

Retikulierte Thrombozyten und Thrombozytenindizes als Marker der Thrombopoese beim Hund

Rabea Manuela Welker

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin,
Klinische Pathophysiologie und klinische Laboratoriumsdiagnostik
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. A. Moritz

Retikulierte Thrombozyten und Thrombozytenindizes als Marker der Thrombopoese beim Hund

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades
eines Dr. med. vet. beim Fachbereich Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Rabea Manuela Welker

Tierärztin aus Roth

Giessen 2015

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Moritz
Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger

Prüfer: Prof. Dr. Kerstin Fey

Tag der Disputation: 01.07.2016

Meiner Großmutter und
meinem Freund

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung	3
2 Literaturübersicht	6
2.1 Hämatopoese	6
2.1.1 Megakaryopoese	7
2.1.2 Thrombopoetin.....	8
2.1.3 Thrombozytopoese (Modelle).....	10
2.2 Thrombozyten.....	14
2.3 Thrombozytenindizes	17
2.4 Thrombozytopenie.....	22
2.4.1 Mechanismen	24
2.4.1.1 Verringerte Thrombozytenproduktion	24
2.4.1.1.1 Primäre Knochenmarkerkrankungen	24
2.4.1.1.2 Medikamente, Hormone, Toxine, Bestrahlung	27
2.4.1.1.3 Infektionen und Vakzination	29
2.4.1.1.4 Hereditäre Produktionsstörungen	29
2.4.1.2 Erhöhte periphere Zerstörung.....	31
2.4.1.2.1 Immunmedierte Thrombozytopenie (ITP)	31
2.4.1.2.2 Nicht immunmediert/direkte Zerstörung.....	42
2.4.1.3 Erhöhter Verbrauch und Verlust	44
2.4.1.4 Erhöhte Sequestrierung	47
2.4.1.5 Pseudothrombozytopenie	48
2.5 Retikulierte Thrombozyten.....	48
2.5.1 Nutzen retikulierter Thrombozyten.....	50
2.5.2 Messung retikulierter Thrombozyten.....	55
3 Material und Methoden	61
3.1 Daten und Einschlusskriterien	61
3.2 Hämatologische Auswertung.....	62
3.3 Statistische Auswertung	66
3.3.1 Präzision des ADVIA bei niedrigen Thrombozytenzahlen	67
3.3.2 Untersuchung der Aussagekraft der rPLT%, rPLT# und des MPVs und Überprüfung des Cut-Off Oellers anhand einer definierten biologischen Regeneration	67

3.3.3 Klassifikation der rPLT% nach Cut-Off Oellers in zwei Gruppen; Gruppenvergleich bzgl. Thrombozytenzahl und - indizes; Korrelation MPV- rPLT%	68
4 Ergebnisse	69
4.1 Präzision des ADVIA bei niedrigen Thrombozytenzahlen	70
4.2 Überprüfung der Aussagekraft der rPLT%, rPLT# und des MPVs; Überprüfung des Cut-Off Oellers	73
4.2.1 ROC-Kurven	73
4.2.2 Ermittlung der Cut-Offs mit höchster Sensitivität und Spezifität der rPLT%, rPLT# und des MPVs; Darstellung der Cut-Offs mit höchster Spezifität dieser Parameter; Überprüfung des Cut-Off Oellers	76
4.3 Vergleich der Thrombozytenzahl und -indizes in den Gruppen „Regeneration“ und „Nicht-Regeneration“ nach Cut-Off Oellers; Korrelation der rPLT% mit dem MPV ...	81
5 Diskussion	86
5.1 Präzision des ADVIA bei niedrigen Thrombozytenzahlen	87
5.2 Retikulierte Thrombozyten als Marker der Thrombopoese	88
5.2.1 rPLT-Prozentzahl	88
5.2.2 rPLT-Absolutzahl	94
5.3 MPV als Marker der Thrombopoese	96
6 Zusammenfassung	101
7 Summary	104
8 Literaturverzeichnis	107
9 Abkürzungen	120
10 Danksagung	123

1 EINLEITUNG

Zur Beurteilung einer Anämie hinsichtlich ihrer Regenerationsfähigkeit bei Mensch und Tier ist die Betrachtung der Retikulozyten unerlässlich. Schwieriger gestaltete sich bis vor Kurzem die Beurteilung der Regeneration bei Thrombozytopenie. Darunter versteht man die Erniedrigung der Gesamtzahl an Blutplättchen in der Zirkulation.

Anhand ihres Pathomechanismus läßt sich diese Blutbildveränderung in fünf Kategorien einteilen: Verringerte Produktion auf Knochenmarksebene, erhöhte Zerstörung, vermehrter Verbrauch sowie Verlust und Sequestration. Zahlreiche Erkrankungen können zur Thrombozytopenie führen und nicht selten liegen dabei auch Kombinationen dieser Pathomechanismen vor. In der Humanmedizin gehen ca. 80-90% aller hämorrhagischen Diathesen auf Thrombozytopenien zurück (Beseoglu, 2003).

Beim Hund sind etwa 80% aller Störungen der Gerinnung auf eine Thrombozytopenie oder Thrombozytenfunktionsstörung zurückzuführen (Kaspers und Göbel, 2005). Bei dieser Tierart stellt der Plättchenmangel die häufigste erworbene Hämostasestörung dar und ist verantwortlich für eine erhöhte Blutungsneigung (Botsch, 2009). Daher ist es klinisch bedeutsam herauszufinden, was einer Thrombozytopenie zugrunde liegt.

Für das weitere diagnostische und therapeutische Vorgehen ist es erforderlich, zwischen einer Bildungsstörung und einem erhöhten peripheren Verbrauch zu unterscheiden. Handelt es sich um gesteigerten Verbrauch, Zerstörung oder Verlust, so ist davon auszugehen, dass neue Thrombozyten nachgebildet werden. Dies ist nur durch eine gesteigerte Megakaryopoese möglich. Um diese bzw. ihr Fehlen bei einer Thrombozytopenie nachzuweisen, ist eine Knochenmarkuntersuchung notwendig. Ihre Beurteilung unterliegt Schwankungen, da sie vom Betrachter abhängt (Kienast und Schmitz, 1990), beim Tier ist unter Umständen eine Narkose erforderlich und sie verursacht für den Halter zusätzliche Kosten.

Wie zu Beginn erwähnt, lässt sich die Knochenmarkaktivität bei Anämie anhand der Retikulozytenzahl beurteilen. Entsprechendes ist in der Humanmedizin bei Thrombozytopenie durch die Messung der immature platelet fraction (IPF) möglich (Hoffmann, 2014). Diese Fraktion der unreifen Thrombozyten stellt die retikulierten Thrombozyten, reticulated platelets (rPLTs) dar. Werden die retikulierten Thrombozyten anstatt durch Durchflusszytometrie automatisiert durch das Hämatologiegerät erfasst, so werden sie als IPF bezeichnet (Pons et al., 2010). Dabei handelt es sich, in Analogie zu den Retikulozyten, um junge Blutplättchen mit erhöhtem Ribonukleinsäure (RNA)-Gehalt.

1969 entdeckten Ingram und Coopersmith auf mit Neumethylenblau angefärbten Blutaussstrichen retikulierte Thrombozyten beim Hund (Ingram und Coopersmith, 1969). Die Messung mittels Durchflusszytometer erfolgte 21 Jahre später durch Kienast und Schmitz. Hierbei wurde Thiazolorange (TO) benutzt, ein Cyanin-Farbstoff, der an RNA bindet (Kienast und Schmitz, 1990). Aufgrund des zeitlichen sowie finanziellen Aufwands ist die Durchflusszytometrie nicht geeignet für den klassischen Praxis- bzw. Klinikbetrieb. Seit Kurzem kann die Messung der retikulierten Thrombozyten anhand von Blutproben mittels standardisierten Blutanalysegeräten erfolgen. Diese Methode bietet wie die Durchflusszytometrie eine ebenfalls weniger invasive sowie objektivere Alternative zur Knochenmarkentnahme, jedoch bei deutlich einfacherer und schnellerer Messung. Die Analyse ist zudem viel preiswerter und aus diesen Gründen auch zur engmaschigen Kontrolle von thrombozytopenischen Tieren gut geeignet.

In der Humanmedizin wurde bereits demonstriert, dass die Anzahl retikulierter Thrombozyten pro Volumeneinheit mit der Knochenmarkaktivität korreliert und deren Nachweis daher bei der Differenzierung der Thrombozytopenieursache eine große Hilfe darstellt (Kienast und Schmitz, 1990; Briggs et al., 2004; Abe et al., 2006; Zucker et al., 2006). Außerdem wurden retikulierte Thrombozyten bei verschiedenen Fragestellungen untersucht (Di Mario et al., 2009; De Blasi et al., 2013; Kampanatkosol et al., 2014). In der Veterinärmedizin haben die Arbeitsgruppen Pankraz et al. sowie Gelain et al. die Messung der rPLTs am Hämatologiegerät XT-2000iV der Fa. Sysmex (Kobe, Japan) ermöglicht (Pankraz et al., 2009; Gelain et al., 2010a). 2014 hat das Team um Prof. Moritz mit Dana Oellers die Messung der rPLTs auch am vollautomatisierten Großlaborgerät ADVIA 2120 (Fa. Siemens) realisiert und zudem einen Cut-Off für Regeneration ermittelt (Oellers, 2015).

Neben den retikulierten Thrombozyten werden im Hinblick auf die Thrombopoese auch die Thrombozytenindizes untersucht. Dabei handelt es sich um Thrombozytenparameter, die Informationen zu Volumen, inneren Thrombozytenbestandteilen und der Thrombozytenmasse liefern. In der Literatur von besonderem Interesse hinsichtlich einer Thrombozytenregeneration ist das mittlere Thrombozytenvolumen, mean platelet volume (MPV). Einige Autoren gehen davon aus, dass ein erhöhtes MPV Rückschlüsse auf eine erhöhte Knochenmarkaktivität zulässt (Balduini et al., 1999; Kaito et al., 2005; Ntaios et al., 2008; Schwartz et al., 2014).

Das Ziel dieser Arbeit war zum einen, die klinische Anwendbarkeit der am ADVIA 2120 gemessenen rPLT-Prozentzahl (rPLT%) und -Absolutzahl (rPLT#) sowie des mittleren Thrombozytenvolumens, mean platelet volume (MPV) an thrombozytopenischen Hunden für

die Veterinärmedizin zu prüfen. Zum anderen wurden die Thrombozytenzahl und -indizes im Zusammenhang mit dem Cut-Off von Oellers betrachtet und die diagnostische Bedeutung des MPVs als Marker der Regeneration untersucht.

Der Variationskoeffizient der rPLTs bei niedrigen Thrombozytenzahlen innerhalb der Serie wurde am ADVIA 2120 ermittelt.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 HÄMATOPOESE

Verfolgt man die Entwicklung der Thrombozyten zurück, so gelangt man über den Megakaryozyten zur pluripotenten Stammzelle (Italiano und Hartwig, 2013). Die Stammzellen des erwachsenen Menschen befinden sich im Knochenmark (Ogawa, 1993), genauer definiert sind sie in der Stammzellnische des Knochenmarks lokalisiert, einem umschriebenen anatomischen Bereich, der unter anderem aus komplexen azellulären sowie zellulären Strukturen besteht (Jones und Wagers, 2008). Hierbei sind Monozyten, Adipozyten, Endothelzellen, Nervenzellen, Osteoklasten und Osteoblasten, extrazelluläre Matrix (ECM), Sinusoide und Zytokine zu nennen (Car, 2010). In dieser Region werden den Stammzellen Oberflächenmoleküle präsentiert oder Signalmoleküle geliefert, die die weitere Entwicklung der Stammzellen beeinflussen (Jones und Wagers, 2008). Stammzellen stellen die Vorläufer aller Zellen des Knochenmarks dar und sind in der Lage, sich in alle hämatopoetischen Zellreihen zu differenzieren. In welche Zelle sie sich schließlich differenzieren, hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab, in seiner Gesamtheit dem sie umgebenden zellulären Milieu, verschiedenen Zytokinen, der Steuerung der Selbsterneuerung und der Pluripotenz (Car, 2010). Die Stammzellpopulation muss sich durch Erneuerung ihrer eigenen Population selbst erhalten sowie sich in alle möglichen verschiedenen Zelllinien entwickeln können. Die Entscheidung zur Selbsterneuerung oder Differenzierung und auch die Auswahl der Zelllinie ist ein intrinsischer Faktor und stochastischer Natur, wohingegen das nachfolgende Weiterbestehen, das Wachstum und die Ausbreitung der Vorläuferzellen von vielzähligen Zytokinwechselwirkungen gesteuert ist (Ogawa, 1993).

Die pluripotenten Stammzellen verlieren in ihrer Weiterentwicklung über die multipotenten Stammzellen zu Vorläuferzellen, die auf einzelne Zelllinien festgelegt sind, bis hin zu spezifischen Vorstufen, Schritt für Schritt ihre Möglichkeit zur Differenzierung in alle Zelllinien und ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Overmann et al., 2010).

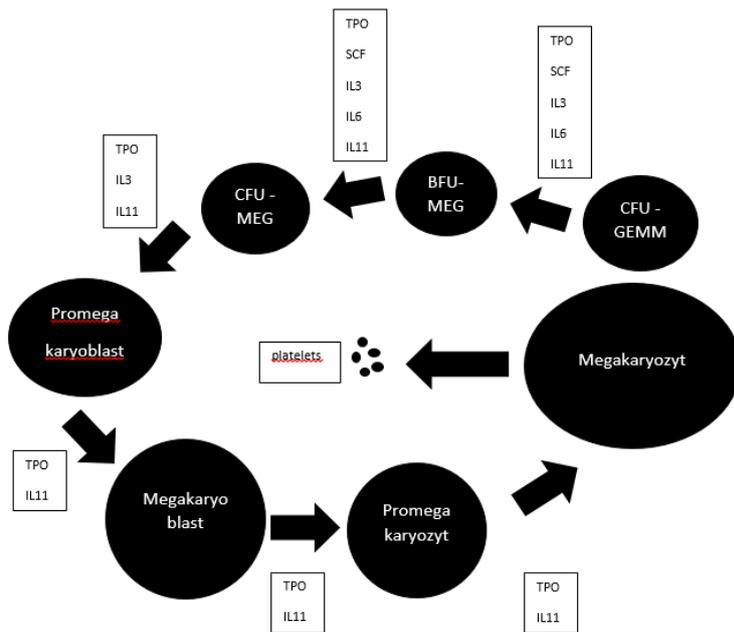


Abb. 1: Hämatopoese von der colony-forming unit-granulocyte-erythroid-megakaryocyte (CFU-GEMM) zum reifen Megakaryozyten. Thrombopoetin (TPO), stemcellfactor (SCF) und verschiedene Interleukine (IL) beeinflussen die Entwicklung. Quelle: nach (Italiano und Hartwig, 2013)

2.1.1 MEGAKARYOPOESE

Auf die pluripotente Stammzelle folgt die sehr frühe myeloische Vorläuferzelle, die sogenannte CFU-GEMM (colony-forming unit-granulocyte-erythroid-megakaryocyte). Sie ist die gemeinsame Vorläuferzelle von Granulopoese, Erythropoese, Myelopoese und Megakaryopoese (Italiano und Hartwig, 2013) und hat bereits ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung verloren (Akashi et al., 2000).

Von der humanen myeloischen Progenitorzelle scheint es ein Intermediat zu geben, das biklonale Kolonien aus megakaryozytären und erythroiden Zellen hervorbringen kann (Italiano und Hartwig, 2013). Dabei werden die Zellkolonien funktionell unterschieden, die zur megakaryozytären Linie gehören: Die CFU-Meg (cell-forming unit-megakaryocytes) und die BFU-Meg (burst-forming unit- megakaryocytes). Die BFU entwickelt sich aus einer erythroid-megakaryozytären Linie und ist gekennzeichnet durch große Kolonien, ein lymphozytenähnliches Aussehen und ist in der Lage, innerhalb von sieben Tagen 40-500 Megakaryozyten zu generieren.

Die CFU-Meg ist eine reifere Form, und bildet Kolonien von 3-50 Megakaryozyten (Italiano und Hartwig, 2013). Während der Entwicklung sind Megakaryozyten und ihre Vorstufen in zwei verschiedenen Bereichen des Knochenmarks zu finden. In der osteoblastischen Nische befinden sich die Megakaryozytenvorläufer, in der vaskulären Nische um die

Knochenmarkendothelzellen der Sinus die reifen polyploiden Megakaryozyten, in die sie von Chemokinen, vor allem fibroblast growth factor (FGF)-4 und stromal-derived factor (SDF)-1 angezogen werden (Avecilla et al., 2004). Alle hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimieren cluster of differentiation (CD)34 und CD61. Hinweise für die Festlegung auf die megakaryozytäre Zelllinie sind die Expression von CD61 und erhöhte CD41-Levels (Italiano und Hartwig, 2013).

Im nächsten Schritt entwickelt sich, letztlich aus der CFU, der Promegakaryoblast. Die Megakaryozyten sind neben der Tatsache, dass es sich um die größten Zellen im Knochenmark handelt, u.a. noch an ihrem Erscheinungsbild und ihrem gelappten Kern zu identifizieren (Schulze, 2010). Ihre Reifung lässt sich histochemisch und biochemisch nachvollziehen. Der Promegakaryoblast kann schon anhand äußerer Merkmale als solcher identifiziert werden. Der frühe Vorläufer der Megakaryozyten hat einen Durchmesser von 10 µm. Auf ihn folgt der größer werdende, gereifte, ribosomenreiche Megakaryoblast (oder Stufe I Megakaryozyt), mit nierenförmigem Kern, vierfachem Chromosomensatz (4N) und einem Durchmesser von 15-50 µm. Der nachfolgende Promegakaryozyt (oder Stufe II Megakaryozyt) ist mit einem Durchmesser von 20-80 µm noch größer (Italiano und Hartwig, 2013). Im Zytoplasma des Promegakaryozyten sind nun sich entwickelnde Granula vorzufinden (Jones, 1960). Der polyploide Megakaryozyt (bis zu 16 Zellkerne) kann eine Größe von bis zu 80 µm erreichen. Er ist in der Lage zwischen 100 und 1000 Thrombozyten zu generieren (Schulze, 2010).

2.1.2 THROMBOPOETIN

Erst die Entdeckung des Wachstumsfaktors Thrombopoetin (TPO) im Jahre 1994, der eine Schlüsselrolle bei allen Stadien der Megakaryozytenentwicklung spielt, hat intensive Studien zur Thrombozytopoese ermöglicht (Kaushansky, 2003). Abhängig von der Glykosylierung ist das Molekül 45-70 kDa groß (Olver, 2010) und es handelt sich dabei um ein 353 Aminosäuren-Vorläuferprotein (Italiano und Hartwig, 2013).

Alle Stadien der Megakaryozyten-Entwicklung werden von Thrombopoetin beeinflusst. Das Zytokin Interleukin (IL)3 kann ohne die Einwirkung weiterer Zytokine die Entwicklung bis zum unreifen Megakaryozyten in abnehmender Effektivität bewirken. TPO dagegen kann alle Stadien der Megakaryopoese stimulieren; hier verhält es sich umgekehrt zum IL3 und seine Effektivität nimmt zum reifen Megakaryozyten hin zu. Auf die hämatopoetische Stammzelle wirkt TPO dabei nur zusammen mit IL3 oder c-Kit Ligand (KL). IL6, IL11 und leukemia

inhibiting factor (LIF) wirken ebenfalls nur synergistisch. IL6 und IL11 sind alleine nicht völlig wirkungslos, bewirken aber keine ausreichende Reifung der Megakaryozyten, was unter anderem in einem Mangel an Granula sowie einem unterentwickelten Demarkationsmembransystem (DMS) in diesen Zellen resultiert (Kaushansky, 1997).

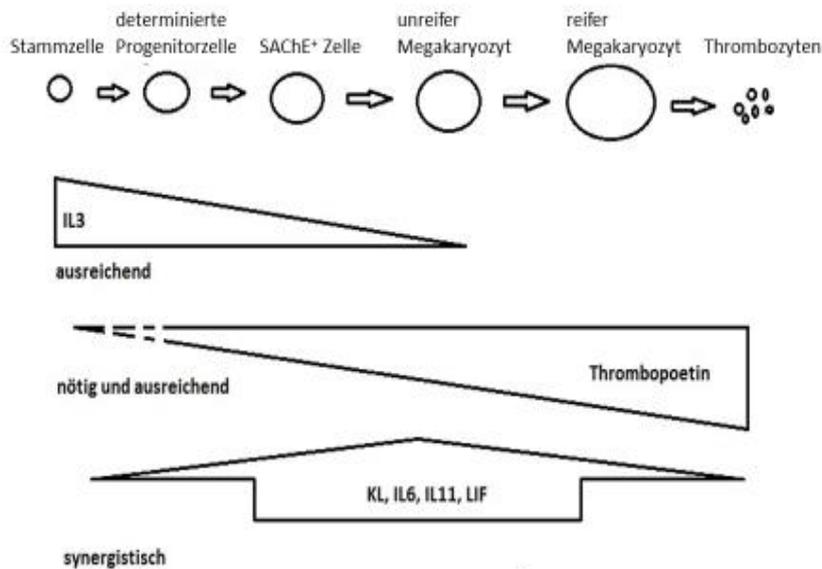


Abb. 2: Modell der Megakaryopoese unter dem Einfluss von Hormonen und Zytokinen

Die gestrichelte Linie demonstriert die Abhängigkeit von synergistisch wirkendem Interleukin (IL)3 oder c-Kit Ligand (KL).

SACHe⁺:small acetylcholinesterase-positive

IL6 : Interleukin 6

IL11: Interleukin 11

LIF: leukemia inhibiting factor

(Abb. modifiziert nach Kaushansky 1997)

Die Leber stellt den Hauptproduktionsort des Thrombopoetins dar. Aber auch die Stromazellen des Knochenmarks, die Niere und der Skelettmuskel sind in der Lage, TPO zu produzieren (Boudreaux, 2010). Der TPO-Einfluss ist zum Erhalt einer konstanten Plättchenmasse für den Megakaryozyten unverzichtbar (Kaushansky, 2005). TPO wird konstitutiv produziert und ins Blut sezerniert. Verminderte oder erhöhte Thrombozytenzahlen haben hierauf keinen Einfluss. Es bindet an seinen zur Familie der Tyrosinkinaserzeptoren gehörigen Rezeptor c-mpl (cellular homologue of a retrovirus complex, inducing myeloproliferative leukemia) auf den vorhandenen Thrombozyten und wird dort internalisiert und abgebaut. Der TPO-bindende Rezeptor wurde vor dem TPO identifiziert. Demnach war der Zusammenhang zu TPO noch nicht hergestellt, weshalb dieser den Namen c-mpl erhielt. Der mit dem TPO-Rezeptor gleichzusetzende Begriff blieb erhalten (Bergmann, 2006).

Liegen physiologische Plättchenzahlen vor, so herrscht ein Gleichgewicht zwischen der von der Thrombozytenzahl unabhängigen Produktion und dem Thrombopoetinabbau durch Bindung an TPO-Rezeptoren auf Thrombozyten und ihren megakaryozytären Vorgängern. Bei reduzierten Plättchenzahlen, die eine Verminderung der TPO-Rezeptoren bedingen, kann folglich weniger TPO an seinen Rezeptor binden und abgebaut werden. Somit erhöht sich die TPO-Konzentration im Blut. Die Megakaryopoese kann stimuliert werden.

