $> 2 \times 10^9/l$ und 25,9% der Überlebenden. Zusammengefasst ist eine erhöhte NRBC-Anzahl an d2-5 ein unabhängiger Prädiktor für die Mortalität bei VLBW Frühgeborenen.

<https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.06.004>

2.6 Retikulozyten-Hämoglobingehalt und Delta-Hämoglobingehalt

Weimann A, **Cremer M**, Hernáiz-Driever P, Zimmermann M

„Delta-He, Ret-He and a New Diagnostic Plot for Differential Diagnosis and Therapy Monitoring of Patients Suffering from Various Disease-Specific Types of Anemia” Clin Lab. 2016; 62(4):667-77.

Der sogenannte „Häma-Plot“ trägt das Ret-He auf der X-Achse und das Delta-He auf der Y-Achse auf und wird in 9 Quadranten eingeteilt. Der „Thomas Plot“ trägt den Ferritin-Index (Transferrin / Logarithmus Ferritin) auf der Y-Achse gegen das Ret-He auf der X-Achse auf.⁷³ Der Thomas-Plot wird in vier Quadranten eingeteilt. Beide Plots sind hilfreich, die Verfügbarkeit des Eisens unter einer Substitutionstherapie zu überwachen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Ret-He und Delta-He bei 23 gesunden Neugeborenen sowie bei einem Säugling mit alimentären Vitamin B12- und Folsäuremangel gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass bei gesunden Neugeborenen das Delta-He stets negative Werte aufweist (Median: -2 pg, Spannweite: -8 bis 0 pg) und sich somit signifikant von gesunden Erwachsenen unterscheidet. Das Ret-He unterschied sich nicht im Vergleich von gesunden Neugeborenen zu Erwachsenen. Gesunde Neugeborene werden somit im vierten Quadranten des Häma-Plot abgebildet. Bei einem Säugling mit megaloblastärer Anämie konnten serielle Messungen während der Therapie mit Folsäure und Vitamin B12 durchgeführt werden. Bei Diagnosestellung zeigte der Säugling stark positive Delta-He Werten und einen hohen Ret-He Wert. Die Ret-He / Delta-He Werte lagen bei Therapiebeginn im dritten Quadranten des Häma-Plot. Nach 92 Tagen Therapie normalisierten sich die Werte und lagen im fünften Quadranten des Häma-Plot. Im Thomas-Plot lagen die Werte bei Therapiebeginn im zweiten Quadranten. Nach Therapieende normalisierten sich die Werte und lagen im ersten Quadranten.

<https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2015.150830>

3. Diskussion

In unseren Studien haben wir verschiedene Aspekte der neonatalen Thrombozytopenie betrachtet und moderne Messmethoden der voll-automatisierten Fluoreszenz-Durchflusszytometrie in der Analyse des neonatalen Blutbilds angewandt: 1) Messung der IPF zur Verlaufsbeschreibung der Thrombozytopenie, bei der *early*-⁷⁴ und der *late-onset* Thrombozytopenie. 2) Beschreibung von Risikofaktoren der pulmonalen Hämorrhagie bei ELBW Frühgeborenen. 3) Epidemiologische Daten zum Transfusionsverhalten bei neonataler Thrombozytopenie im internationalen Vergleich. 4) Relevanz der NRBC als Marker für Mortalität und Morbidität bei VLBW Frühgeborenen.

Die Ergebnisse der IPF-Messung zeigen insgesamt, dass die Messung bei Früh- und Neugeborenen durchführbar ist und dass die IPF die Bildungsrate der Thrombozyten reflektiert. Diese Schlussfolgerung wird in Analogie zu den Studien von Kienast et al. und Briggs et al. gezogen.^{20, 75} Kienast et al. untersuchten die Anzahl der retikulierten Thrombozyten bei erwachsenen Patienten mit verschiedenen Formen der Thrombozytopenie und korrelierten dies mit der Anzahl der durch Knochenmarkpunktion ermittelten Zahl von Megakaryozyten. Hier konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Megakaryozyten mit der Anzahl der retikulierten Thrombozyten korreliert: Bei einer Thrombozytopenie auf Grund eines gesteigerten Verbrauchs, wie bei der Immunthrombozytopenie, kommt es zu einer Steigerung der retikulierten Thrombozyten. Bei einer Thrombozytopenie als Folge eines Produktionsmangels, beispielsweise nach Chemotherapie, kommt es zu einem Abfall der retikulierten Thrombozyten.²⁰ Im Jahr 2004 etablierten Briggs et al. IPF%-Normwerte für Erwachsene (n=50).⁷⁵ IPF% ist erhöht, wenn ein Thrombozytenverbrauch vorliegt. Im Gegensatz dazu bleibt bei der chemotherapie-induzierten Thrombozytopenie der Anstieg der IPF% aus.⁷⁵ Die Untersuchung der IPF bei Neugeborenen wurde unseres Wissens von unserer Arbeitsgruppe erstmals beschrieben. Bei nicht thrombozytopenischen Neugeborenen in der ersten Lebenswoche (Kontrollgruppe) lag die IPF mit 4,3% (95%-KI 0,7-7,9%) höher als bei Erwachsenen (3,4%; 95%-KI 1,1 – 6,1) und als bei Kindern ($2,7 \pm 1,3\%$),⁷⁶ was eine höhere Bildungsrate von Thrombozyten bei Neugeborenen widerspiegelt. Bisher wurden bei Neugeborenen nur drei Studien mit Messungen der retikulierten Thrombozyten durchgeführt. Die gemessene höhere Bildungsrate wurde auch übereinstimmend in zwei von drei Untersuchungen der retikulierten Thrombozyten bei Neugeborenen gezeigt. In den Studien von Saxonhouse et al. und Joseph et al. wurden höhere prozentuale retikulierte Thrombozyten im Vergleich zu Erwachsenen gemessen.^{77, 78} Bei Peterec et al. waren nur bei Frühgeborenen, nicht aber bei reifen Neugeborenen die retikulierten Thrombozyten erhöht.²¹ Diese Unterschiede könnten auf die eingangs erläuterte unterschiedliche Methodik zurückzuführen sein. Diese Ergebnisse zeigten eine gesteigerte megakaryopoietische Aktivität bei Neugeborenen, wie dies auch die erhöhten Plasma- oder Serumspiegel von Thrombopoietin bei Neugeborenen im Vergleich zu Erwachsenen vermuten lassen.^{79, 80, 81, 82} In unserer ersten Untersuchung zur IPF zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der IPF% und der Thrombozytenzahl. Bei niedriger Thrombozytenzahl steigt der prozentuale Anteil der IPF an. In der

Beobachtung während der ersten Lebenswoche zeigte sich ein Anstieg der IPF ein bis zwei Tage bevor es zu einem Anstieg der Thrombozyten kommt. Bei inadäquater Produktionsrate (IPF% < 8) war das relative Risiko für einen schweren Thrombozytenabfall ca. 8-fach erhöht im Vergleich zu Neugeborenen mit einer IPF% > 8. Da eine Verringerung der IPF mit einer gestörten Megakaryopoiese einhergeht, ist anzunehmen, dass diese Neugeborenen eine inadäquate Megakaryopoiese aufweisen. Sola et. al beschrieben solche Neugeborenen mit Thrombozytopenie, bei denen eine verringerte Anzahl von Megakaryozyten im Knochenmarkpunktat detektiert wurden.⁸³ Bei einer stabilen Abbaurate der Thrombozyten, scheint die IPF geeignet, den Verlauf einer Thrombozytopenie zu antizipieren.