Demnach geschieht die Regulation nicht im Sinne eines Feedbackmechanismus sondern einer Regulation einzig auf der Stufe der Thrombozyten und ihrer Vorläufer selbst. Es wird der Begriff "Endzellregulation" verwendet (Bergmann, 2006). Es ist also das Thrombopoetin–Thrombopoetinrezeptor-System, das die Plättchenmasse erhält (Russel, 2010). Es kann zum einen bei Entzündungsgeschehen IL-assoziert zu einer TPO-Erhöhung durch Hepatozyten kommen, und zum anderen ist es möglich, dass bei schwerer Thrombozytopenie durch Stromazellen eine zusätzliche TPO-Produktion erfolgt (Boudreaux, 2010).

Dennoch kann es bei schwerer immunmediierter Thrombozytopenie und deutlich erhöhter Megakaryozytengröße sowie -zahl hinsichtlich der Thrombozytenzahl zu unerwarteten TPO-Spiegeln kommen. So können durchaus niedrige TPO-Level aufgrund der Bindung von TPO an den c-mpl-Rezeptor der Megakaryozyten und ihrer frühen Vorläufer auftreten (Boudreaux, 2010).

Als Grund für normale oder nur geringgradig erhöhte TPO-Spiegel bei immunmediierter Thrombozytopenie (ITP) wird angegeben, dass TPO noch von Rezeptoren auf kurz zuvor vorhandenen Thrombozyten gebunden und abgebaut wurde. Liegt eine Thrombozytopenie aufgrund verminderter Megakaryopoese vor, so sind hohe TPO-Spiegel zu erwarten (Bergmann, 2006).

2.1.3 THROMBOZYTOPOESE (MODELLE)

Der Vorgang der endgültigen Reifung wird als Thrombozytopenie bezeichnet, während Megakaryozyten ihre ausschließliche Aufgabe erfüllen (Italiano und Hartwig, 2013), Thrombozyten aus dem Knochenmark ins Blut zu entlassen (Schulze, 2010). Eine wichtige Voraussetzung zur Plättchengenerierung durch Megakaryozyten ist die Vervielfachung des Chromosomensatzes. Die Polyploidie dieser Zellen im Knochenmark kommt durch die Endomitose des reifen Vorläufers zustande. Bei der Endomitose handelt es sich um einen Prozess der DNA-Replikation bei nicht vollzogener Teilung der Zelle. Sie ist Folge eines frühzeitigen Mitosestops, der ein Eintreten in Anaphase B oder Telophase und die Zellteilung

verhindert (Italiano und Hartwig, 2013). Bei Mensch und Hund laufen eine unterschiedliche Anzahl an Zyklen ab, beim Menschen sind es meist drei Zyklen (Italiano und Hartwig, 2013), beim Hund dagegen vier, was zu einem 32-fachen Chromosomensatz führt (Boudreaux, 2010). Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Polyploidie des Megakaryozyten und der letztlich hervorgebrachten Thrombozytenanzahl (Boudreaux, 2010).

Auf die Polyploidie folgt die zytoplasmatische Reifung. Hierbei von Bedeutung und auch elektronenmikroskopisch sichtbar sind das demarkierende Membransystem (DMS), die Granula und das dichte Tubulussystem. Von Letzterem nimmt man an, dass es für die Prostaglandinsynthese verantwortlich ist (Italiano und Hartwig, 2013). Durch Einstülpungen der äusseren Zellmembran bildet sich das DMS. Es handelt sich dabei um ein ausgedehntes Geflecht, bestehend aus schlauchartigen zisternalen und tubulären Zellmembranen (Patel et al., 2005). Das DMS steht mit der extrazellulären Umgebung in Kontakt (Italiano und Hartwig, 2013).

Derzeit existieren zwei Hauptauffassungen zur Thrombozytopoese. Zum einen die Vorstellung von sogenannten Thrombozytenterritorien. Ursprünglich wurde das DMS für eine Felderung des Megakaryozytenplasmas zur Anhäufung und darauffolgenden Freisetzung der Thrombozyten gehalten (Patel et al., 2005). Zum anderen die Theorie des von Schulze als „Flow-Modell“ bezeichneten Entwurfs, der 2010 von Radley und Haller 1982 erstmalig vorgestellt wurde. Trotz einiger Kritikpunkte wie z. B. der In-vitro Methode, auf der die Daten basieren, ist es das derzeit favorisierte Modell der Thrombozytopoese (Schulze, 2010). Radley und Haller halten es für angemessener, das DMS als "invaginiertes Membransystem" zu bezeichnen (Radley und Haller, 1982). Schulze betont die Wichtigkeit des DMS, er hält es „von großer Bedeutung für die Proplateletgenese“ (Schulze et al., 2006).

Das Zytoplasma unterliegt demnach intensiven Umbauvorgängen von langen, zytoplasmatischen Megakaryozytenausläufern zu tropfenartigen Ausstülpungen, den Proplatelets (Italiano und Hartwig, 2013). Hierbei wird davon ausgegangen, dass die Proplatelets eine Zwischenstufe in der Thrombozytenentstehung darstellen (Schulze, 2010). Das Plasma wandelt sich innerhalb von 4-10 Stunden um, bis nur noch der Kern des Megakaryozyten von Proplatelets enthaltenden Ausziehungen umgeben ist (Italiano und Hartwig, 2013).

Die Zytoplasmaausläufer der Megakaryozyten sind mit Mikrotubulifilamenten ausgekleidet und bewegen sich dyneinassoziiert (Boudreaux, 2010) überlappend, so dass es zu einer Verlängerung der Proplättchen kommt. Die Enden dehnen sich kugelig aus, die Mikrotubulifilamente darin schlagen sich um und bilden eine Spirale, die auch als

Marginalband bezeichnet wird. So entsteht die charakteristische kortikale Mikrotubulianordnung in den Thrombozyten (Italiano und Hartwig, 2013). Dieses spezielle Umschlagen der Mikrotubulifilamente kommt nur an den äußersten sowie an hantelförmigen Ausläufern dieser Vorstufen vor, was eine Thrombozytengenerierung nur an diesen Stellen zulässt. Eine häufige Verzweigung der Proplatelets liefert die benötigten alleinstehenden Enden (Schulze, 2010).

Mikrotubuli sind Hohlzylinder aus Alpha- und Beta-Tubulin. Das häufigst vorkommende Protein ist die β 1-Tubulin Isoform (Boudreaux, 2010). β 1-Tubulin kommt ausschließlich in Megakaryozyten und Thrombozyten vor (Schulze, 2008). Es lässt sich nicht adäquat durch andere β -Isoformen ersetzen, wie man bei β 1-Tubulin- Knockoutmäusen feststellen konnte. Andere β -Tubuline wurden zwar hochreguliert, eine Thrombozytopenie sowie eine reduzierte Anzahl an Marginalbändern konnte aber nicht verhindert werden (Boudreaux, 2010). Mäuse mit β 1-Tubulinmangel zeigten eine reduzierte Anzahl an Thrombozyten, die zudem eine veränderte Form aufweisen und deren Mikrotubulifilamente im Elektronenmikroskop in der Peripherie deutlich reduzierte Wickelungen zeigten (Schulze, 2008). Beim Cavalier King Charles Spaniel mit β 1-Tubulindefekt treten vermehrt Makrothrombozyten auf. Davis et al gehen davon aus, dass die Hunde normale Gerinnungszeiten zeigen, da die Thrombozytenmasse vermutlich noch ausreicht, also dass der Mikrotubulidefekt keinen Einfluss auf die Thrombozytenfunktion hat (Davis et al., 2008).

Die Mikrotubuli sind außerdem durch ihr entgegengerichtetes Aneinandergleiten sowie den kinesinassoziierten Transport für die Füllung der Pseudopodien mit für Thrombozyten nötigen Zellbestandteilen verantwortlich, so z. B. Granula, deren Bildung einen Hinweis auf die Reifung der Megakaryozyten darstellt. Alpha Granula sind hierbei die häufigsten Vertreter (Italiano und Hartwig, 2013). Menschliche Plättchen beinhalten ungefähr 40-80, Mäusethrombozyten ca. 15-30 Granula (Schulze, 2008). Diese entstammen, wie alle Granula, dem Golginetzwerk und enthalten Proteine wie z. B. den Plättchenfaktor (PF)-4, β -Thromboglobulin und den Von-Willebrand-Faktor (vWF). Bedeutend für die Plättchenwirkung sind z. B. Integrin α IIb β 3, CD36 und P-Selektin (CD62P) (Italiano und Hartwig, 2013). Das sich nur auf der Innenmembran befindliche P-Selektin wird durch Verschmelzung des Vesikels mit der Thrombozytenmembran an die Zelloberfläche gebracht. Von geringerer Größe sowie Anzahl sind die delta-Granula, die sich elektronendicht darstellen. Sie beinhalten Serotonin sowie z. B. Nukleotide wie ADP (Adenosindiphosphat) , ATP (Adenosintriphosphat) , GDP (Guanosindiphosphat) oder GTP (Guanosintriphosphat), Pyrophosphat oder auch Kalzium und Magnesium. Lysosomale Granula enthalten

beispielsweise Hydrolasen, Proteasen wie Cathepsine und membranassoziierte Proteine wie CD63 und lysosomal- associated membrane protein (LAMP)-1 und -2 (Schulze, 2008).

Nun haben diese Granula im reifen Megakaryozyten die gesamte Strecke vom Zellkörper bis in die tropfenförmigen Ausstülpungen zu überwinden, was große Distanzen im Bereich eines halben Millimeters betrifft (Schulze 2008). Neben dem bereits erwähnten dyneinabhängigen Gleiten der Zytoplasmaausläufer (Boudreaux, 2010) spielt auch Aktin eine Rolle bei der Thrombozytenentstehung (Schulze, 2008). Es ermöglicht den Proplatelets sich zu krümmen und vielfach zu gabeln (Italiano und Hartwig, 2013). Es konnte gezeigt werden, dass z. B. Cytochalasin B oder D Aktinmonomerbindungen an polymere Filamente verhindern kann, was es den Proplättchen unmöglich macht, sich zu verzweigen (Schulze, 2008). Letztlich reißen die Zytoplasmabrücken zwischen den thrombozytengroßen Verdickungen der Proplatelets, und die unverbundenen Thrombozyten gelangen in die Zirkulation (Italiano und Hartwig, 2013). Nach Erfüllung seiner Aufgabe, der Entlassung der Proplatelets, geht der Megakaryozyt in den regulierten Zelltod über (Boudreaux, 2010).

Schulze erweiterte nun das bereits erwähnte Flow-Modell um eine teilweise extramedulläre Thrombozytenentstehung. Er geht davon aus, dass von Megakaryozyten an der vaskulären Nische größere Zellplasma-Abschnürungen, sogenannte Präplättchen ins Blut abgegeben werden, so dass die Stimulierung durch z. B. Kollagen oder Von-Willebrand-Faktor an den Endothelzellen der Blut-Knochenmarkschranke reduziert werden kann. Die folgenden Plättchen entstehen dann über Proplättchen in den Gefäßen in Richtung Lunge oder dem pulmonalen Kapillarbett (Schulze, 2010). Dafür sprechen einige Umstände, wie z. B. die Tatsache, dass Megakaryozyten aus dem Knochenmark in den Blutstrom gelangen und dort 5-20% der Thrombozytenmasse einnehmen können. Isoliert man diese, so scheinen jedoch die Scherkräfte des Blutes zu fehlen, die die Zytoplasmabrücken zwischen den Teilchen in Thrombozytengröße trennen. Auch das Fehlen eines noch unidentifizierten Faktors, der zu dieser Trennung führen könnte, ist nicht ausgeschlossen (Italiano und Hartwig, 2013).

Außerdem konnten Megakaryozyten in der Lunge nachgewiesen werden. Die Theorie wird bestärkt durch eine Studie, in der die ausschließlich im Blutstrom des rechten Herzens vorhandenen Megakaryozyten nach der Lungenpassage nicht mehr vorzufinden waren (Kaufman et al., 1965). Ähnliche Ergebnisse erzielten Autoren, die im Vergleich zur Pulmonalarterie eine deutlich geringere Anzahl an Megakaryozyten in der Pulmonalvene nachweisen konnten. Zudem enthielt die Lungenvene nach Lungenpassage nur die bloßen Megakaryozytenkerne (Scheinin und Koivuniemi, 1963). Hinzu kommt die Tatsache, dass im roten Knochenmark nur sehr wenig dieser zytoplasmafreien Kerne vorzufinden sind, was die

These der Thrombozytenentstehung ausserhalb des Knochenmarks stützt (Schulze, 2010). Für Schulze sind weitere Untersuchungen nötig, um den dynamischen Prozess der Thrombozytopoese vollständig erfassen zu können. Für ihn „verbirgt die kleinste aller Blutzellen noch stets das Geheimnis seiner Geburt“ (Schulze, 2010).

2.2 THROMBOZYTEN

Thrombozyten sind die kleinsten zellulären Blutbestandteile. Die Thrombozyten eines gesunden Hundes sind in der Regel 1-3 μm groß (Wilkerson und Shuman, 2001). Innerhalb einer Säugetierspezies bewegt sich die Thrombozytenzahl in relativ engem Rahmen. Etwa ein Drittel der zirkulierenden Plättchenmasse kann beim inaktiven Tier in der Milz gespeichert werden (Russel, 2010). Die Lebenszeit eines Thrombozyten in der Blutbahn beträgt beim Menschen 10, bei der Maus 5 Tage (Josefsson et al., 2013). In einer Studie, die die Thrombozytenlebensspanne von splenektomierten Hunden mit der von Hunden mit intakter Milz verglich, wurden bei Letzteren 5,46 Tage \pm 15 Std. ermittelt (Dale et al., 1996).

Bei Thrombozyten handelt es sich um scheibenförmige, kernlose Zellfragmente (White, 2013). Auch wenn Thrombozyten keinen Zellkern besitzen, sind in ihnen informationstragende Gentranskripte wie m-RNA und r-RNA enthalten. Alle m-RNA Moleküle zusammen werden auch als Transkriptom bezeichnet. Diese Gentranskripte konnten u.a. mithilfe der PCR nachgewiesen werden. Man geht von einem „stabilen, nicht dynamischen Transkriptom“ im Thrombozyten aus. In Studien konnte die Proteinbiosynthese ex vivo nachgewiesen werden (Bugert und Klüter, 2010).

Die Tatsache, dass markierte Aminosäuren in Proteine eingebaut wurden, stellt zudem einen Nachweis der Proteinbiosynthese dar (Weyrich et al., 1998). Andere sehen es ebenfalls für gesichert an, dass Thrombozyten Proteine synthetisieren (Siegel-Axel et al., 2006). So wurden Glykoproteine (GP)IIb/IIIa oder vWF auch in Blutplättchen ohne auslösenden Stimulus synthetisiert (Kieffer et al., 1987). Eine Aktivierung steigerte die Syntheseleistung erheblich (Siegel-Axel et al., 2006). So konnten Lindemann et al. nachweisen, dass mit Thrombin, ADP, Kollagen oder Epinephrin aktivierte Thrombozyten IL1 β gesteigert synthetisierten (Lindemann et al., 2001).

Die Lebensspanne des Thrombozyten wird bestimmt von einem regulierten Untergang, den die Zelle vollzieht (Josefsson et al., 2013). Produktion und Abbau der Plättchen befinden sich beim gesunden Tier im Gleichgewicht. Phagozytierende Zellen der Leber und Milz entfernen die gealterten Plättchen aus dem Blutstrom. Welche Signale die Alterung anzeigen, ist noch

nicht vollständig geklärt. Thrombozyten präsentieren Phosphatidylserin (PS) auf der Außenseite ihrer Membran, was entweder direkt oder über Bindungsproteine zur Phagozytose führt. Glykoproteine an der Thrombozytenoberfläche werden durch Glykosylierung oder das Freiwerden von Neoepitopen denaturiert oder beschädigt. Physiologisch vorhandene Immunglobuline sind in der Lage, alterungsbedingt präsentierte Oberflächenepitope zu erkennen. Ein kleiner Teil der Thrombozyten wird auch im Zuge der ständigen Endothelreparatur konstant verbraucht (Russel, 2010). Früher ging man davon aus, dass nur kernhaltige Zellen Apoptose eingehen können, aber mittlerweile weiß man, dass auch Plättchen *in vitro* und *in vivo* dazu in der Lage sind (Gyulkhandanyan et al., 2012). Leytin beschreibt einen im Thrombozyten vorhandenen Apoptoseapparat (Leytin, 2012). Es gibt zwei Hauptwege der Apoptose.

Zum einen den extrinsischen, Todesliganden-assoziierten und Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor-assoziierten sowie zum anderen den intrinsischen Weg. Ersterer ist als Apoptoseverursacher bei Thrombozyten noch nicht gesichert. Er wird eingeleitet durch die Bindung eines Ligands der TNF-Superfamilie an eine Transmembrandomäne der TNF-Rezeptorfamilie wie beispielsweise TNF-Rezeptor 1 und 2. Liganden sind zum Beispiel der TNF, FasL (Fas ligand) sowie TL1A (TNF-like ligand). Nachdem die entsprechenden Todesliganden gebunden haben und eine Aktivierung durch diese stattgefunden hat, erfolgt eine Bindung von Adaptermolekülen wie FADD (Fas-associated death domain) und/oder TRADD (TNF-receptor-associated death domain) über die Rezeptor-Todesdomäne. Somit können Proteasen wie Prokaspase 8 oder Prokaspase 10 einen Tod-induzierenden Signalkomplex (death-inducing signaling complex, DISC) auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran bilden. Über eine Kaspasenkaskade werden überlebensnotwendige Zellproteine gespalten und die Apoptose wird vollzogen (Leytin, 2012).

Zum anderen gibt es den intrinsischen Apoptoseweg der Thrombozyten, der mittlerweile gut erforscht ist. Zentrale Rolle spielt das Mitochondrium (Gyulkhandanyan et al., 2012). Ausgelöst wird der kontrollierte Zelltod hierbei durch Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran. Pro- und antiapoptotische Proteine der Bcl (B-cell lymphoma)-2 Familie beeinflussen die Aussenmembran des Zellorganells und führen so zur Formation der „mitochondrial permeability transition pore“, einer Erhöhung in der Durchlässigkeit der Mitochondrienmembran. Proteine wie z. B. Zytochrom C, und DIABLO (direct IAP-binding protein with low PI) - Letzteres wird auch als SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases) bezeichnet - werden aus dem Spalt zwischen den beiden Zellmembranen des Mitochondriums in das Zytosol abgegeben. Zytochrom C formt mit seinem Adapterprotein

Apaf (apoptotic protease-activating factor)-1 ein sogenanntes Apoptosom, das Prokaspase 9 und letztlich, wie auch beim extrinsischen Weg, Effektor-kaspasen aktiviert und eine Kaspasekaskade auslöst (Leytin, 2012).

Desweiteren scheint es eine Apoptose der Plättchen unter Umgehung des Todesrezeptors zu geben, indem stattdessen PAR (Protease aktivierte Rezeptoren)-1, GPIIb/IIIa- und GPIIb α -Oberflächenrezeptoren genutzt werden. Außerdem scheint Thrombin die Thrombozytenapoptose über den PAR-1-Rezeptor zu induzieren und GPIIb/IIIa die thrombininduzierte Apoptose zu potenzieren (Leytin, 2012).

Da in den Thrombozyten kein Kern vorhanden ist, kann z. B. keine Chromatinkondensation, Fragmentation oder Kernbruch festgestellt werden. Als Kennzeichen der thrombozytären Apoptose auf chemische und physikalische Stimuli *in vitro* werden triggerabhängig verschiedene Veränderungen beschrieben, u.a. die Depolarisation der inneren Membran der Mitochondrien, die Expression apoptosehemmender sowie -stimulierender Proteine der Bcl-2 Familie, Zytochrom C Freisetzung, PS-Expression auf der Thrombozytenoberfläche und Kaspase 3-Aktivierung. Thrombozyten, deren Plasmamembran derartig verändert ist, werden vom retikuloendothelialen System erkannt und aus der Zirkulation entfernt (Gyulkhandanyan et al., 2012).

Als Auslöser der Apoptose können z. B. Thrombin, pro-apoptotische antithrombozytäre Antikörper oder auch unnatürlich hohe Scherkraft fungieren (Gyulkhandanyan et al., 2012), ebenso natürliche Alterung (Leytin, 2012). Bei z. B. ITP, Urämie und bakteriellen Infektionen wird über gesteigerte Apoptose von Thrombozyten berichtet. Eine Verringerung der Apoptose kann beispielsweise durch Ciclosporin A, intravenöse Immunglobuline (IVIG) und GPIIb/IIIa-Antagonisten erfolgen (Leytin, 2012).

Neben ihrer Fähigkeit zur Proteinbiosynthese und zum regulierten Zelltod sind Thrombozyten von essentieller Bedeutung für den ersten Verschluss einer Gefäßverletzung (Ruggeri und Jackson, 2013) und wirken außerdem unterstützend bei der plasmatischen Gerinnung (Barlage und Schmitz; 2007). Blutplättchen werden mit dem Blutstrom an den Gefäßrand geschoben, so dass sie sich bei Gefäßschaden bereits in Endothelnähe befinden (Hartwig, 2013). Kommt es dann in Folge einer Verletzung zum Kontakt der Thrombozyten mit subendothelial gelegenen Kollagen, so haften die Thrombozyten vWF-vermittelt an der Läsion an. Auch existiert eine zusätzliche und unmittelbare Anhaftung der Thrombozyten ohne vWF an kollagene Strukturen über GPIa/IIa und GPVI (Hoth und Wischmeyer, 2012).

Der vWF stammt aus dem Endothel und bindet zum einen an das freigelegte Kollagen und nach seiner Konformationsänderung zum anderen an den Glykoproteinrezeptorkomplex

GPIIb/IX auf der Thrombozytenoberfläche. Dieser Vorgang wird als Thrombozytenadhäsion bezeichnet. Er führt zur Thrombozytenaktivierung, die gekennzeichnet ist durch Formänderung (Kaspers und Göbel, 2005), Pseudopodienbildung (Mischke, 2014), Granulafreisetzung, GPIIb/IIIa-Rezeptorkonformationsänderung zur Fibrinogenbindung (Kaspers und Göbel, 2005) und Anreicherung von Gerinnungsfaktoren im Bereich der Läsion. Freigesetzte Granulainhaltsstoffe sind unter anderem Thromboxan A₂, ADP sowie plättchenaktivierender Faktor (PAF) und Serotonin (Mischke, 2014). Diese Inhaltsstoffe aktivieren weitere Plättchen. Der auf die Adhäsion folgende Vorgang wird als Plättchenaggregation bezeichnet. Die Verklumpung zwischen den Plättchen wird über die Fibrinogenbindung ermöglicht und ein Thrombozytenpfropf entsteht (Kaspers und Göbel, 2005).

Thrombozyten spielen außerdem eine Rolle bei der Atherosklerose, Angiogenese, vaskulären Restenose, Thrombose, Wundheilung und Immunantwort sowie Entzündung (Smyth et al., 2009).

2.3 THROMBOZYTENINDIZES

In der Erythrozytendiagnostik gehört die Evaluation der Erythrozytenindizes zur Routine. In der Thrombozytendiagnostik dagegen, besonders in der Tiermedizin, sind diese Indizes noch wenig etabliert. Es handelt sich dabei um verschiedene Parameter, die zum einen Informationen über das Volumen der Thrombozyten liefern, wie MPV (mean platelet volume), PDW (platelet distribution width), PCT (plateletcrit) und LPLT (large PLTs). Desweiteren lassen sich über das MPC (mean platelet component concentration) und PCDW (platelet component distribution width) Rückschlüsse auf die inneren Bestandteile der Thrombozyten ziehen. Außerdem liefert das MPM (mean platelet mass) sowie die PMDW (platelet mass distribution width) Informationen zur Thrombozytenmasse. Darüberhinaus ist der ADVIA 2120 auch in der Lage, PLT clumps (Thrombozytenagglutinate) zu erkennen und zu zählen.

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit evaluierten Thrombozytenparameter erläutert:

1. PLTcount ($10^9/l$): Thrombozytenzahl, die Anzahl an Zellen, die als Thrombozyten und Large Platelets identifiziert werden.
2. MPV (fl): mean platelet volume, das mittlere Thrombozytenvolumen; analog zum MCV, das bereits aus der Erythrozytendiagnostik bekannt ist.

3. PCT (%): plateletkrit/Thrombokrit, $(PLT \times MPV) \div 10,000$; Analogon zum Hämatokrit
4. Large PLT ($10^9/l$): große Thrombozyten über 20fl
5. PDW (%): platelet distribution width , die Thrombozytenverteilungsbreite; die PDW kann auch als Standardabweichung der Plättchenverteilungskurve um das Maximum in % beschrieben werden
6. MPC (g/dl): mean platelet component concentration, die mittlere Konzentration innerer Thrombozytenbestandteile oder die Thrombozytendichte, die den Granula der Thrombozyten entspricht; zu vergleichen mit der mittleren korpuskulären Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (CHCM)
7. PCDW (g/dl): platelet component distribution width, die Verteilungsbreite der „mean platelet component concentration“
8. MPM (pg): mean platelet mass, die mittlere Thrombozytenmasse; sie ist das Produkt aus MPV und MPC/100; in der Erythrozytenmessung entsprechend dem mittleren Hämoglobingehalt der Einzelerythrozyten (MCH)
9. PMDW (pg): platelet mass distribution width, die Verteilungsbreite der Masse der Thrombozyten
10. Clumps Count (events): Thrombozytenagglutinate (Moritz, 2000; Siemens, 2010)

Ginge man davon aus, dass die jungen Thrombozyten auch die großen sind, so ließe sich aus Thrombozytenvolumenindizes viel Information über die Aktivität des Knochenmarks bzw. die Thrombopoese gewinnen. Es existieren zahlreiche Studien zu Thrombozytenvolumenindizes. Einige Autoren haben die Aussagekraft von Thrombozytenindizes bei Thrombozytopenie an Menschen und Hunden untersucht. Im Hinblick auf eine gesteigerte Thrombopoese bei ITP (Kaito et al., 2005; Schwartz et al., 2014), vor und nach der Behandlung dieser Erkrankung (Korkmaz et al., 2013) oder auch hinsichtlich des prognostischen Nutzens (Kim et al., 2008). Ebenfalls gibt es Studien zu Thrombozytenindizes in Fällen, in denen keine Thrombozytopenie vorliegt wie z. B. bei der Hyperthyreose (Stiegler et al., 1998), inflammatory bowel disease (IBD) (Öztürk et al., 2013) oder bei Untersuchungen zu Indizes als Qualitätsmarker von Plättchentransfusionen (Singh et al., 2003).

Da in vorliegende Arbeit nur Daten von thrombozytopenischen Hunden eingingen, wurde besonderer Fokus auf das MPV gelegt, da dieses in der Literatur von gesteigertem Interesse ist, wenn es darum geht, Rückschlüsse auf die Knochenmarkaktivität zu ziehen, bzw. bei der Thrombozytopenieursache zwischen Hypoproduktion und Hyperdestruktion zu unterscheiden.

Die am besten validierten Parameter hinsichtlich der Thrombozytenvolumenindizes bei Patienten in der Humanmedizin sind MPV und PDW (Latger-Cannard et al., 2012; Leader et al., 2012). Minter und Ingram erwähnten schon in ihrer Studie über retikulierte Thrombozyten ein durchschnittlich großes Volumen derjenigen Thrombozyten, die nach akutem Blutverlust bei Beaglen auftraten (Minter und Ingram, 1971). Ein Jahr später beschrieb Karpatkin, dass alternde Thrombozyten an Größe verlieren, weniger Proteine synthetisieren und ihren RNA-Gehalt verringern (Karpatkin, 1972). Doch schon damals gab es unterschiedliche Vermutungen. Manche Autoren sprachen von größerer Adhäsivität der jungen Blutplättchen bzw. deren stärkerer Abflachung auf dem Objektträger und dem daraus resultierenden größeren Durchmesser (Nelson und Kehl, 1981).

Ob nun Plateletvolumenindizes bzw. das MPV tatsächlich als Hinweis auf eine erhöhte Regeneration der Thrombozyten im Knochenmark das Vorhandensein größerer und somit junger Thrombozyten anzeigen können, wird bis dato kontrovers diskutiert.

In einer Untersuchung konnte für 4880 Blutproben von Patienten mit Thrombozytenzahlen zwischen $50 \times 10^9/l$ und $900 \times 10^9/l$ eine inverse Beziehung zwischen der Anzahl an Thrombozyten und dem MPV im peripheren Blut gezeigt werden (Giles, 1981). Bessmann et al. stellten beim Menschen eine nichtlineare, inverse Beziehung zwischen MPV und der Thrombozytenzahl über die gesamte Thrombozytenbreite fest, wobei jedoch die MPV-Veränderungen im niedrigen Bereich am stärksten waren (Bessmann et al., 1981). Auch andere legten dar, dass sich Zahl und Größe humaner Thrombozyten gegenläufig zueinander verhalten (O'Malley et al., 1996). Bommer et al. demonstrierten ebenfalls in vielen Fällen diese gegenläufige Beziehung zwischen MPV und Thrombozytenzahl bei Hunden. Dieselbe Beziehung ermittelten sie auch in Bezug auf die PDW (Bommer et al., 2008).

Für Thon und Italiano zeigt die inverse Beziehung zwischen PLT-Zahl und MPV beim Menschen, dass die humane Thrombozytenproduktion über eine Erhaltung der Masse geregelt ist und erwarten, dass große PLTs mit niedrigeren PLT-Zahlen übereinstimmen (Thon und Italiano, 2012). Bei gesunden Menschen mit konstanter Thrombozytenproduktion konnte ein signifikanter, negativer Zusammenhang zwischen jungen, retikulierten Thrombozyten und dem Thrombozytenvolumen gefunden werden (Hoffmann et al., 2013). Für Hoffmann existiert diese inverse Beziehung auch im Rahmen einer Erhaltung der konstant zirkulierenden Thrombozytenmasse, die große Thrombozyten bei weniger Plättchen und kleine Thrombozyten bei vielen zirkulierenden Plättchen fordert (Hoffmann, 2014). Nelson und Kehl untersuchten 87 Patienten mit Thrombozytenzahlen zwischen $15 \times 10^9/l$ und

$100 \times 10^9/l$ und teilten diese anhand zugrundeliegender Pathogenese in folgende drei Gruppen ein: erhöhte Zerstörung bzw. gesteigerter Verbrauch, Hypoproduktion und daraus kombinierte Mechanismen. Das MPV der Patienten mit erhöhter Zerstörung resp. Verbrauch ihrer Thrombozyten war deutlich größer als dasjenige der Gruppe mit insuffizientem Knochenmark (Nelson und Kehl, 1981). Balduini et al. konnten bei 13 Brustkrebspatientinnen mit Thrombozytopenie infolge der Chemotherapie in der Erholungsphase einen Anstieg des MPVs, der PDW und P-LCR ermitteln (Balduini et al., 1999). Kaito et al. demonstrierten im Vergleich zweier annähernd gleichgroßer Patientengruppen, dass u.a. MPV und PDW bei immunvermittelter Thrombozytopenie (ITP) signifikant höher waren als bei den an aplastischer Anämie (AA) erkrankten Patienten und eine ausreichende Spezifität und Sensitivität zur Diagnosestellung der ITP aufwiesen (Kaito et al., 2005).

Andere Autoren bestätigten diese Ergebnisse in ihrer Studie mit signifikant höheren MPV-Werten bei Patienten mit ITP (Abe et al., 2006). Da die definitive Diagnose ITP nicht oder nur schwer durch einen Test gestellt werden kann, bleibt laut den Autoren eine gewisse Unsicherheit bei der Therapie mit Immunsuppressiva zurück. Sie zeigten in ihrer Studie, wie vor allem PDW und MPV eine zuverlässige Unterscheidung zwischen erhöhter peripherer Zerstörung und Hypoproduktion ermöglichen (Ntaios et al., 2008). In einer Studie erhöhte sich MPV graduell vor dem ersten und zweiten Rückfall der ITP und normalisierte sich nach angemessener Therapie (Korkmaz et al., 2013). In der Veterinärmedizin konnte eine Sensitivität von 88% und eine Spezifität von 80% hinsichtlich der Knochenmarkaktivität bei hohem MPV errechnet werden, indem das Knochenmark von 60 thrombozytopenischen Hunden mit deren MPV-Werten verglichen wurden (Sullivan et al., 1995).

Schwartz et al. gehen davon aus, dass junge Thrombozyten auch große Thrombozyten sind. Sie erwarteten ein erhöhtes MPV bei den erkrankten Hunden sowie einen Anstieg des PCTs vor der PLT-Zahl, aufgrund von im Rahmen der Thrombozytenregeneration aus dem Knochenmark entlassenen jungen und zugleich größeren Blutplättchen. Sie untersuchten in ihrer Studie 49 Hunde mit primärer ITP und verglichen diese mit einer Referenzpopulation von 46 gesunden Hunden. Das Ziel der Studie war die Evaluation von MPV, PCT und PDW. Zudem untersuchten sie, in welcher Reihenfolge bzw. welchem zeitlichen Abstand die Thrombozytenzahl und -masse eine bestimmte Schwelle, die mit sinkendem Blutungsrisiko einhergeht, erreichten. Dazu wurde eine PCT-Grenze errechnet, die der Thrombozytenzahl von $75 \times 10^9/l$ eines gesunden Hundes entspricht, indem dieser Wert mit dem Median des MPV der Referenzpopulation multipliziert wurde. Tatsächlich nahm das MPV in der Gruppe der Tiere mit primärer ITP signifikant höhere Werte im Vergleich zur Referenzpopulation

(17,3fl gegen 10,5fl, $p < 0.0001$) an. Kein Unterschied in beiden Gruppen war jedoch bei der Thrombozytenverteilungsbreite festzustellen. 15 Hunde, die auf Therapie ansprachen, gingen in den zeitlichen Vergleich des Erreichens des Schwellenwertes zwischen Thrombozytenzahl und -masse ein. Es konnte festgestellt werden, dass die Thrombozytenmasse schneller als die Thrombozytenzahl ihre errechnete Grenze erreichte (Schwartz et al., 2014).

Studien, die gegen das MPV als differentialdiagnostische Hilfe bei Thrombozytopenie bzw. als Marker der Regeneration sprechen, existieren jedoch auch.

So können offensichtlich durchaus auch große Thrombozyten mit einer Hypoproduktion einhergehen. Northern et al. beschrieben in ihrer Studie, dass ein Drittel der Hunde mit großen Thrombozyten an einer primären Knochenmarkerkrankung litten (Northern und Tvedten, 1992). Es scheint zudem, dass auch Zellen einer Größe von weniger als vier μm in der Lage waren, neue Zellkörper zu generieren, also als Thrombozytenvorläufer zu fungieren, und bei ex vivo Lagerung noch zu erhöhten Thrombozytenzahlen zu führen (Schwartz et al., 2010). Das heißt also, dass auch kleine, juvenile Thrombozyten bei Regeneration hervorgebracht werden können. Abweichungen von erwarteten Werten bzgl. des MPVs in Bezug auf gesteigerte Thrombopoese traten auch bei Nelson und Kehl auf. Trotz Ergebnissen, die für die Aussagekraft des MPVs hinsichtlich zugrundeliegender Pathogenese bzw. gesteigerter Thrombopoese sprechen, gab es Fälle von niedrigen MPV-Werten bei vorliegender hämolytischer Anämie, Thrombozytopenie und erhöhter Megakaryozytenzahl (Nelson und Kehl, 1981).

Bommer et al. (2008) sind der Meinung, dass PDW und MPV bei thrombozytopenischen Hunden mit systemischen Erkrankungen keine Differenzierung der zugrundeliegenden Erkrankungen erlauben. Die Daten von 159 Hunden zeigen, dass es bei einer Vielzahl von Erkrankungen mit unterschiedlicher Pathogenese zur Produktion von großen Thrombozyten kommen kann. So hatten drei Hunde mit großen Thrombozyten bzw. einem PDW über dem erwarteten Wert Krankheiten, die eigentlich mit Produktionsstörung einhergehen, wie Hyperöstrogenismus, Monozyten- und Lymphozytenleukämie. Für Bommer könnte dies ein Hinweis auf das begrenzte Wissen über zugrundeliegende Mechanismen der Thrombozytengröße sein. Denn man muss, sofern man der Meinung ist, dass große Platelets eine erhöhte Thrombopoese als Antwort auf akuten Verlust widerspiegeln, entweder den diesen Erkrankungen zugrundeliegenden und zur Thrombozytopenie führenden Mechanismus in Frage stellen, oder aber von der Bildung großer Platelets als Antwort auf Thrombozytopenie auch bei bestehender Unterproduktion ausgehen. Auch andere Autoren

stellten fest, dass noch einige Fragen zur Größe von Thrombozyten offen sind (Thon und Italiano, 2012).

Pankraz et al. verglichen u.a. MPV und PDW von Kontrolltieren und kranken Tieren. Unter den Patienten waren sowohl Thrombozytopeniker als auch Hunde mit Thrombozytenzahlen im Referenzbereich. Bei allen 8 Tieren war eine Steigerung der Thrombopoese anzunehmen. Im Vergleich mit 40 Kontrolltieren konnten keine signifikanten Unterschiede bei den Indizes zwischen den Gruppen festgestellt werden (Pankraz et al., 2009). Kickler et al. stellten bei thrombozytopenischen Patienten fest, dass das MPV unverändert blieb, obwohl die Thrombozytenzahl anstieg. Die HFPF% (high fluorescent platelet fraction), die definiert ist als die Platelets mit den höchsten 3% Fluoreszenzintensität, ging bei steigender Thrombozytenzahl dagegen zurück (Kickler et al., 2006). Somit erfüllte das MPV im Gegensatz zu den retikulierten Thrombozyten nicht die Erwartungen hinsichtlich eines Markers für Regeneration.

Auch andere stellten in ihrer Studie fest, dass die Fraktion der unreifen Thrombozyten, also die IPF, hinsichtlich ihrer Aussagekraft dem MPV überlegen ist. So bestand zwar eine signifikante Korrelation zwischen der IPF% und dem MPV, aber betrachtete man nur das MPV, so zeigte es keine Aussagekraft bzgl. der Fragestellung (Di Mario et al., 2009). Abe et al. demonstrierten zum einen in ihrer Studie, dass die IPF nützlich angesichts der zugrundeliegenden Pathomechanismen ist und verglichen zum anderen anhand der Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurven das MPV mit der IPF%. Sie konnten zeigen, dass das MPV deutlich weniger Informationsgehalt hinsichtlich ausreichender Regeneration besitzt (Abe et al., 2006). Oellers verglich die am ADVIA gemessenen Thrombozytenvolumenindizes MPV, PDW und Large PLT mit den Zahlen retikulierter Thrombozyten und ermittelte niedrige Korrelationskoeffizienten. Somit sollten keinesfalls diese Volumenindizes anstelle der retikulierten Thrombozytenmessung herangezogen werden (Oellers, 2015).

2.4 THROMBOZYTOPENIE

Thrombozytopenie ist definiert als eine Erniedrigung der Zellzahl der Blutplättchen in der Blutzirkulation. Sie ist eine der häufigsten erworbenen hämostatischen Störungen bei Mensch und Tier (Botsch, 2009). Eine Thrombozytopenie tritt auf, wenn die Entfernung von Blutplättchen aus der Zirkulation die Nachproduktion im Knochenmark übersteigt (Thomas, 2010). Die Korrelation zwischen Thrombozytenzahlerniedrigung und Blutung als klinischem

Symptom ist nur mäßig. So besteht bei einer Anzahl von weniger als $60 \times 10^9/l$ eine signifikante Blutungsneigung. Ein erhöhtes Blutungsrisiko ist für diese Tiere anzunehmen (Mischke, 2014), wenn auch nicht regelmäßig klinische Anzeichen für eine Blutung gesehen werden (Scott und Jutkowitz, 2010).

Unter der Anzahl von $30 \times 10^9/l$ kann die Blutungsneigung zu lebensbedrohlichen Blutungen führen, und die Gefahr von Blutungen, die ohne äußere Einwirkungen auftreten, sog. Spontanblutungen, erhöht sich deutlich bei Werten unter einer Grenze von $10 \times 10^9/l$ (Mischke, 2014). Typische klinische Anzeichen der gestörten primären Hämostase bei schwerer Thrombozytopenie sind häufig an den Schleimhäuten, den Pinnae, dem ventralen Abdomen sowie den Innenseiten der Schenkel zu finden. Es handelt sich dabei um punkt- oder flächenförmige Unterhauteinblutungen, sogenannte Petechien bzw. Ekchymosen. Blutungen, z. B. in die Augen, den Gastrointestinaltrakt oder die Harnblase sowie Zahnfleischbluten, Nasenbluten und vaginale Blutungen sind ebenfalls zu finden. Auch kann das betroffene Tier durch ungewöhnlich starke oder nicht endende Blutungen nach Oestrus oder Venenpunktion, Operation oder Trauma auffallen (Scott und Jutkowitz, 2010; Thomas, 2010). Die Ursachenabklärung ist aufgrund der hämorrhagischen Diathese von großer Bedeutung. Eine Unterscheidung bei Thrombozytopenie zwischen Hyperdestruktion und Hypoproduktion ist für die nachfolgende Diagnosefindung richtungsweisend (Barlage und Schmitz; 2007).

2.4.1 MECHANISMEN

Im Grunde können fünf Pathomechanismen, die zur Thrombozytopenie führen, unterschieden werden:

- erniedrigte oder gestörte Produktion von Thrombozyten im Knochenmark,
- erhöhte periphere Zerstörung,
- erhöhter peripherer Verlust,
- gesteigerter Verbrauch und
- Verteilungsstörungen.

In vielen Fällen liegen auch komplexe Mechanismen vor (Thomas, 2010).

2.4.1.1 VERRINGERTE THROMBOZYTENPRODUKTION

Die Ursachen für eine verringerte Produktion von Thrombozyten im Knochenmark sind vielfältig. Meist betreffen sie nicht nur die Megakaryozyten. Häufig sind auch andere Stammzelllinien entweder direkt oder durch Änderung des sie umgebenden Mikromilieus betroffen (Thomas, 2010). Die auf Knochenmarksebene erzeugte Zytopenie geschieht zum einen durch Knochenmarksuppression mit zellarmem Knochenmark, zum anderen über eine Dysmyelopoese, bei der das Knochenmark eine normale oder erhöhte Zellzahl aufweist (Weiss, 2010b).

2.4.1.1.1 PRIMÄRE KNOCHENMARKERKRANKUNGEN

Zu den primären Knochenmarkerkrankungen, welche die Thrombozyten bzw. Megakaryozyten betreffen können, zählen unter anderem die aplastische Anämie (AA), myelo- oder lymphoproliferative Erkrankungen, das Myelodysplastische Syndrom (MDS), die Myelofibrose, das Hämophagozytäre Syndrom und Metastasen des Knochenmarks (Kohn, 2012). Bei der AA sind frühe Vorläuferzellen oder Stammzellen geschädigt, womit alle Zellreihen entweder vermindert sind oder fehlen. Die Ursache ist oft nicht ermittelbar; Gründe können aber Infektionserreger wie Parvoviren, Leishmanien, Immunerkrankungen, ionisierende Strahlung oder Toxine (z. B. Schwermetalle) und auch Östrogen sein (Kohn, 2012). Hämatopoetische Erkrankungen können je nach Stammzellreihe in lympho- und myeloproliferativ eingeteilt werden. Demnach sind bei Erstgenannten die Lymphozyten betroffen, bei Letztgenannten alle Leukozyten ausser den Lymphozyten, erythroiden Zellen und Thrombozyten oder ihren Vorläuferzellen, den Megakaryozyten (Raskin et al., 2011).

Lympho- und myeloproliferative Erkrankungen können in einer Myelophthise enden, d.h. einer Verdrängung der natürlich vorkommenden Zellen im Knochenmark durch neoplastische Zellen (Mischke, 2003).

Zu den lymphoproliferativen Erkrankungen gehören z. B. die akuten und chronischen Leukämien, die B- bzw. T-Zellen sowie große, granuliert Lymphozyten betreffen können. Der häufigste Vertreter der lymphoproliferativen Erkrankungen, das maligne Lymphom, tritt nicht im Blut auf sondern als Infiltration in Organe bzw. als solider Tumor. Auch Plasmazellleukämien bzw. -tumoren wie das multiple Myelom oder Plasmozytome zählen zu diesen Erkrankungen. Zu den myeloproliferativen Erkrankungen wird neben der akuten auch die chronische myeloische Leukämie gezählt. Diese Einteilung erfolgt entsprechend der betroffenen Zellen in die chronisch myeloische Leukämie (CML) im engeren Sinne, welche die neutrophilen Granulozyten betrifft, sowie die chronische eosinophile, basophile, monozytäre und myelomonozytäre Leukämie, die Polycythaemia (rubra) vera, primäre essentielle Thrombozytämie und myelodysplastischen Syndrome (Mischke, 2014, Moritz und Bauer, 2014).

Beim MDS unterscheidet man das primäre und das sekundäre myelodysplastische Syndrom. Bzgl. der Kriterien existiert noch keine klare Festlegung für das primäre MDS des Hundes. Vereinfacht wird bisher eingeteilt in:

- MDS mit refraktärer Zytopenie: MDS-RC
- MDS mit erythroider Prädominanz: MDS-ER
- MDS mit Blastenexzess (excess blasts): MDS-EB
- MDS mit sideroblastischer Differenzierung (sehr selten vorkommend)

Eine eindeutige Unterscheidung zwischen primärem und sekundärem MDS ist nicht immer einfach zu treffen. Die Diagnose des sekundären MDS wird gestellt durch das Auftreten von dysplastischen hämatopoetischen Zellen in Assoziation mit Medikamenten oder Toxinen. Es sollten zur Unterscheidung immer mögliche Auslöser wie Toxine, Medikamente, Immunerkrankungen oder auch Neoplasien erfragt bzw. untersucht werden (Moritz und Bauer, 2014)

Die Myelofibrose betreffend, unterscheidet man eine primäre oder idiopathische Myelofibrose, die eine seltene chronisch myeloproliferative Erkrankung darstellt, von der sekundären Myelofibrose. Die sekundäre Myelofibrose entsteht durch die Proliferation von Fibroblasten, Kollagen oder Retikulinfasern im blutbildenden Raum des Knochenmarks. Sie

tritt relativ häufig auf; das Blutbild der Betroffenen zeigt eine mittelschwere bis schwere, nichtregenerative Anämie, seltener Thrombozytopenie oder Leukopenie. Es wird angenommen, dass die Myelofibrose als reversible Antwort auf eine akute Knochenmarkverletzung entsteht. Neoplasien im sowie auch ausserhalb des Knochenmarks, Bestrahlung, Medikamente, angeborene Enzymdefekte und viele weitere Gründe kommen als Ursachen für die sekundäre Myelofibrose in Frage. Sie wird zudem mit der immunmedierten hämolytischen Anämie (IMHA) sowie intra- und extramedullären Neoplasien in Verbindung gebracht. Allgemein leidet eine Vielzahl erkrankter Hunde an mittelgradiger bis hochgradiger, nichtregenerativer Anämie und einige davon auch an Thrombozytopenie (Weiss, 2010c).