Sepsis und NEC verursachen häufig eine Thrombozytopenie, die im Vergleich zur *early-onset* Thrombozytopenie, öfters zu einer schweren Thrombozytopenie und Thrombozytentransfusion führt.^{2, 15, 84} Bei Patienten mit NEC fielen die Thrombozyten im Vergleich zum Ausgangswert um 74% und bei der Sepsis um 34%. Der stärkere Abfall der Thrombozytenzahl bei der NEC könnte einen höheren Verbrauch bei gleicher Produktionsrate im Vergleich zu den Sepsis-Patienten darstellen. Insbesondere bei Patienten mit hohen Entzündungswerten (CRP und IL-6) zeigte sich allerdings auch eine verringerte IPF, was für eine supprimierte Megakaryopoiese durch die Entzündungsmediatoren sprechen könnte. Die Pathophysiologie der NEC beinhaltet eine Thrombozytenaktivierung mit der Freisetzung des Plättchen-aktivierenden Faktors-4 (PAF-4).⁸⁵ Die Darmentzündung führt zu mikroembolischen Ereignissen mit konsekutiv erhöhtem Thrombozytenbedarf.⁸⁶ Die kapillaren Darmgefäße werden thrombotisch verschlossen. Es kommt zur Freisetzung von PAF-4 aus Thrombozyten während der Thrombusformation. Dieser Faktor supprimiert die Megakaryopoiese in vivo.⁸⁵ Ob eine Thrombozytentransfusion während einer NEC diesen Prozess beschleunigt, ist Gegenstand aktueller Forschung.^{87, 88} Die Ergebnisse zur IPF im Rahmen der *late-onset* Thrombozytopenie zeigten, dass es parallel zum Abfall der Thrombozytenzahl zu einem Abfall der IPF kommt und somit zum Rückgang der Produktionsrate. Insbesondere Patienten mit einer deutlich supprimierten Megakaryopoiese (IPF < $2 \times 10^9/l$) blieb ein Wiederanstieg der Thrombozyten aus. Brown et al. evaluierten die retikulierten Thrombozyten und Thrombopoietin-Konzentration bei Neugeborenen (n=20) mit Sepsis oder NEC und konnten übereinstimmend eine reduzierte Anzahl der retikulierten Thrombozyten messen.⁸⁹ Zeitgleich war die Thrombopoietin-Konzentration erhöht, ohne dass dieser Stimulus für eine Steigerung der Produktion auszureichen scheint.⁸⁹

Eine wesentliche Limitation der IPF-Messung ist, dass mit ihr ausschließlich die Bildungsrate, jedoch nicht die Verbrauchsrate der Thrombozyten gemessen wird. Dies bedeutet, dass eine Vorhersage der Entwicklung der Thrombozytenzahl nur bei einer konstanten Verbrauchsrate möglich ist. Dies ist mit Sicherheit unmöglich bei klinischen Ereignissen während einer *late-onset* Thrombozytopenie. Zu Beginn der *late-onset* Thrombozytopenie kommt es regelmäßig zum raschen Absturz der Thrombozytenzahl, die letztendlich auf Grund dieser Dynamik nur Folge eines

Thrombozytenverbrauchs sein können. Kommt es im Verlauf der Thrombozytopenie zu einem „*steady-state*“ des Thrombozytenverbrauchs und der Bildungsrate, bleibt die Thrombozytenzahl konstant. Ab diesem Moment kann ein Anstieg der IPF einen Anstieg der Thrombozytenzahl vorhersagen. Eine weitere Einschränkung der Interpretation der IPF wurde von Kulshrestha et al. mit Hilfe eines mathematischen Vorhersagemodells bei 27 VLBW Frühgeborenen demonstriert. Die Autoren zeigten, dass während einer Thrombozytopenie die Überlebensdauer sowohl der Thrombozyten als auch der IPF reduziert ist.⁹⁰ Des Weiteren zeigte sich im tierexperimentellen Modell, dass der Anstieg der Thrombozytenmasse in den ersten beiden Lebenswochen auf einer konstanten Produktionsrate in Kombination mit einer verlängerten Überlebensdauer der Thrombozyten bei neonatalen Mäusen im Vergleich zu adulten Tieren beruht.⁹¹

Aus den genannten Untersuchungen und aus den Ergebnissen der eigenen Arbeiten könnten sich neue Konzepte für klinische Studien ergeben. So könnte bei der Frage nach der Indikationsstellung zur Thrombozytentransfusion die Bildungsrate (IPF) miteinbezogen werden.

Unsere epidemiologische Studie zum Transfusionsverhalten von US Neonatologen im Vergleich zu AUT/SUI/GER Neonatologen zeigte, dass die US Neonatologen eindeutig höhere Transfusionsgrenzen bei Neugeborenen ansetzen als ihre europäischen Kollegen. Unklar ist allerdings, wie die Unterschiede zu Stande kommen. Besonders groß waren die Unterschiede beim Transfusionsverhalten in der ersten Lebenswoche bei VLBW Frühgeborenen. Bei diesem Patientenkollektiv existiert die höchste Inzidenz der IVH, die in der ersten Lebenswoche abläuft. Möglicherweise wählten die US Neonatologen liberale Transfusionsgrenzen in der Annahme, so eine IVH verhindern zu können. Eine Evidenz zu prophylaktischen Thrombozytentransfusion bei einer Thrombozytenzahl $> 50.000 \times 10^9/l$ ist allerdings nicht gegeben.⁵⁶ Die Umfrage zeigte außerdem, dass insbesondere in den US häufig bei einer Thrombozytenzahl zwischen 50 und $100 \times 10^9/l$ transfundiert wird. Eine liberale Transfusionsgrenze führt zu einer häufigeren Thrombozytentransfusion. Die klinische Konsequenz einer häufigeren Thrombozytentransfusion ist allerdings unklar.^{92, 93, 94} Ob eine Transfusion bei höheren Grenzwerten eine schwere Hämorrhagie verhindert, ist nicht bewiesen.⁵⁶ In Ermangelung von randomisiert kontrollierten Studien kann diese Frage nur teilweise beantwortet werden. In einer retrospektiven Beobachtungsstudie untersuchten von Lindern et al. die IVH-Inzidenz in zwei holländischen Zentren mit unterschiedlichen Transfusionsrichtlinien.⁹⁵ Hierbei wurde eine ähnliche IVH-Inzidenz unabhängig von der Transfusionsgrenze beschrieben.⁹⁵ Bei fehlendem klinischem Nutzen resultieren aus einer Transfusion jedoch die Exposition zu adulten Blutprodukten und Kosten. Die Ergebnisse der gegenwärtig durchgeführten PlaNet-2-Studie werden sicherlich wichtig sein, um eine Transfusionsgrenze zu ermitteln.⁹⁶ In dieser Studie werden 660 Frühgeborene mit einem Gestationsalter < 34 SSW in zwei Gruppen randomisiert (Transfusionsgrenze < 25 versus $< 50 \times 10^9/l$) und hinsichtlich dem Auftreten von Blutungsereignisse nachverfolgt.⁹⁶