Beim hämophagozytären Syndrom handelt es sich um eine Störung der aktivierten Fresszellen, die durch gutartige Proliferation gekennzeichnet ist und deren Pathogenese noch nicht geklärt werden konnte. In der Regel reagiert das Knochenmark auf die peripher vermehrte Phagozytose von Blutkörperchen meist mehrerer Zelltypen mit verstärkter Nachproduktion (Weiss und Souza, 2010). In nachträglicher Auswertung waren 3,9% aller Knochenmarkuntersuchungen von Hunden einer Klinik hinweisend auf dieses Syndrom (Weiss, 2007).

Die betroffenen Hunde können Fieber, Leber- und Milzvergrößerung sowie Gelbsucht und Durchfall zeigen. Bei Hunden kann die Erkrankung entweder idiopathisch oder in Verbindung mit Infektionen, immunmedierten und neoplastischen oder myelodysplastischen Geschehen gebracht werden. Erkrankungen, die zu Verwechslungen mit dem hämophagozytären Syndrom führen können, sind z. B. die maligne Histiozytose, granulomatöse Entzündungen und monozytäre und myelomonozytäre Leukämien (Weiss und Souza, 2010).

Eine Metastasierung, d.h. eine Ausbreitung des Primärtumors in das Knochenmark, ist bei vielen Tumoren möglich. Metastatische Karzinome und Melanome können zu einer Myelophthise, d.h. einer Verdrängung von hämatopoetischen Zellen im Knochenmark führen (Mischke, 2003).

2.4.1.1.2 MEDIKAMENTE, HORMONE, TOXINE, BESTRAHLUNG

Unterschieden werden müssen die Medikamentennebenwirkungen vom Typ A, wie sie bei zytostatischen Chemotherapeutika wie z. B. Cyclophosphamid, Vincristin oder Doxorubicin auftreten, von den idiosynkratischen Reaktionen (Typ B), die von verschiedensten Medikamenten hervorgerufen werden können. Bei Ersteren ist die Suppression vorhersagbar und abhängig von der Dosis. Außerdem kann eine Erholung der Knochenmarkfunktion nach Absetzen des Arzneimittels erwartet werden. Handelt es sich jedoch um eine idiosynkratische Reaktion auf ein Medikament, so ist meist eine dosisunabhängige Reaktion eigentümlich, die auch erst Monate nach der Verabreichung des Arzneistoffs in Erscheinung treten kann.

Es können Antineoplastika bei allen Tierarten eine Myelosuppression sowie Dysmyelopoese auslösen. Es handelt sich dabei um einen Klasseneffekt (Weiss, 2010a). Chemotherapeutika rufen verschiedene DNA-Reaktionen durch z. B. DNA-Basenbindung (Platinverbindungen), Alkylierung (z. B. Lomustin) oder zyklusabhängige selektive DNA-Synthesehemmung (z. B. Cytarabin) hervor (Frey und Althaus, 2010). Daher sind die sich in kurzen Abständen teilenden Vorläuferzellen im Knochenmark besonders empfindlich für diese Medikamentengruppe. Die Auswirkungen sind bei dieser TYP A Nebenwirkung vorhersagbar, die Thrombozytopenie tritt 9-14 Tage nach Myelosuppression auf. Etwa 3-4 Tage nach Absetzen der Therapie ist eine Erholung der Knochenmarkfunktion zu erwarten (Weiss, 2010a). Die Myelosuppression betrifft normalerweise alle Zellreihen, jedoch ist die Thrombozytopenie häufig dosislimitierend (Aster, 2013). Cyclophosphamid, Cytosin Arabinosid, Doxorubicin, Vinblastin und Hydroxyurea besitzen hierbei hohes myelosuppressives Potenzial (Weiss, 2010a). So wurde bei Hunden, die den Mitosehemmer Vinblastin erhielten, eine Verringerung der Plättchenzahl auf $50 \times 10^9/l$ bis $70 \times 10^9/l$ festgestellt (Botsch, 2009). Dagegen besitzen Kortikosteroide, L-Asparaginase und Bleomycin nur eine geringe die Hämatopoese unterdrückende Wirkung im Knochenmark (Weiss, 2010a). Medikamente, die häufig an einer idiosynkratischen Reaktion beteiligt sein können sind z. B. Antikonvulsiva, Sulfonamide und Goldsalze, wie sie bei rheumatischer Arthritis eingesetzt werden, sowie nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs). Der genaue zugrundeliegende Mechanismus bzw. die molekulare Basis der Thrombozytopenie bleibt oft unbekannt, so können z. B. Alpha und Gamma-Interferone über Proliferationshemmung von Stammzellen und Megakaryozyten eine milde bis mittelgradige Thrombozytopenie hervorufen. Man nimmt eine Mutation des Interferonsignalweges an. Anagrelid, ein Arzneistoff aus der Gruppe der Imidazolidin-Verbindungen, verursacht eine isolierte

Thrombozytopenie und man geht von Wechselwirkungen mit der Megakaryozytenreifung aus. Linezolid, ein Oxazolidinonantibiotikum, das bei Resistenzen in Zusammenhang mit bakteriellen Infektionen verwendet wird, führt bei bis zu einem Drittel der Patienten bei über zehntägiger Gabe zur Thrombozytopenie. Die Dosisabhängigkeit ist bekannt, der Mechanismus der zur Knochenmarksuppression führt, ist jedoch unbekannt (Aster, 2013). Die medikamentenassoziierten Wirkungen weiterer Arzneimittel auf das Knochenmark sind in folgender modifizierter Tabelle nach Weiss dargestellt (Weiss, 2010a). Zu beachten ist, dass auch andere Prozesse ausserhalb des Knochenmarks, z.T. auch gleichzeitig, zu einer peripheren Reduktion der Zellen führen können (z. B. immunmediierter oder oxidativer Schaden), und dass hier nur die Wirkung auf das Knochenmark dargestellt ist.

Medikament	Auswirkungen auf das Knochenmark
Östrogen	MS
Phenylbutazon	MS
Meclofenamic acid	MS
Azathioprin	MS
Chloramphenicol	D
Cephalosporin	MS, D
Sulfonamid	MS
Phenobarbital	MS
Phenytoin	MS
Levamisol	MS
Albendazol	MS
Metronidazol	MS
Fenbendazol	MS
Captopril	MS
Mitotane	MS
Colchicin	MS

Tab. 1: modifizierte Tabelle nach (Weiss, 2010a), nur Auswirkungen auf das Knochenmark sind dargestellt

MS: Myelosuppression; D: Dysplasie

Toxine wie Benzol, DDT, Schwermetalle und zyklische Kohlenwasserstoffe wirken myelotoxisch und können ein zellarmes Knochenmark verursachen (Mischke, 2003).

Sowohl endogene wie auch exogen zugeführte Östrogene können zu einer Stammzellunterdrückung im Knochenmark mit nachfolgender Panzytopenie führen. Zusätzlich blockiert dieses Hormon die Wirkung von Erythropoetin. Körper eigene Gründe für einen erhöhten Östrogenspiegel sind z. B. der Sertollizelltumor des Rüden oder Ovarialzysten sowie -tumoren der Hündin.

Nach einer initialen Thrombozytose und Leukozytose ist eine Thrombozytopenie und Leukopenie sowie, im Endstadium, eine Panzytopenie mit zusätzlich nichtregenerativer, normochromer, normozytärer Anämie sichtbar. Sind alle Zellreihen betroffen, spricht man auch von der oben bereits genannten aplastischen Anämie (Kohn, 2012).

Ionisierende Strahlen sind das klassische Beispiel für eine physikalische Noxe, die dosisabhängig und vorhersagbar zu aplastischer Anämie führt (O'Rourke, 2010).

2.4.1.1.3 INFEKTIONEN UND VAKZINATION

Verschiedene Infektionserreger wie Parvoviren, Staupeviren, Ehrlichien, Anaplasmen, Leishmanien, Dirofilarien oder auch verschiedene Protozoen können eine Thrombozytopenie hervorrufen (Kohn, 2012). Knochenmarkveränderungen durch Infektion mit *E. canis* sind am besten dokumentiert. Chronische Ehrlichiose kann eine Panzytopenie verursachen; das Knochenmark zeigt sich hierbei stark zellvermindert (Wardrop, 2010). Eine Bildungsstörung kann auch nach Vakzination auftreten (Kohn, 2012). Eine schwere, die erythroide und megakaryozytäre Zellreihe betreffende Aplasie trat 7-21 Tage nach Impfung mit modifiziertem Parvovirose-Lebendvirus auf (Weiss, 2010d). Staupevakzination wurde als thrombozytopenieassoziiert diskutiert. Eine Thrombozytopenie trat acht Tage nach Impfung eines Hundes mit modifiziertem Lebendstaupevirus auf. Nach ca. fünf Tagen normalisierte sich die Plättchenzahl (McAnulty und Rudd, 1985). In Beschreibungen über Thrombozytopenien im Zusammenhang mit Staupeimpfungen waren die Megakaryozyten im Knochenmark entsprechend geimpfter Hunde nicht reduziert (Lachowicz et al., 2004).

2.4.1.1.4 HEREDITÄRE PRODUKTIONSSTÖRUNGEN

Eine bekannte Erbkrankheit beim Cavalier King Charles Spaniel, die sowohl homozygot als auch heterozygot auftritt, ist die angeborene Makrothrombozytopenie, die auf einen Beta 1-Tubulindefekt zurückgeht. Erniedrigte Thrombozytenzahlen und erhöhtes MPV sind hierbei die hämatologischen Befunde (Davis et al., 2008). Diese Isoform des Tubulins ist für die Proplatelet-Bildung, die Beschaffenheit der Mikrotubuli in den Blutplättchen und den Erhalt der Scheibenform der Thrombozyten verantwortlich (Schwer et al., 2001). Eine weitere hereditäre Erkrankung, die ebenfalls mit der Bildung von großen Thrombozyten unter dem Referenzbereich einhergeht, kommt auch bei Norfolk Terriern vor. Von 14 verwandten Norfolk Terriern konnte bei 11 Tieren eine Makrothrombozytose und Thrombozytenzahlen

unter $100 \times 10^9/l$ festgestellt werden. Allerdings war die mit dem QBC (quantitative buffy coat) anhand des gemessenen Thrombokrits errechnete Anzahl an Blutplättchen im Referenzbereich. Die Tiere zeigten klinisch keinerlei Auffälligkeiten (Gelain et al., 2010b).

Die zyklische Hämatopoese tritt beim Grey Collie auf und betrifft in erster Linie die neutrophilen Granulozyten; allerdings sind auch andere Zellreihen, darunter die Thrombozyten, betroffen. Die Erkrankung wird autosomal-rezessiv vererbt. Die verschiedenen Zelllinien sind in gleichen Abständen zu verschiedenen Zeitpunkten erniedrigt. Die genauen Mechanismen, die dazu führen, sind noch nicht ausreichend geklärt. Die Lebensdauer der Tiere ist verringert (Mischke, 2003).

2.4.1.2 ERHÖHTE PERIPHERE ZERSTÖRUNG

Eine erhöhte Zerstörung von Blutplättchen in der Peripherie kann mit oder ohne Beteiligung des Immunsystems geschehen.

2.4.1.2.1 IMMUNMEDIIERTE THROMBOZYTOPENIE (ITP)

Die klinische Terminologie bzgl. der ITP variiert in der Fachliteratur. So sind zum einen unter der Abkürzung ITP verschiedene Bezeichnungen als auch, zum anderen für die immunmedierte Thrombozytopenie unterschiedliche Abkürzungen zu finden. So wird das Akronym in der Humanmedizin z. B. für die idiopathische thrombozytopenische Purpura benutzt (Lewis und Meyers, 1996) oder auch für die immunmedierte thrombozytopenische Purpura (Psaila und Bussel, 2013). Wilkerson wiederum benutzt für die immunmedierte Thrombozytopenie den Term IMT (Wilkerson et al., 2001). Ein Expertengremium der Humanmedizin beschloss aufgrund des vorherrschenden immunmedierten Aspektes, den Term idiopathisch gegen immunmediert auszutauschen. Aufgrund der möglichen Abwesenheit von Blutungen sollte der Begriff „Purpura“ vermieden werden. Im Hinblick auf Literaturrecherchen und aus Respekt vor der langjährigen und häufigen Verwendung wurde der Term ITP erhalten, aber zukünftig geltend als Abkürzung für „immunmedierte Thrombozytopenie“ (Rodeghiero et al., 2009).

ITP ist die häufigste Ursache für schwere Thrombozytopenien beim Hund (Botsch, 2009). Hunde erkranken alters- und rasseunabhängig. Hündinnen sind häufiger betroffen als Rüden. Eine Prädisposition liegt unter anderem für die Rassen Cocker Spaniel, Irish Setter, Bobtail, Pudel und Golden Retriever vor (Kohn, 2012). Es werden im Zusammenhang mit der ITP noch die Rassen alter englischer Schäferhund und Deutscher Schäferhund erwähnt (Scott und Jutkowitz, 2010).

Hunde mit einer ITP können u.a. mit Petechien bzw. Ekchymosen, Blutungen am Zahnfleisch, im Auge (Sklera- oder Retinablutungen), aus der Nase, blutigem Urin, blutigem Kot oder Meläna vorstellig werden. Die Thrombozytopenie kann jedoch auch zufällig gefunden werden. Denn obwohl Hunde in der hämatologischen Untersuchung niedrige Thrombozytenzahlen aufweisen, ist es möglich, dass nur geringgradige oder keine Blutungen auftreten (Kohn, 2012). In der Humanmedizin, in der ebenfalls niedrige Thromozytenzahlen ohne Blutungen auftreten können, wird vermutet, dass dies mit dem Vorkommen von

hämostatisch aktiven thrombozytären Mikropartikeln im Zusammenhang steht (Nieuwland et al., 2013).

Bei Kindern nach myeloablativer Therapie ist das Blutungsrisiko deutlich höher als bei ITP trotz vergleichbar erniedrigter Thrombozytenzahl. Daraus lässt sich schließen, dass die alleinige Betrachtung der Thrombozytenzahl nicht ausreicht, um eine Prognose hinsichtlich des Risikos von auftretenden Blutungen abzugeben (Schulze, 2010). Bei der caninen ITP liegen Antikörper vor, die an die Thrombozytenoberfläche binden. Damit verkürzt sich die normale Verweildauer der zirkulierenden Thrombozyten im Blut deutlich, da die mit Antikörpern beladenen Plättchen vor allem in Milz und Leber durch Makrophagen abgebaut werden (Kohn, 2012). Lewis und Meyers geben an, dass beim Hund überwiegend Milzmakrophagen für die Entfernung von gering antikörperbeladenen Thrombozyten zuständig sind, während stark beladene zusätzlich von Lebermakrophagen der Zirkulation entzogen werden (Lewis und Meyers, 1996). Außerdem scheint die Leber beim Menschen für die Entfernung von gealterten Thrombozyten verantwortlich zu sein (Josefsson et al., 2013)

In der Humanmedizin werden verschiedene Pathomechanismen bzw. deren Zusammenspiel für die Entstehung der ITP angegeben. Erstens geht man davon aus, dass die auf ihrer Oberfläche mit Anti-Thrombozyten-Antikörpern beladenen Plättchen im retikuloendothelialen System Fc γ -rezeptorvermittelt phagozytiert werden. Die häufigsten antigenen Epitope stellen GPIIb/IIIa und GPIb/IX dar. Eine Bindung durch Antikörper führt zu ihrer Markierung, so dass sie durch phagozytierende Zellen aus der Zirkulation entfernt werden. Antithrombozytäre Antikörper sind nur bei etwas mehr als zwei Dritteln der Patienten mit ITP nachweisbar und laut Aussagen der Autoren mangelt es Tests auf Autoantikörper an ausreichender Spezifität (Psaila und Bussel, 2013).

Zweitens spielen Dysregulationen der T-Zellen bzw. Komplementstörungen eine Rolle. So tritt ITP auch bei T-Zell-Defektimmunopathien wie z. B. dem DiGeorge-Syndrom auf (Psaila und Bussel, 2013). Die T-Lymphozyten scheinen keine Apoptose einzugehen, was wahrscheinlich damit zu erklären ist, dass die Entfernung von autoreaktiven Zellen nur unzureichend funktioniert (Scott und Jutkowitz, 2010). Die T-Helferzellen fördern die Entstehung von B-Zellklonen. Diese sind für die Sekretion der antithrombozytären Immunglobuline zuständig. Gleichzeitig sind regulatorische T-Zellen in Anzahl und Funktion reduziert, so dass keine Regulation der T-Helferzellen stattfindet. Desweiteren können zytotoxische T-Zellen direkt auf Thrombozyten und Megakaryozyten einwirken, wobei unbekannt ist, wie häufig dies bei ITP-Patienten tatsächlich auftritt bzw. welchen Anteil es an

einer Therapieresistenz haben könnte. Störungen im klassischen Komplementweg können dazu führen, dass die Antigen/Antikörper-Komplexe nicht aus der Zirkulation entfernt werden, so dass Antigene länger vorliegen. Ein erniedrigter Komplementfaktor C4 konnte bei ITP nachgewiesen werden sowie eine Erniedrigung aller Komplementfaktoren beim systemischem Lupus Erythematoses.

Drittens wird von einer suboptimalen Bildung von Blutplättchen im Knochenmark bei Patienten mit ITP ausgegangen. In einer Studie mit ITP-Patienten wurden Thrombozyten markiert. Es konnte lediglich ein normaler bis minimal erhöhter Thrombozyten „turnover“ festgestellt werden und nicht, wie zu erwarten gewesen wäre, eine erhöhte Nachproduktion.

Außerdem waren die Serumkonzentrationen von Thrombopoetin (TPO) ebenfalls normal bis geringgradig erhöht; diese sollten jedoch bei sehr niedrigen Plättchenzahlen hoch sein, da ja keine Thrombozyten vorliegen, um TPO zu binden (Psaila und Bussel, 2013).

Hierzu muss aber erwähnt werden, dass die TPO Spiegel bei der ITP durchaus normal sein können, da das Knochenmark in diesem Fall reich an Vorläuferzellen ist (Schulze, 2008). Auch wird davon ausgegangen, dass besonders bei erhöhter Megakaryozytenzahl und –größe TPO auch an den c-mpl Rezeptor der Megakaryozyten im Knochenmark binden kann (Boudreaux, 2010). Die Bindung von TPO an seinen Rezeptor könnte dazu führen, dass ein niedrigerer TPO-Serumspiegel als erwartet erreicht wird (Boudreaux, 2010). Außerdem kann TPO noch von kurz zuvor vorhandenen Thrombozytenrezeptoren auf diesen gebunden und abgebaut worden sein (Bergmann, 2006). Weiter werden zur Theorie der suboptimalen Thrombopoese zwei Studien genannt, in denen nachgewiesen werden konnte, dass Sera von an ITP leidenden Patienten bzw. die darin enthaltenen Antikörper die Megakaryozytenreifung und -differenzierung hemmen konnte. In einer dieser Studien wurde die Megakaryopoese von Ratten verglichen, bei denen entweder über Antithrombozyten-Serum oder Thrombozytapherese eine Reduktion der Thrombozytenzahl induziert wurde. Bei der Antikörper-vermittelten Thrombozytopenie konnten im Gegensatz zur mechanisch induzierten Thrombozytopenie Störungen der Megakaryozytenreifung und -differenzierung festgestellt werden (Psaila und Bussel, 2013).

Es scheint, dass immunbedingt sowohl eine reduzierte als auch eine erhöhte, allerdings funktionseingeschränkte Anzahl an Megakaryozyten vorkommen kann. So gibt Botsch an, dass sich bei der immunmedierten Megakaryozytenhypoplasie megakaryozytenspezifische Antikörper gegen diese richten und sie zerstören, was sich in der Knochenmarkuntersuchung dann als reduzierte Anzahl oder Fehlen von Megakaryozyten darstellt (Botsch, 2009). Binden dagegen Antikörper, die gegen Thrombozyten gerichtet sind, an ihre reifen Vorläuferzellen,

so werden diese oft nur morphologisch und funktionell beschädigt, nicht aber zerstört (Lachowicz et al., 2004). Auch wird erwähnt, dass in der Humanmedizin viele antithrombozytäre Antikörper auf den Epitopen von Megakaryozyten binden und so die Reifung der Megakaryozyten und die Thrombopoese verhindern. Da dies trotz normaler oder erhöhter Megakaryozytenzahl im Knochenmark geschieht, wird dazu geraten, differenziert von gesteigerter Megakaryopoese zu sprechen und keine Gleichsetzung mit der Thrombopoese vorzunehmen. Selten wurde auch darüber berichtet, dass sich Auto-Antikörper gegen Zytokine richten können, welche die Hämatopoese beeinflussen und so eine immunmedierte Thrombozytopenie verursachen können (Scott und Jutkowitz, 2010). Weiter fassen die Autoren zusammen, dass eine Mischung aus genetischer Disposition, immunologischen Abläufen, weiteren Umständen wie Infektionen sowie auch die variable Bedeutung der verschiedenen Signalwege die Heterogenität widerspiegeln, mit der die ITP bei unterschiedlichen Patienten auftritt (Psaila und Bussel, 2013).

Grundsätzlich wird die primäre von der sekundären ITP unterschieden. Erstere wird auch als autoimmun oder idiopathisch bezeichnet, hier sind spezifische Autoantigene, das heisst Glykoproteine wie das Fibrinogenrezeptorantigen GPIIb/IIIa, Ziel der Autoantikörper, die mit ihrem Fab-Fragment binden (Tab. 2, Nr. 1) (Wilkerson et al., 2001; Scott und Jutkowitz, 2010). Bei den Antikörpern muss es sich nicht zwingend um Auto-Antikörper handeln, die Fab-assoziiert an Auto-Antigene binden. Bei der Transfusionsreaktion oder der neonatalen Alloimmunthrombozytopenie handelt es sich um Allo-Antikörper, die an Allo-Antigene binden (Tab. 2, Nr. 2) (Scott und Jutkowitz, 2010). Der auslösende Stimulus zur Antikörperproduktion konnte bis dato bei der primären ITP nicht ermittelt werden. Erst nach Ausschluss aller anderen in Frage kommenden Ursachen kann die primäre ITP diagnostiziert werden (Lewis und Meyers, 1996).

Bei der sekundären ITP gibt es zahlreiche in Frage kommende Ursachen. So können Entzündungen infektiöser wie auch nichtinfektiöser Natur (z. B. bedingt durch Blutparasiten) oder eine sterile Pankreatitis eine sekundäre ITP verursachen (Scott und Jutkowitz, 2010). Bei 3-18% einer in der Fachliteratur beschriebenen Studie an thrombozytopenischen Hunden lag eine (nicht-)infektiöse ITP vor. Die große Schwankungsbreite läßt sich teilweise dadurch erklären, dass die Patienten aus verschiedenen Regionen kamen, in denen das Auftreten der verursachenden Infektionserreger wie Rickettsien oder Herzwürmer verschieden stark ausgeprägt war (Lewis und Meyers, 1996). Weiterhin können Neoplasien oder unerwünschte Arzneimittelwirkungen von z. B. NSAIDS oder Cephalosporinen zur ITP führen (Kohn, 2012).

In der Veterinärmedizin ist die Erkrankung außerdem assoziiert mit z. B. Pemphigus und rheumatoider Arthritis; zudem wurde eine Thrombozytopenie bei im Jungtieralter auftretendem Polyarthritis-Syndrom der Rasse Akita beschrieben (Scott und Jutkowitz, 2010). Auch ein systemischer Lupus erythematoses (SLE) kann eine ITP auslösen (Kohn, 2012). In der Humanmedizin tritt die ITP bei Patienten mit bestimmten Erkrankungen, die mit einer abnormalen Antikörperproduktion einhergehen, wie z. B. der chronischen lymphatischen Leukämie, deutlich häufiger auf als in der restlichen Population. Bei einem Mangel an reifen B-Zellen und damit fehlenden Antikörpern wie bei der x-chromosomal vererbten Agammaglobulinämie dagegen kommt die Erkrankung nicht verstärkt vor (Psaila und Bussel, 2013).

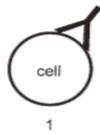
Von einer sekundären ITP ist erst die Rede, wenn der verantwortliche Immunmechanismus im Rahmen einer umfassenderen Autoimmunerkrankung oder assoziiert mit bekannten Erkrankungen die Thrombozytopenie verursacht. Die zugrundeliegenden Erkrankungen sollten bekannt dafür sein, prädisponierend für die Entstehung zu wirken (Scott und Jutkowitz, 2010).

Bei Neoplasien liegt häufig ein multifaktorielles Geschehen für den Plättchenmangel mit verschiedenen, einzeln oder kombiniert auftretenden Mechanismen zu Grunde. Bei 10% der Hunde mit Neubildungen in einer Studie entstand ein Plättchenmangel ohne Beteiligung des Immunsystems (Schwandt-Müller, 2013). Auch ein Immunmechanismus kann zur Zerstörung der Plättchen beitragen (Scott und Jutkowitz, 2010). Paraneoplastisch immunmedierte Thrombozytopenien beim Hund sind bekannt. Hunde mit malignem Lymphom scheinen für die immunmedierte Zerstörung der Thrombozyten empfänglich zu sein (Schwandt-Müller, 2013). Andere nichthämatopoetische und hämatopoetische Tumoren wurden im Zusammenhang mit der ITP beschrieben. Der gleichzeitige Nachweis von antithrombozytären Immunglobulinen spricht für ein beteiligtes Immungeschehen (Scott und Jutkowitz, 2010).

Ähnlich bzgl. der multifaktoriellen Ursache verhält es sich bei Infektionen. Die genaue Pathogenese ist auch bei infektionsassoziierten Thrombozytopenien nicht immer voll verstanden. Ein immunmediierter Mechanismus soll bei verschiedenen Rickettsieninfektionen vorhanden sein, so z. B. bei der akuten *Ehrlichia canis* Infektion. So waren platelet surface-associated Immunglobuline G (PSAIgG) sowie freie Serum-Antikörper gegen Thrombozyten bei experimentell und natürlich infizierten Hunden nachweisbar. Vorgefundene Antikörper gegen Erythrozyten legen den Schluss nahe, dass die Immunreaktion nicht nur auf die Thrombozyten beschränkt sein muss. Weitere mit der ITP in Verbindung gebrachte Infektionserreger sind z. B. Anaplasmen, Dirofilarien, Babesien, Leishmanien, Histoplasmen,

canine Staupeviren (Scott und Jutkowitz, 2010) und Angiostrongylus (Kohn, 2012). Auch eine Beteiligung der ITP bei Hunden mit Pilzerkrankungen ist nicht ausgeschlossen (Scott und Jutkowitz, 2010).

Bei der sekundären ITP können Antikörper auf verschiedene Weise an Thrombozyten binden. Ihr Fab-Fragment ermöglicht die Bindung an anhaftende Antigene von Infektionserregern, an Medikamente oder Neoplasien (Tab. 2, Nr. 3). Ebenso sind IgG-Moleküle in der Lage, an normalerweise verdeckte Antigene, sog. Kryptantigene, oder auch neu gebildete Antigene, sog. Neoantigene, zu binden (Tab. 2, Nr. 4). Voraussetzung hierfür ist, dass die immunogenen Strukturen durch Membranstörung entstehen bzw. freigelegt werden. Diese Oberflächenmodifizierung kann durch verschiedene Moleküle ausgelöst werden (Flegel und Wagner, 2010; Scott und Jutkowitz, 2010). Sogar die Bindung an eine Kombination aus adsorbiertem Antigen und Krypt- oder Neoantigen ist möglich (Tab. 2, Nr. 5). Eine Fc γ -rezeptorvermittelte Bindung von Antigen/Antikörper-Komplexen kommt bei manchen Spezies wie Primaten vor (Tab. 2, Nr. 6). Desweiteren kann die Bindung in Form von Immunkomplexen komplementaktiviert erfolgen (Tab. 2, Nr. 7). Zirkulierende Immunkomplexe können im Rahmen von Medikamentengaben, Infektionen und Neoplasien oder auch bei systemischen Autoimmunerkrankungen entstehen. Deshalb kann die sekundäre ITP in letzterem Fall laut Scott und Jutkowitz (2010) auch als autoimmun bezeichnet werden.

 <p>1</p>	<p>Primäre ITP: Fab-mediierte Auto-Antikörperbindung an Auto-Antigene</p>
 <p>2</p>	<p>Fab-mediierte Allo-Antikörperbindung an Allo-Antigene</p>
 <p>3</p>	<p>Antikörperbindung über adsorbiertes Antigen von Erregern, über Arzneien und Neoplasien</p>
 <p>4</p>	<p>Bindung an immunogene Strukturen, entstanden oder freigelegt durch Membranstörung</p>
 <p>5</p>	<p>Bindung an eine Kombination aus adsorbiertem Antigen und immunogenen Strukturen</p>
 <p>6</p>	<p>Fc-gebundener Antigen/Antikörper-Komplex</p>
 <p>7</p>	<p>Komplement gebundener Antigen/Antikörper-Komplex</p>
 <p>8</p>	<p>Immunglobulin Immunkomplex</p> <p>Adsorbiertes Antigen</p> <p>Gestörte Oberflächenmembran mit Neoantigen- oder Kryptantigenexposition</p> <p>Komplement</p>

Tab. 2: Mechanismen der Antikörperbindung bei primärer bzw. sekundärer immunmediierter Thrombozytopenie (ITP) an eine Zelle modifiziert nach (Scott und Jutkowitz, 2010)

Selleng und Greinacher unterscheiden in der Humanmedizin bei den medikamenteninduzierten Immuthrombozytopenien (MIT) 4 Formen:

Die erste Form ist eine Thrombozytopenie durch antithrombozytäre Antikörper, deren Bildung sowie Bindung von dem Medikament abhängig ist. Das heisst, das Arzneimittel induziert diese Antikörper und sie binden ausschließlich in Gegenwart des Medikamentes oder seinen Metaboliten. (Selleng und Greinacher, 2006). Dies wird auch unter anderem für den Hund beschrieben (Scott und Jutkowitz, 2010). Die Antikörper sind spezifisch für das Medikament, das heisst, sie werden ausschließlich in Anwesenheit des Medikaments gebildet. Entweder tritt die Thrombozytopenie 1 bis 2 Wochen nach dem Beginn der Gabe eines neuen Arzneimittels oder nach einmaliger Anwendung bei vorangegangener sporadischer Einnahme auf. Die Antikörper können noch Jahre später im Blut nachgewiesen werden, weshalb die Einnahme dieses Medikaments vermieden werden sollte (George und Aster, 2009). Erst nach Abbau des Medikaments bzw. seines Metaboliten ist eine Erholung der Thrombozytenzahl möglich. Zur Antikörperbindung existieren verschiedene Theorien (Selleng und Greinacher, 2006).

Zum einen kann ein Medikament die Bindung der Immunglobuline an die Thrombozyten forcieren, indem es entweder nichtkovalent an das Fab-Fragment der Antikörper oder bzw. und an Glykoproteine auf der Plättchenoberfläche bindet und so die Bindungskapazität der Immunglobuline steigert (z. B. Sulfonamide) (Aster, 2013). Zum anderen können Immunkomplexe, gebildet mit dem Medikament, auftreten. Außerdem sind Medikamente wie z. B. Penicillin in der Lage, als Hapten zu fungieren. Sie binden kovalent an Membranglykoproteine und induzieren so eine Antikörperantwort (Aster, 2013).

Die zweite Form, die auch beim Hund beschrieben wird (Scott und Jutkowitz, 2010) ist die medikamenteninduzierte Thrombozytopenie durch Auto-Antikörper. Hier wird die Auto-Antikörperbildung durch das Medikament hervorgerufen. Die Immunglobuline binden jedoch auch ohne die Anwesenheit der Arznei. Beim Menschen wird davon berichtet, dass dies besonders bei der Behandlung mit Gold auftreten kann. Beim Menschen reagieren die durch dieses Edelmetall induzierten Antikörper oft mit Epitopen auf GPV auf Thrombozyten (Selleng und Greinacher, 2006).

Die dritte Form wird durch GPIIb/IIIa-Inhibitoren induziert (Selleng und Greinacher, 2006). Humanmedizinische Arzneimittel die als Rezeptorantagonisten fungieren, können eine Konformationsänderung am Fibrinogenrezeptor auf den Thrombozyten herbeiführen, und diese so zum Ziel für Antikörper machen (Tirofiban). Bei dem

Thrombozytenaggregationshemmer Abciximab erkennen Antikörper den thrombozytenspezifischen GPIIb/IIIa gebundenen monoklonalen Antikörper als fremd (Aster, 2013). Inwieweit dies auch für den Hund zutrifft, ist unklar. In einer experimentellen Studie an sieben Hunden, die Tirofiban in unterschiedlicher Konzentration und in Kombination mit Heparin erhielten, hatte das Medikament keinen signifikanten Einfluss auf die Thrombozytenzahl (Rukshin et al., 2003).

Die vierte Form ist die in der Humanmedizin bei weitem häufigste medikamenteninduzierte Reduktion der Thrombozytenzahl unter den Referenzbereich. Es handelt sich um die heparininduzierte Thrombozytopenie (HIT). Die HIT führt im Gegensatz zu den anderen MITs nicht zu hämorrhagischer Diathese, sondern kann zu thrombembolischen Problemen führen. Stark gehäuft tritt diese Komplikation bei der Verwendung von unfraktioniertem Heparin (UFH) auf. Dabei bindet das Arzneimittel an PF4 und formt so immunogene Komplexe. Es kommt zur Bildung von Antikörpern, die an den PF4/Heparinkomplex binden und so ihrerseits im neuen Komplex die Thrombozytenrezeptoren über Bindung an deren Fc γ -Rezeptor vernetzen. Dadurch wird eine intravasale Gerinnung induziert und es kommt zu vermehrter Thrombinbildung und zur Thrombozytopenie (Selleng und Greinacher, 2006). Trotz weit verbreitetem Gebrauch von unfraktioniertem Heparin in der Veterinärmedizin (Brooks und Laforcade, 2010) scheint die HIT beim Hund nicht aufzutreten. Beim Pferd ist von einer heparinassozierten Thrombozytopenie die Rede, jedoch scheint die vermutlich durch Erythrozytenagglutination verursachte Anämie im Vordergrund zu stehen (Weiss, 2010a).

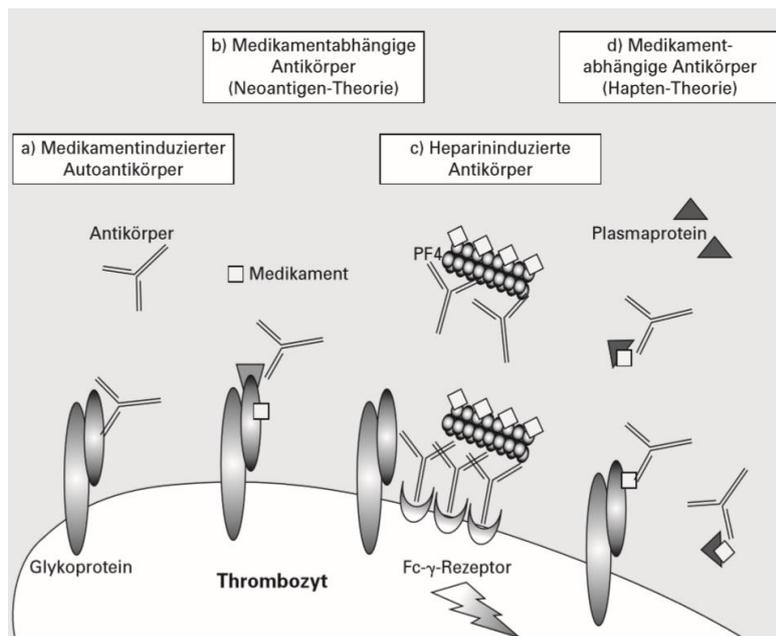


Abb. 3: mögliche Pathomechanismen der medikamenteninduzierten Thrombozytopenie

a) Autoantikörper werden durch das Medikament induziert, die Bindung erfolgt ohne das Medikament an den Glykoproteinrezeptor auf dem Thrombozyten.

b) durch unmittelbare Interaktion des Arzneimittels mit dem Glykoproteinrezeptor auf dem Blutplättchen kommt es zu dessen Konformationsänderung und Expression von Neoantigen. Dieses stellt das Ziel der Antikörper dar.

c) Heparin bildet mit PF4 einen Komplex; mit gegen diesen Komplex gebildeten Antikörpern entstehen daraus Immunkomplexe. Diese vernetzen die Fc γ 1a-Rezeptoren und es wird eine Aktivierung der Thrombozyten im Gefäß ausgelöst.

d) Die Antikörperbindung erfolgt an das Medikament, welches ein Hapten darstellt; das Medikament ist an ein Plasmaprotein gebunden, indirekt werden so die Thrombozyten mit Antikörpern beladen

PF4: Plättchenfaktor 4

entnommen aus Selleng und Greinacher, 2006, mit freundlicher Genehmigung des Marseille Verlags

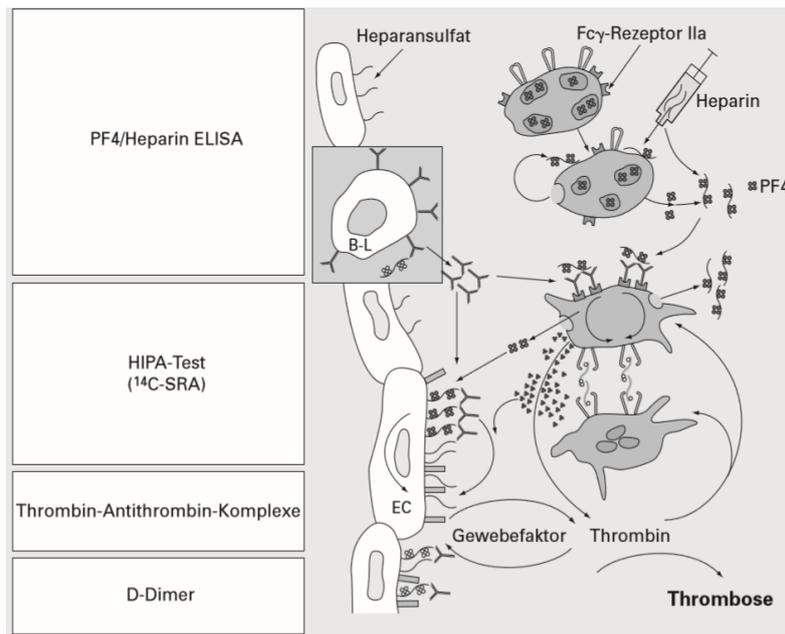


Abb. 4: Mechanismus der heparininduzierten Thrombozytopenie

Durch Bindung von HIT-IgG-Antikörpern an Epitope auf dem Antigenkomplex entstehen Immunkomplexe. Diese vernetzen auf der Thrombozytenoberfläche die FcγIIa-Rezeptoren, wodurch die Blutplättchen aktiviert werden. Schlußendlich kommt es durch kaskadenartige Gerinnungsaktivierung zur Bildung von Thrombin

Links in der Abbildung die die jeweilig ablaufende pathophysiologische Stufe erfassenden Labortests (Greinacher et al., 2003)

EC: Endothelzelle

B-L: B-Lymphozyt

PF4 : Plättchenfaktor 4

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

HIPA-Test: heparin-induzierter Plättchen-Aktivierungs-Test

14C-SRA: 14C-Serotonin release assay

D-Dimer: Spaltprodukt des Fibrins

entnommen aus Selleng und Greinacher, 2006, mit freundlicher Genehmigung des Marseille Verlags

Auch durch Hitzschlag kann es beim Hund zur Bildung von antithrombozytären Antikörpern kommen. So wurden bei vier Hunden, die nach einem Hitzschlag eine Thrombozytopenie entwickelten, entsprechende Antikörper nachgewiesen. Zuvor ging man davon aus, dass die Thrombozytopenie durch eine disseminierte intravasale Gerinnung (DIG) ausgelöst werde, jedoch konnten bei diesen vier Hunden keine D-Dimere als Hinweis auf eine DIG bestätigt werden (Zenker et al., 2009). Fällt ein Test auf antithrombozytäre Antikörper positiv aus, so ist für die Veterinärmedizin dennoch häufig ungeklärt, welche Form der Verbindung zwischen Antikörper und Thrombozytenoberfläche besteht (Scott und Jutkowitz, 2010).

Tritt zusätzlich zur ITP eine Anämie auf, so muss bedacht werden, dass zum einen beträchtliche Mengen an Blut auch z. B. in den Gastrointestinaltrakt verloren gehen können und zum anderen, dass ca. 30% der Hunde an einem Evans-Syndrom leiden (Kohn, 2012).

Die Kombination aus primärer ITP (pITP) und autoimmunhämolytischer Anämie (AIHA) wird als Evans-Syndrom bezeichnet (Day, 2010). Das bedeutet, dass sich nicht kreuzreagierende Antikörper spezifisch gegen Erythrozyten- und Thrombozytenantigene richten (Orcutt et al., 2010). In einer Studie konnten von 89 thrombozytopenischen Hunden mit nachgewiesenen thrombozytengebundenen Antikörpern 30/89 Hunden der pITP, 14/89 Tieren dem Evans-Syndrom, 36/89 Tieren der sekundären ITP und 9/89 Hunden der sekundären ITP in Kombination mit sekundärer immunmediierter hämolytischer Anämie zugeordnet werden (Putsche und Kohn, 2008). Die Prognose für Hunde, die am Evans-Syndrom leiden scheint laut einer Studie schlechter als für Hunde mit isolierter ITP (Nakamura et al., 2012).

2.4.1.2.2 NICHT IMMUNMEDIERT/DIREKTE ZERSTÖRUNG

Mögliche Mechanismen einer Zerstörung von Thrombozyten ohne Beteiligung des Immunsystems, d.h. ohne Antikörper oder Komplementfaktoren treten ebenfalls häufig im Zusammenhang mit Infektionen, Neoplasien oder Medikamenten auf. Es handelt sich dabei um direkte, z. B. lytische Schäden an Thrombozyten (Thomas, 2010). Desweiteren kann es auch zu einer zytokinvermittelten Aktivierung des mononukleär-phagozytierenden Systems (MPS) kommen, was in einer verstärkten Phagozytose der Thrombozyten resultiert (Thomas, 2010). Darüberhinaus können Thrombozyten bei bakteriellen Infektionen oder Endotoxinämie aufgrund inflammatorischer Zytokine oder eines direkten Endotoxineffekts aktiviert werden. Die Thrombozyten, aber auch Neutrophile, Monozyten und aktivierte Endothelzellen sezernieren Stimuli wie Thrombin oder PF4. Außerdem führen aktivierte Thrombozyten zu erhöhter tissue factor expression durch Monozyten, was die Aktivierung der Gerinnungskaskade zur Folge hat. Ergänzend führen Endothelzellverletzungen zu sinkender Produktion von inhibitorischen Substanzen wie Prostaglandin I (Thomas, 2010).

Sehr wahrscheinlich handelt es sich bei der caninen infektiösen zyklischen Thrombozytopenie durch *Anaplasma platys* auch um eine direkte Zerstörung der Thrombozyten. Die über Membrantransport eingedrungenen Parasiten können mikroskopisch im Blutplättchen als Morulae sichtbar sein (Kohn, 2012). Auch bei der akuten *Ehrlichia canis* Infektion wird neben der immunmedierten Komponente noch von einer Zerstörung ohne Beteiligung des Immunsystems ausgegangen, wohingegen die chronische *E. canis* Infektion sich eher im Knochenmark manifestiert und dort eine Hypoplasie verursacht (Thomas, 2010). Außerdem

wird unter anderem bei bakteriellen Infektionen über gesteigerte Apoptose berichtet (Leytin, 2012).

Thrombozytopenien durch virale Infektionen des Hundes sind bekannt. Das canine Staupevirus z. B. löst neben dem immunvermittelten destruktiven und hypoproduktiven Mechanismus auch durch direkten Thrombozytenschaden eine Reduktion der Plättchenzahl aus (Thomas, 2010). In der Humanmedizin konnte demonstriert werden, dass myxovirale Neuraminidase die Thrombozytenlebensspanne durch Spaltung der Sialinsäure auf der Oberfläche der Thrombozytenmembran verkürzt. Dadurch wird die darunter befindliche Galaktose aufgedeckt. Es konnte gezeigt werden, dass die Entfernung der mit Sialinsäure bedeckten Glykoproteine zum natürlichen Alterungsprozess gehört. Hepatozytenrezeptoren sind in der Lage, Thrombozyten zu erkennen, die diese Bedeckung als Folge einer Sepsis oder länger andauernder Kälte nicht mehr besitzen. Ein weiteres Beispiel ist das Newcastle disease Virus, das wohl durch Membranruptur zur Auflösung humaner Thrombozyten führt. Weiterhin verursacht das humane Immundefizienzvirus intrazytoplasmatischen sowie nukleären Schaden im Blutplättchen. Das humane Vacciniavirus scheint elektrostatisch an Thrombozyten zu binden und so ihre Degranulation und Zerstörung zu bewirken. Letztlich sind die genauen Folgen der viral-thrombozytären Interaktion nur spärlich verstanden (Yeaman und Bayer, 2013).

Auch Neoplasien können eine direkte Zerstörung der Thrombozyten durch Krebszellen verursachen (Thomas, 2010), aber auch hier muss bedacht werden, dass die Pathogenese der paraneoplastischen Thrombozytopenie multifaktoriell ist (Schwandt-Müller, 2013).

Einige Medikamente schädigen Thrombozyten direkt und führen so zu ihrer vorzeitigen Entfernung aus der Zirkulation durch das MPS (Thomas, 2010). Hochdosierte IL2 z. B., das zur Therapie von Krebserkrankungen eingesetzt wird, schädigt Thrombozyten direkt über einen noch unbekanntem Mechanismus. Häufig handelt es sich dabei um einen milden Abfall der Thrombozytenzahl, jedoch können auch schwere Thrombozytopenien auftreten (Aster, 2013).

Botsch erwähnt Goldsalze im Zusammenhang mit der nicht immunmedierten Thrombozytenzerstörung. Sie können eine z.T. hochgradige Thrombozytopenie auslösen. Proteine im Plasma der Hunde können goldgebunden von Thrombozyten absorbiert werden. Es wurden keine goldassoziierten Antikörper nachgewiesen (Botsch, 2009). Außerdem werden Goldsalze im Zusammenhang mit der Bildung von Autoantikörpern gegen GPIIb/IIIa erwähnt (Aster, 2013).

2.4.1.3 ERHÖHTER VERBRAUCH UND VERLUST

In der Humanmedizin gut charakterisierte Erkrankungen, die mit erhöhtem Verbrauch an Thrombozyten einhergehen, sind die disseminierte intravasale Gerinnung (DIG) und Mikroangiopathien wie das hämolytische urämische Syndrom (HUS) und die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP) (Thomas, 2010). Gefäßerkrankungen beim Hund können sowohl mit als auch ohne gleichzeitig vorhandene DIG die Blutplättchenzahl erniedrigen. Sie können erregerbedingt, z. B. bei Befall mit Leptospiren, Rickettsien, Morbilliviren, aber auch bei gefäßassoziierten Neoplasien, Azidose und Schockgeschehen auftreten. Auch eine einfache Blutung stellt einen erhöhten Verlust und Verbrauch an Thrombozyten dar (Kohn, 2012).