Bemerkenswert waren die weniger großen Unterschiede beim Transfusionsverhalten bei

reifen Neugeborenen mit Allo-Immunthrombozytopenie. Sowohl die US als auch die AUT/GER/SUI Neonatologen wählten im Median $30 \times 10^9/l$ als Transfusionsgrenze. Dies könnte durch das Vorliegen von Studien mit größerer Patientenzahl mit AITP liegen, auch wenn diese Studien nicht auf randomisierten Ergebnissen beruhen.⁹⁷ Aus der klinischen Erfahrung resultieren internationale Empfehlungen für eine Thrombozytentransfusion bei AITP vom $< 30 \times 10^9/l$. Diese ist häufig in der Literatur zitiert, was eine höhere Adhärenz an die Empfehlung bewirken könnte.⁹⁸

Bei der Befragung wurde nach einem hypothetischen Handeln gefragt. Ob die tatsächliche klinische Entscheidung mit der Antwort im Fragebogen übereinstimmt, kann nicht beantwortet werden. Eine weitere Einschränkung der Dateninterpretation ergibt sich wie bei jeder Umfrage aus der Rücklaufquote bzw. dem Antwortausfall. Bei Umfrage der US Neonatologen lag die Antwortrate nur bei 37%, bei den Neonatologen in AUT/GER/SUI bei 67%. Auf Grund der großen Anzahl der US Neonatologen (n=1001), die geantwortet haben, gehen wir allerdings von einer soliden Datenbasis aus. Es ist anzunehmen, dass auch die klinische Erfahrung des Arztes, die Entscheidung zur Transfusionsgrenze beeinflusst. Da der Erfahrungsgrad der Neonatologen in keiner der beiden Umfragen erfragt wurde, konnte dies allerdings nicht berücksichtigt werden.

Die pulmonale Hämorrhagie ist ein seltenes Ereignis bei Frühgeborenen. In unserer Studien lag die Inzidenz bei 2,6 von 100 ELBW Frühgeborenen und damit im ähnlichen Bereich wie bei bisher publizierten Untersuchungen.^{58, 59} Sicherlich ist das retrospektive Studiendesign nicht geeignet, einzelne Risikofaktoren zu identifizieren. Vielmehr sollte in dieser Kohortenstudie versucht werden, einen Zusammenhang zwischen der Thrombozytenzahl, den Ergebnissen der Gerinnungsanalyse und der Transfusion von TKs und FFPs vor Eintreten der Lungenblutung herzustellen. Es konnte gezeigt werden, dass die aPTT am ersten Lebenstag im Vergleich zur Kontrollgruppe verlängert war. Dies könnte die häufigere Transfusion von FFPs bei Patienten mit späterer Lungenblutung erklären. Während die Thrombozytenzahl am ersten Lebenstag in beiden Gruppen nicht unterschiedlich war, war die Thrombozytenzahl zum Zeitpunkt der Lungenblutung signifikant niedriger. Zu diesem Zeitpunkt könnte bereits ein Thrombozytenverbrauch im Lungenparenchym während der akuten Hämorrhagie stattgefunden haben. Bemerkenswerterweise war, dass nur 10 % der Patienten mit Lungenblutung eine schwere Thrombozytopenie aufwiesen im Vergleich zu 7,5% der Kontrollpatienten. In Studienergebnissen aus der PlaNet 1-Studie zeigten der 9% der Patienten mit einer Thrombozytenzahl $< 60 \times 10^9/l$ eine schwere Hämorrhagie.⁴⁴

Patienten mit einer Lungenblutung erhielten häufiger FFP im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der logistischen Regression konnte die Transfusion von FFP, eine fehlende Lungenreifeinduktion und der Sauerstoffbedarf bei Aufnahme auf die Intensivstation als unabhängige Risikofaktoren für eine Lungenblutung identifiziert werden. Die höhere Transfusionsrate von FFP könnte möglicherweise mit einer klinischen Instabilität erklärt werden, allerdings spiegelte sich dies nicht im standardisierten Risikoindex CRIB-Score, Beatmungsform, Surfactanttherapie oder Inzidenz der *early-onset* Infektion wider. Die Wirksamkeit einer FFP-Transfusion bei Frühgeborenen zur

Vermeidung einer IVH wurde in einer großangelegten randomisierten Multizenter-Studie untersucht.^{99, 100} 776 Frühgeborene < 32 SSW wurden in zwei Gruppen randomisiert: Die erste Gruppe erhielt eine FFP Transfusion, die zweite Gruppe eine Infusion mit kolloidalem Volumenersatzmittel. Der primäre Endpunkt war Tod oder ein schlechtes neurologisches Outcome nach zwei Jahren, wobei kein Unterschied zwischen den Gruppen bestand.^{99, 100} In einem *in vitro* Experiment konnte ein negativer Effekt von FFP, welches von erwachsenen Blutspenden stammt, auf die Funktion von neonatalen Thrombozyten gezeigt werden. Es kam zu längeren Clotting-Zeiten, die möglicherweise eine Blutungsneigung fördern.¹⁰¹

Zusammengefasst lässt sich nicht sagen, ob eine pathologische Gerinnungsanalyse oder die Transfusion von FFP ursächlich für die Lungenblutung sind. Eine schwere Thrombozytopenie trat nicht häufiger bei Patienten mit Lungenblutung auf.