Sowohl eine lokal beschränkte Thrombose als auch eine DIG können zu einer Thrombozytopenie in unterschiedlicher Ausprägung führen (Kohn, 2012). DIG ist eine häufig diagnostizierte, erworbene Begleiterscheinung verschiedener Erkrankungen. Dabei liegt eine Hyperkoagulabilität vor, bei der nachfolgend die regulativen Mechanismen ausfallen (Thomas, 2010). Es handelt sich um ein hämostatisches Ungleichgewicht in Form einer überschiessenden Gerinnung mit Mikrothrombenbildung über das gesamte Gefäßsystem hinweg und dem Verbrauch von Gerinnungsfaktoren (Levi, 2004), in dessen Folge es zu entsprechenden Konsequenzen der Thrombenbildung und zu Blutungen kommen kann (Kohn und Giger, 2001).

Bei Hunden sind systemische Erkrankungen und Neoplasien die häufigsten Auslöser. So können Infektionskrankheiten wie Pyometra, Parvovirose, Dirofilariose, Entzündungen wie z. B. Pankreatitiden und schwere Traumata eine Verbrauchskoagulopathie bewirken (Kohn und Giger, 2001). Die Häufigkeit von Neuerkrankungen bzgl. der DIG bei Kleintieren, die an einer Neoplasie leiden, liegt bei 10% (Schwandt-Müller, 2013). Es wird davon ausgegangen, dass Neubildungen wie das Hämangiosarkom bei ca. 40% der DIG-Entstehungen mitverantwortlich sind (Kessler et al., 2012). aber auch im Zusammenhang mit anderen Neoplasien wie z. B. Karzinomen der Schilddrüse oder der Bauchorgane wurde von der DIG berichtet (Schwandt-Müller, 2013).

Man unterscheidet die verdeckte bzw. kompensierte von der offensichtlichen bzw. unkompensierten Form der disseminierten intravasalen Gerinnung. Entsprechend der Form bzw. des Stadiums variieren die Symptome von subklinischer DIG bis zu dem multiplen Versagen der Organe (Thomas, 2010). Bei der Erstgenannten wird viel Thrombin produziert, aber die inhibitorischen Mechanismen wirken noch ausgleichend. Letztere dagegen zeigt sich

schließlich als Hypoxie und Organschaden mit Schock oder aktiver Blutung. Der Hund scheint häufiger als z. B. die Katze eine DIG-bedingte Blutung zu entwickeln (Stokol, 2010). Die Thrombozytopenie kann gering bis hochgradig sein (Thomas, 2010). Die Pathogenese der DIG ist vielseitig. Schäden an der inneren Gefäßauskleidung, Endotoxinämie, Bildung von Immunkomplexen sowie proteolytischer thrombinähnlicher Enzyme führen zur Blutplättchenanregung und der Aktivierung sowohl des intrinsischen, als auch des extrinsischen Weges der sekundären Hämostase (Kohn und Giger, 2001). Der DIG-Verlauf kann in drei Stadien unterteilt werden: Initiation, Progression/Dissemination und Perpetuation.

Beginn der DIG, Initiation:

Zu Beginn der DIG geschieht im Grunde das Gleiche wie auch bei der physiologischen Hämostase. Die Blutstillung wird durch freiwerdenden tissue factor (TF) aktiviert. Auch wenn TF-unabhängige Mechanismen wie Proteasen in Erythrozytenmembranen oder Tumorzellen die Gerinnung direkt aktivieren können, spielt dieses Transmembranprotein bei der Blutgerinnung eine große Rolle. Bei ausgeprägtem Endothelschaden unterschiedlicher Genese sowie zytokinvermittelt kommt es zum Freiwerden beachtlicher Mengen an TF. Es sind jedoch auch Zellen wie z.B. Monozyten zur Freisetzung des TF in der Lage. Auch bei einigen Neoplasien wird konstitutiv TF exprimiert.

Ob sich eine DIG entwickelt, ist abhängig vom Zusammenspiel zwischen dem Aktivierungsreiz und natürlich vorkommenden Inhibitoren der Gerinnung. Die Spaltung des TF-FVIIa-FXa-Komplexes durch den vor allem auf Endothelzellen exprimierten tissue factor-pathway-inhibitor (TFPI) wird jedoch durch z. B. die Spaltung von TFPI durch granulozytäre Elastasen und zytokinvermittelte Unterdrückung behindert (Stokol, 2010).

Fortschreiten und Ausbreitung der DIG: Progression/Dissemination

Übermäßige Thrombinbildung im Rahmen eines positiven Feedback Mechanismus, getriggert durch Kontakt mit TF, führt zur Fibrinablagerung und spielt eine zentrale Rolle beim Fortschreiten der DIG (Levi, 2004). In diesem frühen Abschnitt der (nichtoffensichtlichen) DIG, in welcher die Patienten hyperkoagulabel sind, finden durch den Fibrinolyse Inhibitor (TAFI), der zur selben Zeit von Thrombin ausgeschüttet wird, Protein C, Thrombomodulin und Antithrombin (AT noch gegenregulierende Mechanismen statt (Stokol, 2010).

Das auf der Aussenseite der Zellmembran aktivierter Thrombozyten befindliche Phosphatidylserin fördert die Bildung und Bindung von Gerinnungskomplexen und kann im

Rahmen überschüssiger Gerinnung durch eine Vielzahl von Zelltypen sowie z.B. von Mikropartikeln (MP) freigesetzt werden (Stokol, 2010).

Die gesamte Kaskade wird verstärkt, indem der Körper versucht, Fibrin durch Plasmin wieder aufzulösen, wodurch weiterhin Gerinnungsfaktoren verbraucht werden. Das heisst, es erfolgt zur gleichen Zeit eine starke Aktivierung des fibrinolytischen Systems (Kohn und Giger, 2001). In dieser Phase der DIG ist der Organismus jedoch nicht mehr in der Lage, alle Fibrinablagerungen aufzulösen (Stokol, 2010)

Aufrechterhaltung der DIG, Perpetuation:

Bei septischer und nichtseptischer Entzündung wird die DIG zu einem Selbstläufer. Das heisst, es entwickelt sich ein sich selbsterhaltender Kreislauf aus Entzündung und Gerinnung. Die Inflammation führt zu Endothelverletzungen und daraus resultierendem Freiwerden von TF, was die Gerinnung aktiviert. Thrombin bewirkt durch die Gerinnungskaskade in seiner proinflammatorischen Eigenschaft getriggert, Zytokinausschüttung durch Bindung an Proteasen aktivierende Rezeptoren auf z.B. Endothelzellen. Diesem ausweglosen Kreislauf kann mit dem Verbrauch der Antikoagulanzen mit entzündungshemmenden Eigenschaften wie AT und Protein C nichts mehr entgegengesetzt werden (Stokol, 2010).

Schlussendlich werden also mehr Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren verbraucht als nachgebildet werden können, wodurch sich eine Hypokoagulabilität entwickelt, die zur hämorrhagischen Diathese führt (Kohn und Giger, 2001). Häufig sind die klinischen Symptome jedoch den Organschäden zuzuordnen (Thomas, 2010).

Bei Kindern tritt HUS häufig assoziiert mit verotoxinproduzierenden E. coli 0157 auf. Durch die Bakterientoxine werden die Endothelzellen der Nierenarteriolen und -kapillaren geschädigt, was zur Thrombozytenaggregation führt und somit zur Bildung von Mikrothrombi in den Gefäßen mit resultierender Ischämie bei Gefäßverschluss. Beim Hund ist das Syndrom selten und es gibt nur wenige Beschreibungen dazu (Chantrey et al., 2002). Akutes Nierenversagen, Thrombozytopenie, Thrombose und mikroangiopathische Hämolyse sind dabei die klassischen Anzeichen (Kohn, 2012). In einem Bericht über HUS bei drei Hunden in den USA wurde nur in einem Fall ein E. coli-Nachweis versucht, jedoch ohne Serotypisierung im Kot oder Identifikation des Verotoxins (Holloway et al., 1993; Chantrey et al., 2002).

Bei Tieren scheint TTP natürlich bei Schweinen und ansonsten nur in Tiermodellen experimentell induziert vorzukommen (Thomas, 2010). TTP ist u.a. durch deutliche Thrombozytopenie, leichte Nierenfunktionsstörung, mikroangiopathische hämolytische

Anämie, variierenden neurologischen Zustand und Fieber charakterisiert. Ursache der Symptome sind disseminierte Mikrothromben, die zahlreiche Organe betreffen können. Es wurde neben Schweinen bei Hunden (Sanders et al., 1995) und Mäusen (Ebner) experimentell ausgelöst. Bei Patienten mit TTP stehen die renalen Einschränkungen im Hintergrund, dagegen fallen sie häufiger als HUS-Patienten mit neurologischen Störungen auf. Es wird von einer Störung der Metalloprotease ADAMTS 13 (a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13 (Tarnow und Kristensen, 2010). ausgegangen, die sowohl erworben als auch angeboren sein kann. Diese Protease verhindert durch Spaltung des vWF eine Anreicherung derjenigen Formen dieses Glykoproteins, die u.a. die höchste thrombogene Aktivität aufweisen. Der Nachweis von vWF-reichen Mikrothromben ist möglich (Thomas, 2010). Ergebnisse der letzten Jahre zeigen, dass neben dieser Beeinträchtigung der Metalloprotease jedoch Triggerfaktoren zur Auslösung von akuten Krankheitsphasen nötig sind. Ein bekannter Schlüsselreiz beim Menschen stellt zum Beispiel das als Arzneistoff unter anderem gegen Muskelkrämpfe eingesetzte Chinin dar. Bei Mäusen erwies sich diese chemische Verbindung jedoch als nicht mit der TTP assoziiert (Ebner).

Auch schwere Blutungen können zur Thrombozytopenie führen, allerdings handelt es sich hierbei meist um milde bis geringgradige Thrombozytopenien (Kohn, 2012). Wird bei einem blutenden Tier eine schwere Thrombozytopenie festgestellt, so ist diese mit großer Wahrscheinlichkeit die Ursache und keine Folge der Blutung. Bei Vergiftung mit Rodentiziden kann es zu einer mitunter schwerwiegenden Thrombozytopenie kommen, diese allerdings resultiert nicht allein aus der Blutung sondern eher aus einer Kombination aus Blut- bzw. Thrombozytenverlust und Thrombozytenverbrauch im Sinne der ablaufenden Hämostase (Thomas, 2010).

2.4.1.4 ERHÖHTE SEQUESTRIERUNG

Die Gesamtplättchenmasse setzt sich zusammen aus den frei zirkulierenden sowie reversibel in den Blutgefäßen besonders von Milz, Leber und Knochenmark verteilten Thrombozyten. Ca. ein Drittel der zirkulierenden Plättchenmasse kann beim inaktiven Tier in der Milz gespeichert werden. Da die totale Thrombozytenmasse nicht beeinträchtigt ist, ist keine gesteigerte Thrombopoese zu erwarten (Thomas, 2010). Bei z. B. Hypersplenismus, Gefäßtumoren wie dem Hämangiosarkom oder Milztorsion werden Blutplättchen aus der Zirkulation in Leber oder Milz umverteilt. Hierbei ist selten der Abfall der Thrombozyten so stark, dass Störungen der Gerinnung dabei auftreten (Kohn, 2012). Hypersplenismus kann bei

Milzvergrößerung auftreten, wobei die Ursache der Splenomegalie keine Rolle spielt (Michelson, 2013). Dabei handelt es sich um die pathologische Sequestrierung eines Großteils der Thrombozyten bei deutlicher Vergrößerung der Milz und gesteigerter Knochenmarksaktivität (Russel, 2010). Die Thrombozytopenie ist gering- bis mittelgradig. Nicht selten kommt zusätzlich auch eine verringerte Anzahl an Erythrozyten und Leukozyten vor (Michelson, 2013). Eine Thrombozytopenie durch Umverteilung in die Milz tritt bei Tieren selten auf (Russel, 2010). Es gibt Berichte von Hunden, bei denen es im Rahmen einer Endotoxinämie sowie einer Unterkühlung zu einer Umverteilungsstörung der Blutplättchen in die Lunge bzw. in Leber und Milz kam. Die Diagnose einer Thrombozytopenie aufgrund von Verteilungsstörungen ist nach der Ermittlung der Gründe für die Organomegalie bzw. dem Ausschluss aller anderen in Frage kommenden Ursachen eine Ausschlussdiagnose. Blutungen sind bei erhaltener Thrombozytenfunktion nicht zu erwarten (Thomas, 2010).

2.4.1.5 PSEUDOTHROMBOZYTOPENIE

Der Begriff Pseudothrombozytopenie bezeichnet den Umstand, dass in der Blutprobe vorhandene Thrombozyten vom Hämatologiegerät aufgrund von z. B. Verklumpung nicht erfasst werden. Deshalb ist es nötig, eine am Hämatologiegerät ermittelte Thrombozytopenie mithilfe eines Blutausstrichs zu verifizieren (Thomas, 2010). Im Zusammenhang mit diesem Laborbefund wird meist nur die Katze erwähnt (Thomas, 2010; Raskin et al., 2011; Weiss und Tvedten, 2011). Diese Tierart zeigt eine erhöhte Aggregationsneigung (Mischke, 2014). Bei der Hälfte bis zu drei Viertel der Katzen kommt es zu derartig verstärkter Aggregation der Plättchen, dass die Thrombozytenanalyse ungenau wird (Weiss und Tvedten, 2011). Beim Hund wurde selten von einer EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid)- abhängigen Pseudothrombozytopenie ungeklärter Ursache berichtet (Thomas, 2010).

In vorliegender Arbeit handelt es sich um die Daten von Hunden. Das in dieser Arbeit verwendete Hämatologiegerät ADVIA 2120 ist in der Lage, Aggregate zu messen, und diese als Anzahl clumps anzugeben (Siemens, 2010). Die Thrombozytopenie wurde unter Heranziehung der Informationen aus Blutausstrich und/oder ADVIA 2120 bestätigt.

2.5 RETIKULIERTE THROMBOZYTEN

Sind die Thrombozyten gerade erst von Megakaryozyten aus dem Knochenmark entlassen, so enthalten sie RNA, die im weiteren zeitlichen Verlauf jedoch abgebaut wird (Barlage und Schmitz; 2007). Diese jungen Thrombozyten werden retikulierte Thrombozyten (rPLTs)

genannt, die von den reiferen Plättchen durch die erhöhte Aufnahme und Interkalation von fluoreszierendem Thiazolorange unterschieden werden können (Kienast und Schmitz, 1990). Dale et al. konnten mit Thiazolorange nachweisen, dass TO-positive Thrombozyten neu synthetisiert worden waren. Dies gelang ihnen mit Hilfe einer Biotinmarkierung der Thrombozyten im Blut eines Beagles und einer TO-Anfärbung in der nachfolgenden Auswertung mittels Durchflusszytometrie, wodurch die retikulierten Thrombozyten angezeigt werden. Nach 24 Std waren die sowohl biotynilierten als auch TO-positiven Thrombozyten nicht mehr vorhanden. Die neu entstandenen retikulierten Thrombozyten konnten anhand ihrer fehlenden Biotinbindung bei vorhandener TO-Positivität identifiziert werden. Somit konnten sie demonstrieren, dass diese Bindung weniger als 24 Stunden anhält, da die biotinylierten Thrombozyten nach maximal 24 Stunden ihre Anfärbbarkeit verloren (Dale et al., 1995). Demnach sind retikulierte Thrombozyten juvenile, weniger als 24 Stunden alte Thrombozytenstadien. Sie unterscheiden sich von den reifen Thrombozyten nicht nur durch ihren erhöhten RNA-Gehalt, sondern auch durch ihre erhöhte Biosynthese von Proteinen, wie anhand humaner Thrombozyten von Kieffer et al. gezeigt werden konnte (Kieffer et al., 1987).

Lange Zeit dachte man, diese geringen Mengen an RNA seien nur noch im Ansatz im Thrombozyten vorhanden und hielt sie für ein Überbleibsel der aus Megakaryozyten stammenden RNA. Die Hinweise auf eine ablaufende de-novo Proteinsynthese sprechen jedoch dagegen (Hoffmann, 2014). Eine erhöhte Aktivität der rPLTs nach Thrombingabe in vitro, ermittelt anhand der Expression von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche, unterscheidet sie von der älterer Thrombozytenpopulationen (Peng et al., 1994). Weiter konnte in der Humanmedizin festgestellt werden, dass junge Thrombozyten eine erhöhte Neigung zur Thrombosierung aufweisen. Patienten mit Atherosklerose, bei denen die Lebensspanne von Thrombozyten verkürzt ist, wiesen bei vorliegender Thrombopoese einen erhöhten Anteil an retikulierten Thrombozyten im peripheren Blut auf. Die Autoren konnten ihre Hypothese, dass junge, retikulierte Thrombozyten leichter thrombosieren, durch induzierte und anschließend untersuchte Thromben in Querschnitten von isolierten A. carotis Segmenten des Schweines bestätigen. Dazu wurde humanes Spenderblut von gesunden männlichen Probanden mit definierter Geschwindigkeit unter Scherbedingungen von $3,350 \text{ s}^{-1}$, die denen einer signifikanten Koronararterienstenose beim Menschen entsprechen, mit Hilfe einer Spritzenpumpe über das Gefäß gezogen. Die dadurch entstandenen Thromben wurden gewonnen und für anschließende Untersuchungen wieder aufgelöst. Die Intensität der mit TO gefärbten Platelets wurde mit der Intensität der im restlichen Spenderblut

vorhandenen angefärbten Thrombozyten verglichen. Es stellte sich heraus, dass die Thrombozyten in den Thromben sich deutlich intensiver anfärbten als im verbliebenen Spenderblut. Die Art der Thrombozytengewinnung hatte kontrolliertermaßen keinen Einfluss auf die Aktivierung der Plättchen oder ihren TO-Gehalt (McBane et al., 2014). Ein weiteres Charakteristikum retikulierter Thrombozyten, im Vergleich zu reifen Thrombozyten, ist ihr offensichtlicher Schutz vor Apoptose. So enthalten junge PLTs mehr antiapoptotisch wirksames Bcl- α , das sie vor dem programmierten Zelluntergang schützt. Erst mit zunehmender Reifung des Thrombozyten nimmt der Proteingehalt ab (Mason et al., 2007).

2.5.1 NUTZEN RETIKULIERTER THROMBOZYTEN

Es ist klinisch bedeutsam herauszufinden, welche Ursache und welcher Pathomechanismus einer Thrombozytopenie zugrunde liegt, da bei (sehr) niedrigen Thrombozytenzahlen Blutungen bzw. Spontanblutungen auftreten können (Barlage und Schmitz; 2007). Um eine Hypoproduktion auszuschließen, muss die der Thrombozytopenie zugrundeliegende Ursache bzw. die Thrombopoese beurteilt werden. Dies ging bisher nur über invasive, teils schwierige und kostenintensive Methoden. Dazu zählen z. B. der Nachweis von thrombozytengebundenen Antikörpern, die Knochenmarkuntersuchung und Studien zur Lebensspanne von Thrombozyten (Dusse und Freitas, 2015). In der Humanmedizin konnte gezeigt werden, dass jene thrombozytopenischen Patienten, die in der Knochenmarkuntersuchung physiologische oder erhöhte Megakaryozytenzahlen aufwiesen, auch gesteigerte prozentuale rPLT-Zahlen im peripheren Blut hatten. Bei den Thrombozytopenikern mit reduzierten Megakaryozyten in der Knochenmarkuntersuchung konnten dagegen entsprechend keine juvenilen Thrombozytenstadien im Blut gemessen werden (Kienast und Schmitz, 1990). Die Arbeitsgruppen um Ault und Briggs konnten ferner feststellen, dass die Prozentzahl an humanen retikulierten Thrombozyten dann erhöht ist, wenn die Thrombozytenzahl niedrig ist und umgekehrt, sich die beiden Parameter also gegenläufig zueinander verhalten (Ault et al., 1992; Briggs et al., 2004). Pankraz et al. konnten dies beim Hund ebenfalls demonstrieren (Pankraz et al., 2009).

Kienast und Schmitz erkannten also schon das diagnostische Potenzial der retikulierten PLTs bei der Unterscheidung zwischen erhöhtem Thrombozytenverbrauch resp. -zerstörung und mangelnder Bildung auf Knochenmarkebene (Kienast und Schmitz, 1990). Bei vermehrtem Verbrauch bzw. erhöhter Zerstörung ist mit gesteigerter Thrombopoese zu rechnen, sofern das Knochenmark funktionsfähig ist. Um dies nachzuweisen war bisher immer eine

Knochenmarkuntersuchung nötig. Diese ermöglicht die Beurteilung der Anzahl der Megakaryozyten, die bei gesteigerter peripherer Zerstörung bzw. gesteigertem Verbrauch erhöht sein sollte (Barlage und Schmitz, 2007). Es handelt sich bei dieser diagnostischen Methode aber um ein invasives Verfahren, das unangenehm für den Patienten ist, und dessen Beurteilung vom jeweiligen Betrachter abhängt und somit Schwankungen unterliegt (Kienast und Schmitz, 1990).

Weiterhin ist zu bedenken, dass z. B. bei einer Erkrankung wie der ITP nicht nur eine erhöhte Zerstörung der Plättchen für den Plättchenmangel verantwortlich sein kann, sondern zusätzlich auch eine verminderte Produktion auf Knochenmarkebene. Dies geschieht durch Antikörper, die gegen Megakaryozytenepitope gerichtet sind. Hierbei können normale oder erhöhte Megakaryozytenzahlen im Knochenmark auftreten (Scott und Jutkowitz, 2010).. Auch Siegel et al. konnten in der Humanmedizin eine große Variation in der mittleren Plättchenüberlebenszeit und dem Turnover bei ITP feststellen. In Studien an ITP-Patienten mit Thrombozytenzahlen zwischen $13 \times 10^9/l$ und $188 \times 10^9/l$ und mit normalen bis erhöhten Megakaryozytenzahlen wurden die Thrombozyten mit Indium 111 markiert. Die mittlere Plättchenüberlebenszeit variierte zwischen nur 15 Stunden und fast 9 Tagen, wobei 7,5 bis 9 Tage die physiologische Lebenszeit darstellen. Der Thrombozytturnover schwankte zwischen 99 bis $7585/\mu l/Std.$ (normal $1200-1600/\mu l/Std.$). Das heisst also, auch normale oder erhöhte Megakaryozytenzahlen in der Knochenmarkbiopsie führen nicht unbedingt zur gesteigerten Thrombopoese und sind somit nicht immer ein zuverlässiger Indikator der Thrombozytenproduktion (Siegel et al., 1989). Die rPLTs dagegen lassen zweifellos auf funktionsfähige Megakaryozyten schließen, da sie deren „Produkte“ darstellen.

Weitere diagnostische Möglichkeit hinsichtlich eines zugrundeliegenden Pathomechanismus ist die Untersuchung auf antithrombozytäre Antikörper. Diese bestätigen das Vorliegen eines Immunmechanismus. Die Untersuchung von Thrombozyten-gebundenem IgG ist relativ aufwändig und nicht sehr praktikabel im Praxisalltag. Desweiteren ist auch hier nicht ausgeschlossen, dass auch die Megakaryozyten vom Immungeschehen betroffen sein können. Die Messung der Thrombozytenlebensspanne kann ebenfalls eine vorliegende Hyperdestruktion anzeigen. Die Analyse erfordert jedoch die Injektion eines radioaktiven Markers zur Kenntlichmachung der Zellen (Kienast und Schmitz, 1990). Somit stellt sich auch im Vergleich dazu die rPLT-Messung als überlegene Alternative dar.