Die Untersuchungen zu NRBC als Marker für ein ungünstiges Outcome zeigten zwei wesentliche Ergebnisse: Die Konzentration der NRBC zwischen der 24-120 Lebensstunde kann als Surrogat-Marker für das spätere klinische Outcome dienen und eine persistierende Erhöhung der NRBC bei hypotrophen (SGA) VLBW Frühgeborenen deutet auf eine ungünstige Prognose. Wie in unserer Untersuchung wurde in vorherigen Studien bereits der enge Zusammenhang zwischen der NRBC-Konzentration und dem Outcome beschrieben, allerdings wurde hier die licht-mikroskopisch Zählung im Blutaussstrich verwendet. Kil et al. zeigten bei 112 VLBW Frühgeborenen eine Korrelation zwischen der NRBC-Konzentration nach Geburt bzw. am siebten Lebenstag und der perinatalen Mortalität.¹⁰² Baschat et al. untersuchten die NRBC-Konzentration ausschließlich bei SGA Frühgeborenen (n=172).¹⁰³ Hier lag der Grenzwert bei > 70 NRBC / 100 Leukozyten zur Prädiktion einer schweren Morbidität und damit deutlich höher als in unserer Untersuchung (> 2 NRBC × 10⁹/l). Der Unterschied könnte durch die unterschiedlichen Messmethoden erklärt werden. Prinzipiell kann die NRBC Konzentration durch manuelles Auszählen der NRBC im Blutaussstrich erfolgen, oder es wird die automatisierte Methode angewandt. Bei der manuellen Methode erfolgt der Bezug analog zum Differentialblutbild pro 100 ausgezählte Leukozyten. Durch starke Schwankungen der Leukozytenzahl in den ersten Lebenstagen ist diese Methode weniger präzise als die automatisierte Methode. Moderne hämatologische Analyseautomaten der Hersteller Abbott, Beckman-Coulter, Siemens Health Care oder Sysmex bieten die direkte Messung der NRBC durch Fluoreszenz-Flowzytometrie an. Gerade im Bereich niedriger NRBC Konzentrationen weist diese Methode eine höhere Genauigkeit im Vergleich zur mikroskopischen Methoden auf,¹⁰⁴ weil ein unter anderem Vielfaches an Zellen analysiert wird.

Wichtig bei der Untersuchung der NRBC ist die Untersuchung zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Geburt. Die NRBC-Konzentration unmittelbar nach der Geburt spiegelt eher die intrauterine Sauerstoffversorgung wider, während die später postnatal gewonnenen Proben den klinischen Verlauf der ersten Lebensstage reflektieren. Geschätzt wird, dass es im Neugeborenenalter mit einer Zeitverzögerung von ca. 30 Minuten nach einem hypoxischen Ereignis zu einem Anstieg der NRBC-

Konzentration im peripheren Blut kommt.²⁸ Im tierexperimentellen Modell zeigte sich hingegen ein Anstieg der NRBC-Konzentration nach 6 bis 12 Stunden.¹⁰⁵ Bei erwachsenen Patienten, die auf einer Intensivstation behandelt werden, und NRBC im peripheren Blut aufweisen, zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem Sauerstoffpartialdruck, der Erythropoietin-Konzentration und der Höhe der NRBC-Konzentration.¹⁰⁶ Daher gehen wir davon aus, dass die Erhöhung der NRBC-Konzentration bei VLBW Frühgeborenen mit einem ungünstigen Outcome das Resultat rezidivierender hypoxischer Perioden ist.

Die Messung von Retikulozyten-Indices bietet eine Möglichkeit, in einer einzigen EDTA-Blutprobe zusammen mit der Routineanalyse des Blutbildes Einblicke in die Erythropoiese zu nehmen. Bei Früh- und Neugeborenen findet allerdings gestationsalterabhängig die Umstellung der Hämoglobinbildung von fetalem zu adultem Hämoglobin statt. Daher sind auch die Referenzwerte für die Ret-He Konzentration in den ersten 90 Lebenstagen sehr unterschiedlich.⁴² Dies erschwert die Bewertung vor allem des Ret-He als Verlaufsparemeter zur Messung des Eisenstoffwechsels.^{107, 108} In unserer Untersuchung zeigten alle Neugeborenen negative Werte für das Delta-He. Die Ursache hierfür ist bisher nicht hinreichend geklärt. Wahrscheinlich ist hier auch die Umstellung der Erythropoiese von fetalem Hämoglobin zu adultem Hämoglobin. Dies könnte zu einer quantitativ niedrigeren Hämoglobinisierung der neugebildeten Retikulozyten im Vergleich zu reifen Erythrozyten führen. Dies würde die negativen Werte bei gesunden Neugeborenen erklären.

4. Zusammenfassung

Trotz der hohen Inzidenz der Thrombozytopenie auf einer Neugeborenen-Intensivstation sind Pathophysiologie, Blutungsrisiko sowie die Transfusionsgrenze nicht geklärt. Durch die Anwendung der fluoreszenz-durchflusszytometrischen IPF-Messung konnte sowohl bei der *early-* als auch bei der *late-onset* Thrombozytopenie gezeigt werden, dass die Produktionsrate gesteigert werden kann. Im Falle einer schweren Thrombozytopenie ist sie jedoch vermindert. Daher ist davon auszugehen, dass die Ursache ein Thrombozytenverbrauch ist, der durch eine Produktionsstörung verstärkt werden kann. Bei der meist mild verlaufenden *early-onset* Thrombozytopenie ist es anhand der IPF möglich, den Anstieg der Thrombozyten zu antizipieren.

Bei der Untersuchung zur Lungenblutung lag die mediane Thrombozytenzahl zwar niedriger als bei der Kontrollgruppe, die Inzidenz der schweren Thrombozytopenie hingegen war gleich. Andere Faktoren hingegen waren mit der Lungenblutung assoziiert (verlängerte aPTT, FFP Transfusion, fehlende Lungenreifeinduktion, höherer Sauerstoffbedarf). Somit scheint auch bei dieser Krankheitsentität so zu sein, dass andere Faktoren als die Thrombozytenzahl das Blutungsrisiko determinieren.

Im internationalen Vergleich zum Transfusionsverhalten bei neonataler Thrombozytopenie waren die angegebenen Transfusionsgrenzen sehr heterogen. In den US lag die mediane Transfusionsgrenze in den fast allen Fällen höher als im europäischen Vergleich (AUT/GER/SUI). Bei fehlender Evidenz, dass liberale Transfusionsgrenzen zu einem klinischen Benefit führen, ergibt dies eine geschätzt 1,8fach erhöhte Transfusionsrate bei klinisch stabilen Frühgeborenen ohne Blutung in den US.

Als weitere fluoreszenz-durchflusszytometrischen Methode wurde die NRBC Messung bei VLBW Frühgeborenen in den ersten Lebenstagen und bei Patienten mit Sepsis/NEC durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode konnte gezeigt werden, dass Veränderungen im Verlauf der NRBC-Konzentration mit einem ungünstigen Outcome assoziiert sind.

Die Messung der Retikulozyten-Indices, insbesondere das Delta-He, ist in der Neonatologie bisher nicht etabliert, könnte aber interessantes Werkzeug in der Anämiediagnostik in Zukunft werden.

Insgesamt zeigten die Studien, dass mit Hilfe der modernen voll-automatisierten Blutbildanalyse rund um die Uhr zusätzliche Informationen gewonnen werden, die das ärztliche Verhalten beeinflussen können. Die Messung der IPF könnte zukünftig in Zusammenhang mit der Thrombozytenzahl und klinischen Risikofaktoren Einfluss auf die Transfusionsindikation haben.

5. Literaturangaben

1. Bonifacio L, Petrova A, Nanjundaswamy S, Mehta R. Thrombocytopenia related neonatal outcome in preterms. *Indian J Pediatr* 2007, **74**(3): 269-274.
2. Sola-Visner M, Saxonhouse MA, Brown RE. Neonatal thrombocytopenia: what we do and don't know. *Early Hum Dev* 2008, **84**(8): 499-506.
3. Christensen RD, Henry E, Wiedmeier SE, Stoddard RA, Sola-Visner MC, Lambert DK, *et al.* Thrombocytopenia among extremely low birth weight neonates: data from a multihospital healthcare system. *J Perinatol* 2006, **26**(6): 348-353.
4. Castle V, Andrew M, Kelton J, Giron D, Johnston M, Carter C. Frequency and mechanism of neonatal thrombocytopenia. *J Pediatr* 1986, **108**(5): 749-755.
5. Mehta P, Vasa R, Neumann L, Karpatkin M. Thrombocytopenia in the high-risk infant. *J Pediatr* 1980, **97**(5): 791-794.
6. Wiedmeier SE, Henry E, Sola-Visner MC, Christensen RD. Platelet reference ranges for neonates, defined using data from over 47,000 patients in a multihospital healthcare system. *J Perinatol* 2009, **29**(2): 130-136.
7. Andrew M, Castle V, Saigal S, Carter C, Kelton JG. Clinical impact of neonatal thrombocytopenia. *J Pediatr* 1987, **110**(3): 457-464.
8. Murray NA, Howarth LJ, McCloy MP, Letsky EA, Roberts IA. Platelet transfusion in the management of severe thrombocytopenia in neonatal intensive care unit patients. *Transfus Med* 2002, **12**(1): 35-41.
9. Van den Hof MC, Nicolaidis KH. Platelet count in normal, small, and anemic fetuses. *Am J Obstet Gynecol* 1990, **162**(3): 735-739.
10. Sola MC. Evaluation and treatment of severe and prolonged thrombocytopenia in neonates. *Clinics in Perinatology* 2004, **31**(1): 1-14.
11. Dame C. Thrombozytopenien des Neugeborenen, Pädiatrische Hämatologie und Onkologie Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J., Springer Medizin Verlag: Heidelberg, 2006, pp S 290-302.
12. Thilaganathan B, Athanasiou S, Ozmen S, Creighton S, Watson NR, Nicolaidis KH. Umbilical cord blood erythroblast count as an index of intrauterine hypoxia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1994, **70**(3): F192-194.
13. Murray NA, Roberts IA. Circulating megakaryocytes and their progenitors in early thrombocytopenia in preterm neonates. *Pediatr Res* 1996, **40**(1): 112-119.
14. Murray NA. Evaluation and treatment of thrombocytopenia in the neonatal intensive care unit. *Acta Paediatr Suppl* 2002, **91**(438): 74-81.
15. Roberts I, Murray NA. Neonatal thrombocytopenia: causes and management. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003, **88**(5): F359-F364.
16. Hohlfeld P, Forestier F, Kaplan C, Tissot JD, Daffos F. Fetal thrombocytopenia: a retrospective survey of 5,194 fetal blood samplings. *Blood* 1994, **84**: 1851-1856.
17. Kling PJ, Hutter JJ. Hematologic abnormalities in severe neonatal necrotizing enterocolitis: 25 years later. *J Perinatol* 2003, **23**(7): 523-530.

18. Roberts I, Murray NA. Neonatal thrombocytopenia: causes and management. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003, **88**(5): F359-364.
19. Ingram M, Coopersmith A. Reticulated platelets following acute blood loss. *Br J Haematol* 1969, **17**(3): 225-229.
20. Kienast J, Schmitz G. Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood* 1990, **75**(1): 116-121.
21. Peterec SM, Brennan SA, Rinder HM, Wnek JL, Beardsley DS. Reticulated platelet values in normal and thrombocytopenic neonates. *J Pediatr* 1996, **129**(2): 269-274.
22. Saxonhouse MA, Sola MC, Pastos KM, Ignatz ME, Hutson AD, Christensen RD, *et al.* Reticulated platelet percentages in term and preterm neonates. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004, **26**(12): 797-802.
23. Joseph MA, Adams D, Maragos J, Saving KL. Flow cytometry of neonatal platelet RNA. *J Pediatr Hematol Oncol* 1996, **18**(3): 277-281.
24. Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2004, **126**(1): 93-99.
25. Perrone S, Vezzosi P, Longini M, Marzocchi B, Tanganelli D, Testa M, *et al.* Nucleated red blood cell count in term and preterm newborns: reference values at birth. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2005, **90**(2): F174-175.
26. Buonocore G, Perrone S, Gioia D, Gatti MG, Massafra C, Agosta R, *et al.* Nucleated red blood cell count at birth as an index of perinatal brain damage. *Am J Obstet Gynecol* 1999, **181**(6): 1500-1505.
27. Ferber A, Fridel Z, Weissmann-Brenner A, Minior VK, Divon MY. Are elevated fetal nucleated red blood cell counts an indirect reflection of enhanced erythropoietin activity? *Am J Obstet Gynecol* 2004, **190**(5): 1473-1475.
28. Christensen RD, Lambert DK, Richards DS. Estimating the nucleated red blood cell 'emergence time' in neonates. *J Perinatol* 2014, **34**(2): 116-119.
29. Ghosh B, Mittal S, Kumar S, Dadhwal V. Prediction of perinatal asphyxia with nucleated red blood cells in cord blood of newborns. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* 2003, **81**(3): 267-271.
30. Stachon A, Segbers E, Holland-Letz T, Kempf R, Hering S, Krieg M. Nucleated red blood cells in the blood of medical intensive care patients indicate increased mortality risk: a prospective cohort study. *Crit Care* 2007, **11**(3): R62.
31. Stachon A, Becker A, Kempf R, Holland-Letz T, Friese J, Krieg M. Re-evaluation of established risk scores by measurement of nucleated red blood cells in blood of surgical intensive care patients. *J Trauma* 2008, **65**(3): 666-673.
32. Briggs C, Harrison P, Grant D, Staves J, Machin SJ. New quantitative parameters on a recently introduced automated blood cell counter--the XE 2100. *Clinical and laboratory haematology* 2000, **22**(6): 345-350.
33. Ullrich C, Wu A, Armsby C, Rieber S, Wingerter S, Brugnara C, *et al.* Screening healthy infants for iron deficiency using reticulocyte hemoglobin content. *JAMA : the journal of the*

American Medical Association 2005, **294**(8): 924-930.