Mithilfe der retikulierten Thrombozyten kann nun in der Humanmedizin eine Aussage über die Thrombopoese getroffen werden (Kienast und Schmitz, 1990; Abe et al., 2006) und retikulierte Thrombozyten können zur Differenzierung der Ursache einer Thrombozytopenie

herangezogen werden (Hoffmann, 2014). Viele Studien belegen, dass die Analyse retikulierter Thrombozyten zuverlässig in der Lage ist, zwischen den beiden oben genannten Pathomechanismen zu unterscheiden (Kienast und Schmitz, 1990; Thomas-Kaskel et al., 2007; Monteagudo et al., 2008; Meintker et al., 2013).

Für die Veterinärmedizin aktuell dargelegt werden, dass die Bestimmung des prozentualen Anteils retikulierter Thrombozyten an der Gesamtzahl aller Thrombozyten zwischen primärer Immunthrombozytopenie und verschiedenen anderen Erkrankungsursachen bzw. keiner vorliegenden Erkrankung unterscheiden kann. In der entsprechenden Studie mit 75 thrombozytopenischen sowie 16 anderweitig kranken und 24 gesunden Hunden, jeweils mit Thrombozytenzahlen im Referenzbereich, konnten signifikante Unterschiede zwischen den rPLT%-Werten bei pITP ermittelt werden, verglichen mit den Werten von Tieren mit Vaskulitiden, knochenmarkassoziierten Erkrankungen sowie gesunden und kranken Tieren mit Thrombozytenzahlen im Referenzbereich. Zwischen den relativen rPLT-Werten bei primärer und sekundärer ITP konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Bachman et al., 2015). Manche Autoren bezeichnen die rPLT- Messung als nützlichen Screeningtest bei Thrombozytopenie (Monteagudo et al., 2008). Thomas-Kaskel et al. haben die retikulierten Thrombozyten unter anderem im Hinblick auf das Ansprechen auf Therapie betrachtet und festgestellt, dass eine rPLT-Prozentzahl über 15 mit einer positiven Therapieantwort assoziiert war. Doch nicht nur hierbei zeigt sich der klinische Nutzen der rPLT-Bestimmung für Thrombozytopeniker. Ein weiterer Vorteil, den dieser Parameter bietet, liegt in der Überwachung der Megakaryopoeseaktivität bei Patienten nach Chemotherapie oder Stammzelltransplantation, um die Erholung von der Myelosuppression bzw. den Transplantationserfolg zu beurteilen (Consolini et al., 2001; Wang et al., 2002; Hoffmann, 2014) . Es konnte von mehreren Autoren für Mensch und Tier gezeigt werden, dass auf den Anstieg des prozentualen Anteils an retikulierten Thrombozyten eine Steigerung der Gesamtthrombozytenzahl folgte (Ault et al., 1992; Wang et al., 2002; Briggs et al., 2004; Kickler et al., 2006; Zucker et al., 2006, Pankraz et al., 2009). So können retikulierte Thrombozyten auch bei der Frage nach weiteren nötigen Plättchentransfusionen bei z. B. Chemotherapiepatienten hilfreich sein (Wang et al., 2002). In den USA werden in der Humanmedizin jährlich 1,5 Millionen Plättchentransfusionen durchgeführt, um das Blutungsrisiko zu reduzieren. Diese Transfusionen sind kostenintensiv und bergen bei mindestens einem Drittel auch ein Komplikationsrisiko. In der Regel handelt es sich dabei z. B. um zytokin- oder immunassoziierte Fieberreaktionen. Bakterielle Besiedlung des Blutes oder Abstossungsreaktionen sind jedoch auch möglich. Darüberhinaus kommt es bei 10-30%

der Individuen, die wiederholt Plättchentransfusionen bekommen, zu einer inadäquaten Antwort aufgrund der Bildung von Antikörpern gegen die fremden Antigendeterminanten (Kaushansky, 2007). So kann, einer Studie zufolge, eine ausreichende IPF, ohne das Vorliegen weiterer Komplikationen, bei der Entscheidung über die Notwendigkeit einer Plättchentransfusion bei Kindern nach einer Chemotherapie hilfreich sein, da sie den bevorstehenden Thrombozytenanstieg ankündigt (Saigo et al., 2008). Auch andere Autoren befürworteten schon 2006 die Interpretation der IPF zur Optimierung von Plättchentransfusionen, betonen jedoch die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen in prospektiven, randomisierten klinischen Studien, um die effizientere Nutzung der Thrombozytentransfusionen zu etablieren (Briggs et al., 2006). Dies scheint wichtig, denn es gibt es auch Stimmen, die gegen die Zuverlässigkeit des Parameters im Hinblick auf den Thrombozytenanstieg sprechen. So geben Hennel et al. an, dass es in ihrer Studie auch hohe IPF Werte nach Chemotherapie bei immerhin vier Kindern gab, ohne dass die Thrombozytenzahl im Anschluss zunahm (Hennel et al., 2012). Weiterhin interessant ist die Tatsache, dass scheinbar vorbeugende Transfusionen mit hoher IPF effektiver als solche mit niedriger IPF sind. In einer Studie mit 40 Kindern zwischen 5 und 18 Jahren erhielten 20 Patienten Infusionen mit rPLT-Prozentzahlen zwischen 3 und 9%, wohingegen 20 weitere Patienten Transfusionen mit Zahlen zwischen 0-1% erhielten. Diejenige Gruppe, die den hohen Anteil an jungen Thrombozyten erhielt, benötigte weniger Transfusionen und zeigte weniger Blutungen als die andere Gruppe (Parco und Vascotto, 2012).

Bei Thrombozytopenien in der Schwangerschaft hat die rPLT-Bestimmung gleich zweifachen Nutzen. Einmal kann sie dazu dienen, zwischen einer schwangerschaftsassozierten Thrombozytopenie und einer schwerwiegenderen, immunologischen Thrombozytopenie, die auch den Neonaten gefährden könnte, zu unterscheiden. Hierbei konnte in einer Studie festgestellt werden, dass rPLT-Werte sich im zweiten Trimester dazu eignen, zwischen beiden Ursachen zu differenzieren. Schwangere mit immunologischem Geschehen hatten signifikant höhere rPLTs im Blut (Uhrzynowska et al., 2012). Zum anderen können sie bei der Risikoabschätzung von Hypertension und Präeklampsie hilfreich sein. Präeklampsie betrifft schätzungsweise 6% aller Schwangerschaften. Die Diagnosekriterien einer Präeklampsie sind Hypertension und Proteinurie nach der 20. Schwangerschaftswoche (SSW) und das Auftreten dieser Symptome mindestens zweimal innerhalb von sechs Stunden. Etwa 15-50% der Betroffenen entwickeln eine Thrombozytopenie multifaktorieller Genese, die erhöhte Thrombozytenaktivierung und subklinische Gerinnungsaktivierung beinhaltet (McCrae, 2013). Schon 1994 zeigten in einer Studie schwangere Frauen mit Präeklampsie, aber ohne

immunologisches Geschehen, ab der 28. SSW signifikant höhere rPLT%-Werte als Frauen, die später keine Präeklampsie entwickelten. Zu der deutlichen Erhöhung kam es noch bevor Symptome der Erkrankung auftraten (Rinder et al., 1994). In dieser Studie war die Zahl der Untersuchten gering, doch nachfolgend konnte Everett den Nachweis erbringen, dass erhöhte rPLTs in der Zirkulation bei Präeklampsie aus erhöhtem Verbrauch bzw. darauffolgend gesteigerter Thrombopoese resultieren (Dusse und Freitas, 2015).

Retikulierte Thrombozyten können in der Humanmedizin auch z. B. bei chronischen Hepathopathien zur Unterscheidung zwischen Hepatitis und Zirrhose dienen. Die zugrundeliegenden Mechanismen des Plättchenmangels sind hierbei nicht vollständig geklärt und man geht bei Thrombozytopenien im Rahmen von zirrhotischen Lebererkrankungen von einer verminderten TPO- und Plättchenproduktion aus. So zeigten Patienten mit Leberzirrhose nicht nur eine deutlich geringere IPF (Saigo et al., 2007), sondern es fehlte auch die bekannte inverse Beziehung zwischen Gesamthrombozytenzahl und IPF bei diesen Erkrankten. Bei zirrhotischen Veränderungen kann laut Nomura et al. auf eine invasive Leberbiopsie verzichtet werden, wenn man stattdessen die Multivariationsanalyse basierend auf Thrombozytenzahl und IPF anwendet (Nomura et al., 2010).

In den letzten Jahren gibt es in der Humanmedizin zunehmend vorläufige Ergebnisse, die darauf hindeuten, dass rPLTs nicht nur bei Thrombozytopenien Aussagekraft hinsichtlich Risikoabschätzung, Prognose und Beteiligung an Pathomechanismen besitzen. So scheinen rPLTs zur Risikoabschätzung bei Coronararterienerkrankungen genutzt werden zu können. Ein hoher Anteil an retikulierten Thrombozyten korrelierte signifikant mit dem Versterben des Patienten innerhalb eines Jahres nach einem akuten Koronarsyndrom (ACS). Die Messung dieses Parameters könnte hilfreich dabei sein, im weiteren Monitoring der Patienten mit ACS das erhöhte Risiko zu erkennen und mit entsprechender Therapie darauf zu reagieren (Cesari et al., 2013).

Die Absolutzahl der rPLTs ist auch bei der Sichelzellenanämie, einer Hämoglobinopathie, die aufgrund einer Basenmutation im beta-Globin auftritt, verändert. Es kommt zur Polymerisation von Hämoglobin und zur Verformung und Steifigkeit der Erythrozyten mit daraus resultierender Anämie und Vasookklusion. Die rPLT-Zahl ist in der vasookklusiven Krise höher als in der stabilen Phase, was vermuten lässt, dass diese zur Pathogenese und Aufrechterhaltung der Krise beiträgt (Noronha et al., 2007).

Sepsis ist eine häufige Todesursache auf Intensivstationen. In einer Studie zeigten Patienten im median zwei Tage bevor sie eine Sepsis entwickelten eine erhöhte rPLT-Prozentzahl. Sie könnten so von diesem Parameter profitieren, indem die Wahrscheinlichkeit des Auftretens

einer Sepsis anhand eines erhöhten Anteils junger retikulierter Thrombozyten frühzeitig abgeschätzt werden kann (De Blasi et al., 2013). In einer weiteren Studie mit nicht thrombozytopenischen Patienten, die unter Neutrophilie und Fieber litten, was häufige Befunde bei Patienten in einem Krankenhaus darstellt, konnte eine statistisch signifikante Korrelation zwischen einer erhöhten IPF und positiven Blutkulturen festgestellt werden. Dies bedeutet, die erhöhte IPF würde einen Antibiosebeginn schon vor Erhalt der mikrobiologischen Untersuchungsergebnisse und spezifisch der Patienten mit Neutrophilie ermöglichen, die auch tatsächlich eine positive Blutkultur aufweisen (Di Mario et al., 2009). Bei Dialysepatienten konnten deutlich erhöhte Anteile an rPLTs festgestellt werden. Die erhöhte Aktivität und der erhöhte Turnover könnten evtl. zur Dysfunktion der Thrombozyten beitragen, die bei Dialysepatienten beobachtet werden kann (Himmelfarb et al., 1997). In einer Studie wurde der Einfluss von Nierenfunktion und Thrombozytturnover auf den Antiplateleteffekt von Aspirin bei Patienten mit Coronararterienerkrankung untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Nierenfunktion keinen Einfluss auf den Medikamenteneffekt hatte, ein erhöhter Thrombozytturnover jedoch schon. Hier schien die Absolutzahl an rPLTs jedoch repräsentativer (Würtz et al., 2012). Laut Hoffmann sind mehr Untersuchungen nötig, bevor eine breitere klinische Anwendung über die Thrombopenieursachenfindung und Knochenmarkbeurteilung nach myelosuppressiver Therapie hinaus stattfinden kann (Hoffmann, 2014).

2.5.2 MESSUNG RETIKULIERTER THROMBOZYTEN

1969 beschrieben Ingram und Coopersmith das erste Mal retikulierte Thrombozyten auf mit Neumethylenblau gefärbten Blutaussstrichen von Hunden nach akutem Blutverlust. Mit diesem Farbstoff färbt sich RNA an und auf diese Art wurden auch routinemäßig Retikulozyten nachgewiesen. Deshalb gaben Ingram und Coopersmith den andersartigen Thrombozyten auch den Namen „retikuliert“. Sie gingen schon damals von der Analogie zu den Vorläufern der Erythrozyten aus (Ingram und Coopersmith, 1969).

Etwa 20 Jahre später fand die Untersuchung der rPLTs mittels Durchflusszytometer statt, einem Verfahren, bei dem der Farbstoff Thiazolorange fluoreszenzverstärkend an DNA und RNA bindet. Ursprünglich wurde auch dieser Farbstoff für die Anfärbung von Retikulozyten entwickelt (Kienast und Schmitz, 1990). TO kann bei 488 nm angeregt und seine Fluoreszenz im Fluoresceinisothiocyanatkanal gemessen werden (Sedlmayr und Hübl; 2007).

Die Durchflusszytometrie ist anfällig für methodische Abweichungen. Retikulierte PLTs wurden unter verschiedenen Aspekten beleuchtet und die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen sind dabei kaum miteinander vergleichbar. Dies liegt vermutlich an mangelnder Standardisierung der Methode. Unter anderem führt die Konzentrationsabhängigkeit des Farbstoffes, dessen erhöhte oder erniedrigte Intensität durch unterschiedliche Inkubationszeiten oder auch die Auswertung der Daten anhand verschiedener Gates zu sehr abweichenden Ergebnissen. So variieren zum Beispiel ermittelte Referenzwerte stark zwischen 1 und 15% rPLTs an der Gesamtzahl aller Thrombozyten. Ein besonderes Problem stellt außerdem die mangelnde Spezifität des Fluoreszenzfarbstoffes dar (Hoffmann, 2014). Durch die Parameterabhängigkeit des Farbstoffs kann es dazu kommen, dass TO auch andere Bereiche im Thrombozyten anfärbt, wie die mitochondriale DNA oder dichte Granula (Robinson et al., 1998). Nach Gabe von TRAP (thrombin receptor-activating peptide), einem Plättchenaktivator, der zur Degranulation der Granula in den Thrombozyten führt, konnten nahezu 50% der TO-Signale innerhalb der normalen Thrombozyten aufgehoben werden. Dies legt den Verdacht nahe, dass sich die Granula von Thrombozyten unspezifisch mitanfärben. Zudem konnte Robinson dies anhand von Studien der Thrombozyten von Patienten mit der storage pool Erkrankung (SPD) bzw. Hermansky-Pudlak Syndrom (HPS) bestätigen. Man unterscheidet bei dieser angeborenen Thrombozytopathie je nach fehlenden Granula den sogenannten alpha, delta oder Mischtyp (alpha/delta).

Beim HPS handelt es sich um den sog. Deltatyp der storage pool Erkrankung. Dieser ist gekennzeichnet durch den vollständigen Mangel an dichten Granula aufgrund von fehlendem Granulophysin, einem granulären Membranprotein der Thrombozyten (Robinson et al., 1998). Durch die Untersuchung dieser Patientengruppen und durch induzierte Degranulation von Thrombozyten stellte sich heraus, dass degranulierte PLTs bzw. PLTs mit Granuladefekt sich bei ähnlichem Markierungsgrad und Farbverteilungsmuster deutlich weniger anfärbten (Robinson et al., 1998). Somit konnte gezeigt werden, dass es sich bei TO nicht um einen RNA-spezifischen Farbstoff handelt, sondern auch Granula angefärbt werden.

Eine weitere Hürde in der alleinigen Verwendung von Thiazolorange liegt in der Trennung der rPLT-Population von der Retikulozytenpopulation und kann daher zu fehlerhaften Messergebnissen führen. Ivory et al. markierten Thrombozyten zusätzlich mit CD61-Antikörpern und konnten so feststellen, dass offensichtlich retikulierte Thrombozyten fälschlicherweise als Retikulozyten gezählt wurden (Ivory et al., 2007). Die zweifache Markierung mit Thiazolorange und einem spezifischen Thrombozytenantikörper wird deshalb häufig verwendet, um eindeutigere Ergebnisse zu erzielen (Robinson et al., 2000). Neben der

mangelnden Vereinheitlichung der Methode bleibt die Durchflusszytometrie außerdem ein aufwändiges Verfahren (Hoffmann, 2014). Für den Praxisalltag sind daher die bereits auf dem Markt erhältlichen Hämatologiegeräte deutlich besser geeignet. Die Varianz der Methode innerhalb eines Gerätes wird minimiert und Messergebnisse sind deutlich praktikabler, schneller und wirtschaftlicher als die der Durchflusszytometrie.

Zum einen ist in der Humanmedizin das Hämatologiegerät Abbott Cell-Dyn Sapphire in der Lage, rPLTs im Retikulozytenkanal zu messen. Es wird ein Festlaser mit 488 nm und ein Fluoreszenzfarbstoff CD4K530 verwendet. Drei Streulichtwinkel zusätzlich zur Fluoreszenz ermöglichen eine Multidimensions-Analyse.

Zum anderen ist die automatische Messung der rPLTs im automatisierten Hämatologiesystem XE-2100 und XE-5000 der Fa. Sysmex (Kobe, Japan) als Teil der Retikulozytenmessung integriert und wird seither auch IPF genannt. Diese Hämatologiegeräte arbeiten mit einem 633 nm Diodenlaser und verwenden eine Mischung an Farbstoffen. Vorwärtsscatter wird gegen Fluoreszenz aufgetragen, und die Thrombozyten mit der höchsten Fluoreszenz werden als unreife Thrombozyten definiert. In der späteren XN-Serie, mit weniger Interferenz, ist die IPF-Methode ein Teil der Fluoreszenz-Thrombozytendetektion mit eigenem oxazinbasiertem RNA-Farbstoff. Vorwärtsscatter und Seitwärtsfluoreszenz stellen Zellgröße bzw. den RNA-Gehalt dar (Hoffmann, 2014).

In der Tiermedizin ist die Messung der retikulierten Thrombozyten mit dem Sysmex XT-2000iV möglich. Die Arbeitsgruppe um Pankraz etablierte diese als erste. Sie nutzte die Durchflusszytometrie als Referenzmethode. Für eine höhere Genauigkeit wurden die Thrombozyten zusätzlich spezifisch mit CD61-Antikörpern markiert (Pankraz et al., 2009). Dieses Blutanalysegerät arbeitet mit einer Supravitalfärbung, die RNA-färbende Polymethine und Oxazine enthält. Auch hier werden Fluoreszenz und Zellgröße ermittelt (Oellers, 2015).

Am ADVIA 120/2120 etablierte Oellers 2015 die rPLT-Messung. Als Referenzmethode diente die rPLT-Methode am Sysmex XT-2000iV durch Pankraz et al. und Gelain et al. Das Gate von Gelain wurde von Oellers verfeinert und liefert nun weniger Interferenzen (Oellers, 2015).

In vorliegender Arbeit wurden die retikulierten Thrombozyten am ADVIA 2120 mit der Methode nach Oellers ermittelt. Die gespeicherten Rohdaten der Jahre 2008-2013 wurden für diese Arbeit zur Gewinnung von Thrombozytenzahl und -indizes im Retikulozytenkanal reanalysiert. Daher ist die Retikulozyten-, Erythrozyten- und Thrombozytenmessmethode des ADVIA 2120 relevant und soll im Folgenden kurz erläutert werden. Für ausführlichere Informationen wird auf die Arbeit von Moritz verwiesen (Moritz, 2000).

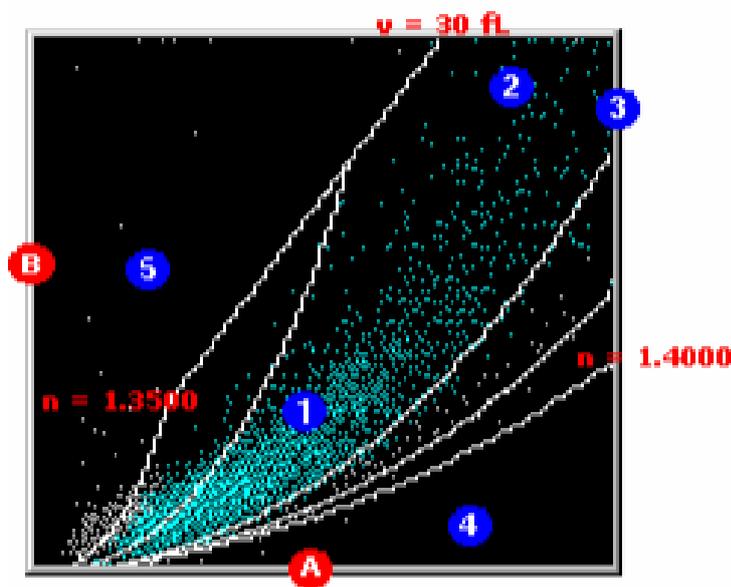


Abb. 5: Advia 2120 (Siemens)
entnommen aus ADVIA 2120i/2120/120 Trainingshandbuch Siemens, 2009, mit freundlicher Genehmigung von Siemens Healthcare Diagnostics

Das vollautomatische Hämatologiegerät ADVIA 120/2120 basiert auf einer Doppelwinkel-Laser-Streulicht-Messung, einem optoelektronischen Messprinzip. Speziell für die Veterinärmedizin wurde die Multispeziessoftware entwickelt. Neben dem kleinen Blutbild (CBC) und dem großen Blutbild mit Leukozytendifferenzierung (CBC/DIFF) können Retikulozyten absolut, prozentual sowie Indexzahlen (RETI) in Kombination mit CBC oder CBC/DIFF ermittelt werden. Es sind 120 CBC/DIFF Probenmessungen pro Stunde möglich. Der sogenannte UFC-Block (Unified Fluidic Circuit) enthält alle für die Analytik nötigen Kanäle für Proben und Reagenzien und fünf Reaktionskammern.

Erythrozyten- und Thrombozytenzählung

Durch isovolumetrische Aufkuglung und hydrodynamische Vereinzelung gelangen die Zellen in den Messkanal. Die Vereinzelung ist wichtig, um Koinzidenzen zu verhindern bzw. zu reduzieren. Die Messung erfolgt im Doppelwinkel-Laser-Streulicht bei 670 nm. Das Niedrigwinkelsignal (2° - 3° , Low Angle Scatter) analysiert direkt das Zellvolumen, während das Hochwinkelsignal (5° - 15° , High Angle Scatter) Informationen über den Hämoglobingehalt bzw. die intrazelluläre Granularität liefert. Die Thrombozyten werden im Red Blood Cells (RBC)-Kanal gemessen. Die zweidimensionale Thrombozytenanalyse (2D-Thrombo-Methode) basiert auf der integrierten Analyse der Messungen von Erythrozyten und Thrombozyten. Mithilfe der Mie Theorie, werden sie anhand entsprechender Größe und Refraktionsindex getrennt und in Zytogrammen aufgetragen. Kleinwinkel-Streulicht und Großwinkel-Streulicht werden verstärkt, kombiniert und in Volumen- und Brechungsindexwerte umgerechnet (Moritz, 2000). Der Refraktionsindex in Kombination mit dem Volumen differenziert zwischen roten Blutzellen, ihren Hüllen, sogenannten Ghosts (Erythrozyten ohne Hämoglobin), bzw. Fragmenten (mit Hämoglobin), Zelldebris und Thrombozyten von unterschiedlicher Größe (Siemens, 2010).