34. Teixeira C, Barbot J, Freitas MI. Reference values for reticulocyte parameters and hypochromic RBC in healthy children. *Int J Lab Hematol* 2015, **37**(5): 626-630.
35. Miwa N, Akiba T, Kimata N, Hamaguchi Y, Arakawa Y, Tamura T, *et al.* Usefulness of measuring reticulocyte hemoglobin equivalent in the management of haemodialysis patients with iron deficiency. *Int J Lab Hematol* 2010, **32**(2): 248-255.
36. Ceylan C, Miskioglu M, Colak H, Kiliccioğlu B, Ozdemir E. Evaluation of reticulocyte parameters in iron deficiency, vitamin B(12) deficiency and beta-thalassemia minor patients. *Int J Lab Hematol* 2007, **29**(5): 327-334.
37. Mast AE, Blinder MA, Dietzen DJ. Reticulocyte hemoglobin content. *Am J Hematol* 2008, **83**(4): 307-310.
38. Punnonen K, Irjala K, Rajamaki A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 1997, **89**(3): 1052-1057.
39. Thomas C, Kobold U, Balan S, Roeddiger R, Thomas L. Serum hepcidin-25 may replace the ferritin index in the Thomas plot in assessing iron status in anemic patients. *Int J Lab Hematol* 2011, **33**(2): 187-193.
40. Hoffmann C, Hoffmann P, Zimmermann M. Diagnostic testing for a high-grade inflammation: parameter dynamics and novel markers. *Clin Chem Lab Med* 2015, **53**(4): 541-547.
41. Danielson K, Beshara S, Qureshi AR, Heimbürger O, Lindholm B, Hansson M, *et al.* Delta-He: a novel marker of inflammation predicting mortality and ESA response in peritoneal dialysis patients. *Clin Kidney J* 2014, **7**(3): 275-281.
42. Christensen RD, Henry E, Bennett ST, Yaish HM. Reference intervals for reticulocyte parameters of infants during their first 90 days after birth. *J Perinatol* 2016, **36**(1): 61-66.
43. Stanworth S, Ballard S, Casbard A, Murphy M, Roberts I, Murray N. A multi-centre prospective observational study of platelet transfusion practice in neonates with severe thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2007, **137**: 35-36.
44. Stanworth SJ, Clarke P, Watts T, Ballard S, Choo L, Morris T, *et al.* Prospective, observational study of outcomes in neonates with severe thrombocytopenia. *Pediatrics* 2009, **124**(5): e826-834.
45. Dohner ML, Wiedmeier SE, Stoddard RA, Null D, Jr., Lambert DK, Burnett J, *et al.* Very high users of platelet transfusions in the neonatal intensive care unit. *Transfusion* 2009, **49**(5): 869-872.
46. Papile LA, Burstein J, Burstein R, Koffler H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm. *J Pediatr* 1978, **92**(4): 529-534.
47. Kahn DJ, Richardson DK, Billett HH. Association of thrombocytopenia and delivery method with intraventricular hemorrhage among very-low-birth-weight-infants. *Am J Obstet Gynecol* 2002, **186**(1): 109-116.
48. Lupton BA, Hill A, Whitfield MF, Carter CJ, Wadsworth LD, Roland EH. Reduced platelet count as a risk factor for intraventricular hemorrhage. *American journal of diseases of children (1960)* 1988, **142**(11): 1222-1224.

49. McCall EM, Alderdice FA, Halliday HL, Jenkins JG, Vohra S. Interventions to prevent hypothermia at birth in preterm and/or low birthweight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2008(1): CD004210.
50. Heuchan AM, Evans N, Henderson Smart DJ, Simpson JM. Perinatal risk factors for major intraventricular haemorrhage in the Australian and New Zealand Neonatal Network, 1995-97. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2002, **86**(2): F86-90.
51. Leduc L, Takser L, Rinfret D. Persistence of adverse obstetric and neonatal outcomes in monozygotic twins after exclusion of disorders unique to monozygotic placentation. *Am J Obstet Gynecol* 2005, **193**(5): 1670-1675.
52. Kassal R, Anwar M, Kashlan F, Smulian J, Hiatt M, Hegyi T. Umbilical vein interleukin-6 levels in very low birth weight infants developing intraventricular hemorrhage. *Brain & development* 2005, **27**(7): 483-487.
53. Heep A, Behrendt D, Nitsch P, Fimmers R, Bartmann P, Dembinski J. Increased serum levels of interleukin 6 are associated with severe intraventricular haemorrhage in extremely premature infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003, **88**(6): F501-504.
54. Levene MI, Fawer CL, Lamont RF. Risk factors in the development of intraventricular haemorrhage in the preterm neonate. *Arch Dis Child* 1982, **57**(6): 410-417.
55. Beaino G, Khoshnood B, Kaminski M, Pierrat V, Marret S, Matis J, *et al.* Predictors of cerebral palsy in very preterm infants: the EPIPAGE prospective population-based cohort study. *Dev Med Child Neurol* 2010, **52**(6): e119-125.
56. Andrew M, Vegh P, Caco C, Kirpalani H, Jefferies A, Ohlsson A, *et al.* A randomized, controlled trial of platelet transfusions in thrombocytopenic premature infants. *J Pediatr* 1993, **123**(2): 285-291.
57. Abou Zahr R, Ashfaq A, Marron-Corwin M. Neonatal Pulmonary Hemorrhage. *Neo Reviews* 2012, **13**(5): e302-306.
58. Alfaleh K, Smyth JA, Roberts RS, Solimano A, Asztalos EV, Schmidt B, *et al.* Prevention and 18-month outcomes of serious pulmonary hemorrhage in extremely low birth weight infants: results from the trial of indomethacin prophylaxis in preterms. *Pediatrics* 2008, **121**(2): e233-238.
59. Scholl JE, Yanowitz TD. Pulmonary hemorrhage in very low birth weight infants: a case-control analysis. *J Pediatr* 2015, **166**(4): 1083-1084.
60. Berger TM, Allred EN, Van Marter LJ. Antecedents of clinically significant pulmonary hemorrhage among newborn infants. *J Perinatol* 2000, **20**(5): 295-300.
61. Roberts I, Murray NA. Neonatal thrombocytopenia. *Semin Fetal Neonatal Med* 2008, **13**(4): 256-264.
62. Josephson CD, Su LL, Christensen RD, Hillyer CD, Castillejo MI, Emory MR, *et al.* Platelet transfusion practices among neonatologists in the United States and Canada: results of a survey. *Pediatrics* 2009, **123**(1): 278-285.
63. Roberts IA, Murray NA. Management of thrombocytopenia in neonates. *Br J Haematol* 1999, **105**(4): 864-870.
64. Gibson BE, Todd A, Roberts I, Pamphilon D, Rodeck C, Bolton-Maggs P, *et al.* Transfusion guidelines for neonates and older children. *Br J Haematol* 2004, **124**(4): 433-453.

65. Ebell W, Lode, H, Gaedicke, G, Dame, C. Strategien zur Behandlung von Thrombozytopenien im Kindesalter. *Monatsschr Kinderheilkd* 2006, **156**(6): 540-549.
66. Strauss RG. How I transfuse red blood cells and platelets to infants with the anemia and thrombocytopenia of prematurity. *Transfusion* 2008, **48**(2): 209-217.
67. Bussel J. Diagnosis and management of the fetus and neonate with alloimmune thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 2009, **7 Suppl 1**: 253-257.
68. Carr R, Kelly AM, Williamson LM. Neonatal thrombocytopenia and platelet transfusion - a UK perspective. *Neonatology* 2015, **107**(1): 1-7.
69. Sola-Visner M, Bercovitz RS. Neonatal Platelet Transfusions and Future Areas of Research. *Transfusion medicine reviews* 2016, **30**(4): 183-188.
70. Christensen RD, Carroll PD, Josephson CD. Evidence-based advances in transfusion practice in neonatal intensive care units. *Neonatology* 2014, **106**(3): 245-253.
71. Christensen RD, Paul DA, Sola-Visner MC, Baer VL. Improving platelet transfusion practices in the neonatal intensive care unit. *Transfusion* 2008, **48**(11): 2281-2284.
72. Briggs C, Harrison P, Machin SJ. Continuing developments with the automated platelet count. *Int J Lab Hematol* 2007, **29**(2): 77-91.
73. Thomas C, Thomas L. Anemia of chronic disease: pathophysiology and laboratory diagnosis. *Lab Hematol* 2005, **11**(1): 14-23.
74. Cremer M, Weimann A, Schmalisch G, Hammer H, Buhner C, Dame C. Immature platelet values indicate impaired megakaryopoietic activity in neonatal early-onset thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 2010, **103**(5): 1016-1021.
75. Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2004, **126**(1): 93-99.
76. Strauss G, Vollert C, von Stackelberg A, Weimann A, Gaedicke G, Schulze H. Immature platelet count: a simple parameter for distinguishing thrombocytopenia in pediatric acute lymphocytic leukemia from immune thrombocytopenia. *Pediatr Blood Cancer* 2011, **57**(4): 641-647.
77. Saxonhouse MA, Sola MC, Pastos KM, Ignatz ME, Hutson AD, Christensen RD, *et al.* Reticulated platelet percentages in term and preterm neonates. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004, **26**(12): 797-802.
78. Joseph MA, Adams D, Maragos J, Saving KL. Flow cytometry of neonatal platelet RNA. *J Pediatr Hematol Oncol* 1996, **18**(3): 277-281.
79. Sola MC, Calhoun DA, Hutson AD, Christensen RD. Plasma thrombopoietin concentrations in thrombocytopenic and non-thrombocytopenic patients in a neonatal intensive care unit. *Br J Haematol* 1999, **104**: 90-92.
80. Cremer M, Dame C, Schaeffer HJ, Giers G, Bartmann P, Bald R. Longitudinal thrombopoietin plasma concentrations in fetuses with alloimmune thrombocytopenia treated with intrauterine PLT transfusions. *Transfusion* 2003, **43**(9): 1216-1222.
81. Dame C. Developmental biology of thrombopoietin in the human fetus and neonate. *Acta Paediatr Suppl* 2002, **91**(438): 54-65.

82. Murray NA, Watts TL, Roberts IA. Endogenous thrombopoietin levels and effect of recombinant human thrombopoietin on megakaryocyte precursors in term and preterm babies. *Pediatr Res* 1998, **43**(1): 148-151.
83. Sola MC, Calhoun DA, Hutson AD, Christensen RD. Plasma thrombopoietin concentrations in thrombocytopenic and non-thrombocytopenic patients in a neonatal intensive care unit. *Br J Haematol* 1999, **104**(1): 90-92.
84. Chakravorty S, Murray N, Roberts I. Neonatal thrombocytopenia. *Early HumDev* 2005, **81**(1): 35-41.
85. Lambert MP, Rauova L, Bailey M, Sola-Visner MC, Kowalska MA, Poncz M. Platelet factor 4 is a negative autocrine in vivo regulator of megakaryopoiesis: clinical and therapeutic implications. *Blood* 2007, **110**(4): 1153-1160.
86. Hyman PE, Abrams CE, Zipser RD. Enhanced urinary immunoreactive thromboxane in neonatal necrotizing enterocolitis. A diagnostic indicator of thrombotic activity. *American journal of diseases of children (1960)* 1987, **141**(6): 686-689.
87. Baer VL, Lambert DK, Henry E, Christensen RD. Severe thrombocytopenia in the NICU. *Pediatrics* 2009, **124**(6): e1095-1100.
88. Christensen RD, Lambert DK, Henry E, Wiedmeier SE, Snow GL, Baer VL, *et al.* Is "transfusion-associated necrotizing enterocolitis" an authentic pathogenic entity? *Transfusion* 2010, **50**(5): 1106-1112.
89. Brown RE, Rimsza LM, Pastos K, Young L, Saxonhouse MA, Bailey M, *et al.* Effects of sepsis on neonatal thrombopoiesis. *Pediatr Res* 2008, **64**(4): 399-404.
90. Kulshrestha M, Sola-Visner M, Widness JA, Veng-Pedersen P, Mager DE. Mathematical model of platelet turnover in thrombocytopenic and nonthrombocytopenic preterm neonates. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015, **308**(1): H68-73.
91. Liu ZJ, Hoffmeister KM, Hu Z, Mager DE, Ait-Oudhia S, Debrincat MA, *et al.* Expansion of the neonatal platelet mass is achieved via an extension of platelet lifespan. *Blood* 2014, **123**(22): 3381-3389.
92. Del Vecchio A, Sola MC, Theriaque DW, Hutson AD, Kao KJ, Wright D, *et al.* Platelet transfusions in the neonatal intensive care unit: factors predicting which patients will require multiple transfusions. *Transfusion* 2001, **41**(6): 803-808.
93. Baer VL, Lambert DK, Henry E, Snow GL, Sola-Visner MC, Christensen RD. Do platelet transfusions in the NICU adversely affect survival? Analysis of 1600 thrombocytopenic neonates in a multihospital healthcare system. *J Perinatol* 2007, **27**(12): 790-796.
94. Garcia MG, Duenas E, Sola MC, Hutson AD, Theriaque D, Christensen RD. Epidemiologic and outcome studies of patients who received platelet transfusions in the neonatal intensive care unit. *J Perinatol* 2001, **21**(7): 415-420.
95. von Lindern JS, Hulzebos CV, Bos AF, Brand A, Walther FJ, Lopriore E. Thrombocytopenia and intraventricular haemorrhage in very premature infants: a tale of two cities. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2012, **97**(5): F348-352.
96. Curley A, Venkatesh V, Stanworth S, Clarke P, Watts T, New H, *et al.* Platelets for neonatal transfusion - study 2: a randomised controlled trial to compare two different platelet count thresholds for prophylactic platelet transfusion to preterm neonates. *Neonatology* 2014,

106(2): 102-106.

97. Bussel JB, Sola-Visner M. Current approaches to the evaluation and management of the fetus and neonate with immune thrombocytopenia. *Semin Perinatol* 2009, **33(1)**: 35-42.
98. Motta M, Testa M, Tripodi G, Radicioni M. Changes in neonatal transfusion practice after dissemination of neonatal recommendations. *Pediatrics* 2010, **125(4)**: e810-817.
99. Bellido T, Stahl N, Farruggella TJ, Borba V, Yancopoulos GD, Manolagas SC. Detection of Receptors for Interleukin-6, Interleukin-11, Leukemia Inhibitory Factor, Oncostatin M, and Ciliary Neurotrophic Factor in Bone Marrow Stromal / Osteoblastic Cells. *J Clin Invest* 1996, **97(2)**: 431-437.
100. A randomized trial comparing the effect of prophylactic intravenous fresh frozen plasma, gelatin or glucose on early mortality and morbidity in preterm babies. The Northern Neonatal Nursing Initiative [NNNI] Trial Group. *Eur J Pediatr* 1996, **155(7)**: 580-588.
101. Ferrer-Marin F, Chavda C, Lampa M, Michelson AD, Frelinger AL, 3rd, Sola-Visner M. Effects of in vitro adult platelet transfusions on neonatal hemostasis. *J Thromb Haemost* 2011, **9(5)**: 1020-1028.
102. Kil TH, Han JY, Kim JB, Ko GO, Lee YH, Kim KY, *et al.* A study on the measurement of the nucleated red blood cell (nRBC) count based on birth weight and its correlation with perinatal prognosis in infants with very low birth weights. *Korean J Pediatr* 2011, **54(2)**: 69-78.
103. Baschat AA, Gungor S, Kush ML, Berg C, Gembruch U, Harman CR. Nucleated red blood cell counts in the first week of life: a critical appraisal of relationships with perinatal outcome in preterm growth-restricted neonates. *Am J Obstet Gynecol* 2007, **197(3)**: 286-288.
104. Kim H, Hur M, Choi SG, Moon HW, Yun YM, Hwang HS, *et al.* Performance evaluation of Sysmex XN hematology analyzer in umbilical cord blood: a comparison study with Sysmex XE-2100. *Clin Chem Lab Med* 2014.
105. Blackwell SC, Hallak M, Hotra JW, Refuerzo J, Hassan SS, Sokol RJ, *et al.* Timing of fetal nucleated red blood cell count elevation in response to acute hypoxia. *Biol Neonate* 2004, **85(4)**: 217-220.
106. Kuert S, Holland-Letz T, Friese J, Stachon A. Association of nucleated red blood cells in blood and arterial oxygen partial tension. *Clin Chem Lab Med* 2011, **49(2)**: 257-263.
107. Kasper DC, Widness JA, Haiden N, Berger A, Hayde M, Pollak A, *et al.* Characterization and differentiation of iron status in anemic very low birth weight infants using a diagnostic nomogram. *Neonatology* 2009, **95(2)**: 164-171.
108. Al-Ghananim RT, Nalbant D, Schmidt RL, Cress GA, Zimmerman MB, Widness JA. Reticulocyte Hemoglobin Content During the First Month of Life in Critically Ill Very Low Birth Weight Neonates Differs From Term Infants, Children, and Adults. *J Clin Lab Anal* 2016, **30(4)**: 326-334.

Danksagung

Ich danke meinen Eltern, all meiner Familie und meinen lieben Freunden, im Besonderen Carolin und meinen Kindern Lilian, Luis und Anton. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ich danke Professor Roland Wauer, Dr. Hannes Hammer, Professor Christof Dame, PD Dr. Gerd Schmalisch und Professor Christoph Bühner, dass sie mich in der Klinik für Neonatologie aufgenommen haben und mir die Chance gegeben haben, mich von ihnen ausbilden zu lassen und mich als Neonatologe und Forscher zu unterstützen und stetig zu motivieren. Mein besonderer Dank gilt Professor Christof Dame, der mich während meiner wissenschaftlichen Tätigkeit vorbildlich und geduldig als Mentor gelehrt hat und mich in der Durchführung und Ausarbeitung der Studien maßgeblich unterstützt hat. Außerdem gilt mein Dank meinen Kollegen, den Doktoranden Judith Pätzold, Charlotte Gräf, Monika Wisniewska, Lennart Wiehe, Niels Becker, Hannes Sallmon, Zeynep Yilmaz sowie Dr. Stephanie Roll, die wichtige Analysen in die statischen Auswertungen eingebracht hat. Bedanken möchte ich mich bei Professor Lutz Schomburg, Institut für experimentelle Endokrinologie, und PD Dr. Andreas Weimann, Labor Berlin, ohne die die aufwendige Analytik und Datenakquise nicht möglich gewesen wären. Mein aufrichtiger Dank gilt Jessica Blank, Regina Nagel, Silke Wilitzki und Boris Metze für ihre professionelle Hilfe. Allen genannten danke ich für das konstante Vertrauen und die fruchtbare Zusammenarbeit.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....
Datum

.....
Unterschrift

Dr. Malte Cremer
Berlin, 28.03.2017