THROMBOZYTOGRAMM

Mie-Theorie

A Großwinkel-Streulicht 5° - 15° ,
(High Angle Scatter)

B Kleinwinkel-Streulicht 2° - 3° ,
(Low Angle Scatter)

- 1 Platelets
- 2 Large platelets
- 3 Red blood cells
- 4 RBC fragments
- 5 RBC ghosts

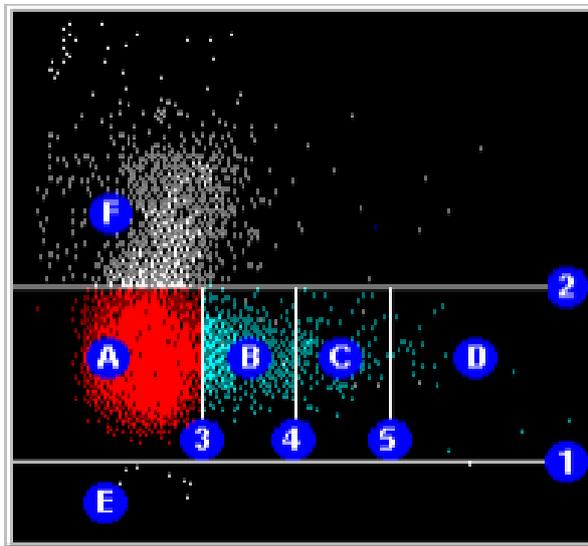
v Volumen (fl)

n Brechungsindex

Abb. 6: Thrombozytogramm
entnommen aus ADVIA® 2120/2120i Operator's guide
(Siemens, 2010)

Retikulozytenzählung

Zur Bestimmung der Retikulozyten werden diese entsprechend ihres ribosomalen RNA-Gehaltes durch Oxazin 750 angefärbt. Ebenfalls durch Zweiwinkelstreulichtmessung erfolgt die Größen- bzw. Hämoglobinbestimmung der Zellen. Zusätzlich wird nun anhand der Absorption der RNA-Gehalt erfasst. Somit ist es möglich, die Retikulozyten von den ungefärbten Erythrozyten abzugrenzen und sogar eine Einteilung der Retikulozyten in verschiedene Reifungsgrade vorzunehmen (Moritz, 2000). Ein Schwellenwert trennt die Erythrozyten und Retikulozyten von der Thrombozytenpopulation (Siemens, 2005). Erythrozyten und Retikulozyten stellen die größere Population an Zellen dar. Deutlich kleiner dagegen sind Thrombozyten sowie retikulierte Thrombozyten mit steigendem RNA-Gehalt.



RETIKULOZYTEN-SCATTERGRAMM

x-Achse Absorption

y-Achse Zellgröße

- 1 Abgrenzung von Thrombozyten
- 2 Abgrenzung von Koinzidenzen
- 3,4,5 Grenzen zw. Absorptionsgraden

A reife Erythrozyten
B,C,D niedrig-/medium-und
hochabsorbierende Retikulozyten

E Thrombozyten
F Koinzidenzen

Abb. 7: Retikulozyten-Scattergramm

Quelle: ADVIA® 2120/2120i Operator's guide (Siemens, 2010)

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 DATEN UND EINSCHLUSSKRITERIEN

Grundlage dieser retrospektiven Studie waren die archivierten ADVIA 120/2120 Daten der Patienten der Klinik für Kleintiere, Innere Medizin und Chirurgie der Justus Liebig Universität Gießen im Zeitraum Januar 2008 bis Dezember 2013. Es handelte sich dabei um 51136 Daten.

Diesen Daten wurden folgende Einschlusskriterien zugrundegelegt:

Tierart Hund, Thrombozytopenie (Thrombozytenzahl $<150 \times 10^9/l$), Messung im Retikulozytenkanal zur rPLT-Ermittlung, mindestens zwei Messungen in Folge nach Erstvorstellung innerhalb von 14 Tagen sowie kein größerer Abstand als 14 Tage zwischen weiteren Messungen in Folge, vorhandene ADVIA Rohdaten.

Um eine Pseudothrombozytopenie auszuschliessen, wurden nachfolgend alle Messungen

- mit zahlreichen/massenhaft Aggregaten im Ausstrich
- mit einigen kleinen Aggregaten und >301 clumps (Moritz, 2000) am ADVIA 2120
- mit normal beurteilter Thrombozytenzahl im Ausstrich (besonders bei ggr. Thrombozytopenien der Fall) und >301 clumps am Advia
- ohne vorhandenen Ausstrich und $>$ als 301 clumps am Advia

von der Untersuchung ausgeschlossen (n=16).

Diese Kriterien lieferten 540 Messungen. Es handelte sich um insgesamt 199 Hunde.

Alle Tiere wurden wegen Krankheit vorstellig, die Blutentnahmen erfolgten im Rahmen der Diagnostik und es war entsprechend den Einschlusskriterien mindestens eine Verlaufskontrollmessung nach Erstvorstellung im Zeitraum von zwei Wochen notwendig. Die Blutentnahme erfolgte mit einer sterilen Einwegkanüle (19G, Terumo Deutschland GmbH, Eschborn) aus der Vena cephalica antebrachii, Vena saphena oder aus der Vena jugularis. Als Behälter dienten 1,3 ml, 5 ml bzw. 10 ml fassende K3-EDTA antikoagulierende Röhrchen (Fa. Saarstedt, Nümbrecht), in die das Blut ohne Vakuum einfluss.

Bis zur Messung der Blutproben vergingen in der Regel vier, jedoch maximal sechs Stunden.

3.2 HÄMATOLOGISCHE AUSWERTUNG

Die Blutanalyse erfolgte am ADVIA 2120 (Fa. Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn) mit der Multispecies System Software V 5.3.1-MS.

Das Gerät wurde auf die Tierart Hund und den gewünschten Modus *Kl.BB(CBC)/DIFF/RETI* (kleines Blutbild, Differentialblutbild, Retikulozyten) eingestellt. Es wurde ein Volumen von 175 µl im offenen Modus angesaugt, und der Probendurchsatz im gewählten Auftrag betrug 74 Proben/Stunde. Der Hersteller Siemens führte die Kalibration der Geräte durch. Weiterhin wurden täglich Qualitätskontrollen mit vom Hersteller bezogenen Materialien durchgeführt. Diese gemessenen Proben wurden als Rohdaten gespeichert und für diese Arbeit mit der aktuellen Multispecies System Software V 5.9.0-MS. reanalysiert, um die relevanten Parameter zu reportieren:

- PLT Thrombozytenzahl ($\times 10^3$ cells/ μ l)
- MPV mittleres Thrombozytenvolumen (fl)
- PDW Thrombozytenverteilungsbreite (%)
- PCT Thrombokrit (%)
- MPC mittlere Granularität (g/dl)
- PCDW Verteilungsbreite der MPC (g/dl)
- MPM Thrombozytenmasse (pg)
- PMDW Verteilungsbreite der Thrombozytenmasse (pg)
- Large PLT >20 fl große Thrombozyten ($\times 10^3$ cells/ μ l)
- # Clumps Absolutzahl an Thrombozytenaggregaten

Wie erwähnt fand die Reanalyse im Retikulozytenkanal statt. Das heisst, die so erhaltene Thrombozytenzahl wurde aus diesem Kanal über Absorption und Streulicht, die den RNA-gehalt und die Zellgröße wiedergeben, ermittelt.

Da die Rohdaten vor Reanalyse inhaltlich nicht zugänglich waren, wurden die Einschlusskriterien der Thrombozytopenie mit einer Thrombozytenzahl $<150 \times 10^9/l$ anhand der sogenannten Labmanagerdaten ermittelt. Die im Labmanager enthaltenen Thrombozytenzahlen stammen aus dem Erythrozyten/Thrombozytenkanal. In diesem wurden die Thrombozyten über zwei Streulichter, die den Brechungsindex und die Zellgröße widerspiegeln, erfasst. Im Retikulozytenkanal wurden die Thrombozyten über Zellgröße und Absorption detektiert. Die Messung beider Kanäle kann sehr geringfügige Unterschiede in der Thrombozytenzahl liefern. Ergab es sich nun, dass ein Tier nur eine geringgradige Thrombozytopenie im Labmanager aufwies, so konnte es geschehen, dass dieses Tier in den

reanalysierten Daten im Retikulozytenkanal eine Thrombozytenzahl minimal über der Grenze von $150 \times 10^9/l$ bzw. von genau $150 \times 10^9/l$ aufwies. Diese Hunde wurden aus der Studie ausgeschlossen ($n=3$), da eine einheitliche Betrachtung der Thrombozytenzahl sowie der Indizes aus demselben Kanal (Retikulozytenkanal) stattfinden sollte und zudem ausschließlich tatsächlich thrombozytopenische Tiere in die Studie eingehen durften. Da insgesamt jede dieser drei Messungen nur eine weitere Messung hatte, mussten auch diese ausgeschlossen werden, somit ergab sich eine zu löschende Anzahl von 6 Messungen bzw. drei Tieren. Außerdem wurde ein Tier und dessen zwei Messungen aufgrund von 10 Bluttransfusionen an aufeinanderfolgenden Tagen und der Transfusion von plättchenreichem Plasma aus der Studie ausgeschlossen, da unter diesen Umständen keine Auswertung der Thrombozytenzahl mehr erfolgen konnte. Somit ergab sich eine vorläufige Zahl von 532 Messungen und 195 Tieren.

Zur Analyse der rPLTs war es nötig, die fcs-Rohdateien des RETIC-Kanals am ADVIA zu erstellen und anschließend mit der Software WinMDI Version 2.9 (für Windows, The Scripps Research Institute, La Jolla California USA, <http://facs.scripps.edu/software.html>) zu verarbeiten. Dazu wurde das Gate nach Oellers zur Ermittlung der retikulierten Thrombozyten aufgetragen.

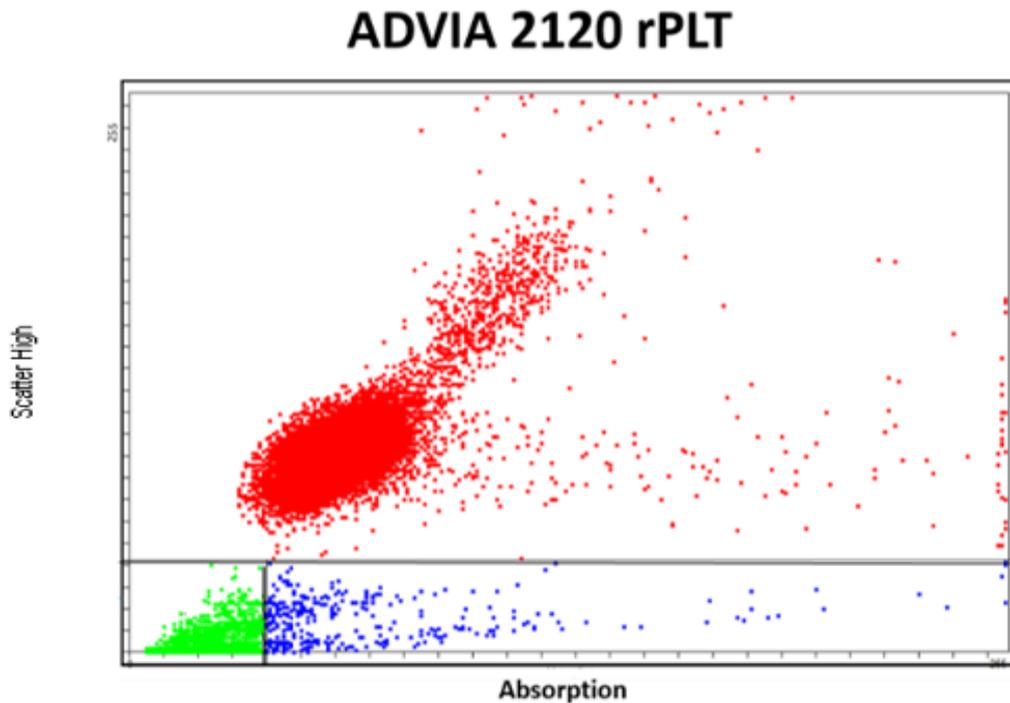


Abb. 8: WinMDI (Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry)-Darstellung des ADVIA-rPLT-Gates nach Oellers 2014 bei einem thrombozytopenischen Hund;
x-Achse: Absorption, y-Achse: Winkelstreulicht;
rot: Erythrozyten mit Retikulozyten, grün: reife Thrombozyten, blau: retikulierte Thrombozyten
Quelle: eigene Daten

Nach Verarbeitung mit genanntem Programm wurden weiterhin alle starken Abweichungen zwischen der durch WinMDI ermittelten und der am ADVIA gemessenen Thrombozytenzahl, von der Untersuchung ausgeschlossen. Dies erfolgte, da davon auszugehen war, dass es sich nicht um korrekte Messungen handeln kann, im Bewusstsein der Retrospektivität aber so genau wie möglich gearbeitet werden sollte. Gelöscht wurden:

- Abweichungen der durch WinMDI-ermittelten Thrombozytenzahl nach oben bis $+40 \times 10^9/l$: 35 Messungen
- Entsprechende Abweichungen der Thrombozytenzahl nach unten bis $40 \times 10^9/l$: 7 Messungen
- verbleibende einzelne Messungen, die keine Mehrfachmessungen mehr darstellten und somit keine Aussagekraft bzgl. der Fragestellung liefern konnten: 16 Messungen

Insgesamt wurden somit die Daten von 17 Tieren gelöscht.

Die Abweichungen lassen sich durch Mikroerythrozyten, Erythrozytenghosts (Erythrozyten ohne Hämoglobin) und Erythrozytenfragmente erklären, die im manuellen Gate mitgezählt wurden, so dass es zu starken Abweichungen der Thrombozytenzahlen nach oben kam. Auch Thrombozytenfragmente, die bei der ITP vorkommen können, könnten als ganze Zellen gezählt worden sein. Starke Abweichungen nach unten lassen sich durch sog. Riesenthrombozyten, die als Erythrozyten gemessen werden, erklären. Die entsprechenden Scattergramme wurden, wie von Oellers empfohlen, visuell bewertet, um eine fehlerhafte Zuordnung von anderen Zellen/Fragmenten aufgrund des fixen Gates bei der jeweiligen Probe auszuschließen (Oellers, 2015). Die Scattergramme zeigten im Thrombozytenzahlbereich bis $+40 \times 10^9/l$ bzw. $-40 \times 10^9/l$ auffällige Scattergramme, die darauf schliessen ließen, dass keine korrekte Messung vorlag. Nach Ausschluss dieser fehlerhaften Analysen blieben 474 Messungen und 178 Tiere übrig:

Es handelte sich um 92 männliche und 86 weibliche Tiere, (männlich unkastriert $n=60$; männlich kastriert $n=32$; weiblich unkastriert $n=51$; weiblich kastriert $n=35$). Das Durchschnittsalter der Tiere betrug 5 Jahre (arithmetischer Mittelwert), die Hunde waren zwischen 2 Monate und 13 Jahre alt. Bei einem Tier lag keine Altersangabe vor. Es handelte sich um 46 Mischlinge, anteilig gefolgt von den Rassen Labrador Retriever ($n=13$), Golden Retriever ($n=13$), Berner Sennenhund ($n=9$) und folgenden Rassen (alphabetische Aufzählung):

Airedale Terrier (n=1), Akita Inu (n=2), Appenzeller Sennenhund (n=1), Australian Shepherd (n=1), Beagle (n=1), Bearded Collie (n=2), Berger De Pyrénées (n=1), Bernhardiner (n=1), Bordeauxdogge (n=1), Border Collie (n=2), Boxer (n=2), Briard (n=2), Cavalier King Charles Spaniel (n=1), Chihuahua (n=2), Cocker Spaniel (n=2), Collie Langhaar (n=1), Dackel (n=4), Deutsch Drahthaar (n=1), Deutsche Dogge (n=2), Deutscher Jagdterrier (n=1), Deutscher Schäferhund (n=3), Dobermann (n=3), Espagneul Breton (n=1), Französische Bulldogge (n=2), Hovawart (n=6), Irischer Wolfshund (n=1), Irish Setter (n=1), Irish Terrier (n=2), Jack Russel Terrier (n=2), Kangal (n=1), Kromfohrländer (n=2), Lhasa Apso (n=1), Magyar Vizsla (n=1), Malinois (n=2), Malteser (n=1), Mastiff (n=1), Mittelschnauzer (n=1), Mops (n=1), Neufundländer (n=1), Nova Scotia Duck Tolling Retriever (n=1), PON (Polski Owczarek Nizinny) (n=1), Pudeln (n=6), Rhodesian Ridgeback (n=2), Riesenschnauzer (n=1), Rottweiler (n=4), Russischer Terrier (n=1), Shetland Sheepdog (n=2), Wachtel (n=2), Weimaraner (n=1), Welsh Springer Spaniel (n=1), West Highland White Terrier (n=2), Yorkshire Terrier (n=5), Zwergschnauzer (n=4)

3.3 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Zusätzlich zu Thrombozytenzahl, -indizes, rPLT-Prozentzahl- und -Absolutzahl wurden weitere Informationen wie Alter, Datum, Geschlecht und Rasse in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel 2013 eingetragen und verarbeitet.

Die statistische Überprüfung der Aussagekraft der rPLTs, des MPVs und die Überprüfung des Cut-Offs nach Oellers erfolgte anhand der Erstellung von Receiver-Operating-Characteristic (ROC)-Kurven. Als Software diente „MedCalc“ Version 12.7.5.0.

Die Betrachtung der Thrombozytenindizes hinsichtlich signifikanter Unterschiede in den Gruppen „Regeneration“ ($rPLT \geq 9,36\%$) und „Nicht-Regeneration“ ($rPLT < 9,36\%$) unter Verwendung dieses Cut-Offs erfolgte mit Hilfe des Mann Whitney U- Test. Als Test auf Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilk-Test angewendet. Als Software hierbei diente „GraphPad Prism“ Version 6.

Die Darstellung der Daten erfolgte anhand von ROC-Kurven, Punktwolkendiagrammen und Box- and Whisker-Plots.

3.3.1 PRÄZISION DES ADVIA BEI NIEDRIGEN THROMBOZYTENZAHLEN

Die Präzision des ADVIA 2120 bei niedrigen Thrombozytenzahlen wurde ermittelt. Hierfür wurden mehrere Röhrchen an EDTA-Blut eines gesunden Hundes benutzt und durch Zentrifugation plättchenarmes Plasma gewonnen. Das Vollblut dieses Tieres wurde schrittweise mit dem thrombozytenarmen Plasma vermischt und am ADVIA 2120 jeweils bei Thrombozytenzahlen von ca. $15 \times 10^9/l$, $50 \times 10^9/l$ und $70 \times 10^9/l$ analysiert. Der arithmetische Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient (CV) wurden berechnet.

3.3.2 UNTERSUCHUNG DER AUSSAGEKRAFT DER rPLT%, rPLT# UND DES MPVs UND ÜBERPRÜFUNG DES CUT-OFF OELLERS ANHAND EINER DEFINIERTEN BIOLOGISCHEN REGENERATION

Biologische Regeneration wurde definiert als eine Erhöhung der Thrombozytenzahl $> 25\%$ ausgehend von der Thrombozytenzahl bei erster Messung (Tag 0) im Vergleich zur Thrombozytenzahl bei der letzten Kontrollmessung (min. 2 bis max. 28 Tage) im Retikulozytenkanal, wobei 25% dem erlaubten Gesamtfehler (allowable total error, TEa) der Thrombozytenmessung mittels ADVIA 2120 entspricht (Nabity et al., 2014). Zur Überprüfung des Cut-Offs diente die Software „MedCalc“. Es wurden jeweils mithilfe der Analyse von ROC (Receiver-Operating-Characteristic)-Kurven die AUC (area under the curve) für rPLT%, rPLT# und MPV berechnet. Außerdem der Cut-Off für rPLT%, rPLT# und MPV mit der gleichzeitig höchsten Sensitivität und Spezifität festgestellt und Sensitivität und Spezifität des Cut-Off Oellers untersucht. Desweiteren wurde ermittelt, ab welchem rPLT%-, rPLT#- sowie MPV-Cut-Off die höchste Spezifität erreicht werden kann.

Grenzwertoptimierungskurven ermöglichen es darzustellen, ob retikulierte Thrombozyten oder das mittlere Thrombozytenvolumen eine Regeneration im Sinne gesteigerter Thrombopoese zuverlässig anzeigen können. Auf der Y-Achse wird die Sensitivität aufgetragen, auf der X-Achse die reverse Spezifität (100-Spezifität). Damit ist eine hohe Spezifität links im Diagramm dargestellt. Die ROC-Kurve sollte möglichst weit nach links-oben führen, da dort die höchstmögliche Sensitivität bei höchstmöglicher Spezifität erreicht wird. Die Sensitivität gibt den Anteil der richtig positiv erkannten an den tatsächlich vorhandenen positiven Proben an. Die Spezifität gibt dementsprechend den Anteil der richtig negativen an den tatsächlich vorhandenen negativen Proben an. Tatsächlich positive bzw. negative Proben werden anhand der Referenzmethode als solche klassifiziert.

Eine ROC-Kurve nahe der Diagonalen deutet auf einen Zufallsprozess hin. Die area under the curve einer ROC-Kurve kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. 0,5 stellt den schlechtesten Wert dar, da er der Fläche unter der Diagonalen entspricht. Ein optimaler Wert liegt möglichst nahe bei 1.

3.3.3 KLASSIFIKATION DER RPLT% NACH CUT-OFF OELLERS IN ZWEI GRUPPEN; GRUPPENVERGLEICH BZGL. THROMBOZYTENZAHL UND - INDIZES; KORRELATION MPV- RPLT%

Die Hunde wurden anhand ihrer Prozentzahl an rPLTs bei Erstmessung in zwei Gruppen eingeteilt. Die Gruppe mit einer rPLT%-Zahl gleich oder über dem Cut-Off nach Oellers von 9,36 wurde als „Regeneration“ bezeichnet, diejenigen Tiere mit rPLT%-Werten unter 9,36 als „Nicht-Regeneration“.

Der Gruppenvergleich der PLT-Indizes auf signifikante Unterschiede erfolgte mit dem Statistikprogramm „Graph Pad Prism“. Es wurde der Shapiro-Wilk-Test als Test auf Normalverteilung eingesetzt. Für den Vergleich der Thrombozytenindizes in den Gruppen wurde der Mann Whitney U-Test herangezogen und die p-Werte ermittelt (Signifikanzniveau von 5%, $p \leq 0,05$) sowie Medianwert, Maximum und Minimum (Range) angegeben. Weiterhin wurde die Korrelation zwischen MPV und rPLT% berechnet. Das Ausmaß der Intensität der Abhängigkeit, die zwischen zwei Merkmalen herrscht, wird durch die Korrelation beschrieben.

4 ERGEBNISSE

In den folgenden Kapiteln wird als erstes die Präzision des ADVIA 2120 im niedrigen Thrombozytenzahlenbereich angegeben. Die Messungen wurden bei drei verschiedenen Konzentrationen an Thrombozyten ($15, 50, 70 \times 10^9/l$) vorgenommen. Nachfolgend wird anhand von 474 Messungen die Aussagekraft der rPLT%- und rPLT#-Werte und des Thrombozytenvolumenindex MPV bzgl. einer Regeneration dargestellt. In diesem Rahmen wird der Cut-Off Oellers hinsichtlich Sensitivität und Spezifität überprüft. Dieser Cut-Off Wert wurde anhand des oberen Referenzwertes und, aufgrund der hohen Impräzision der Methode, auch unter Heranziehung des Variationskoeffizienten erstellt. Somit errechnete sich bei einem oberen Referenzwert von 6,9% und einem CV von 35,64% für den ADVIA 120/2120 ein Cut-Off von 9,36%. Für genauere Informationen zur Cut-Off-Erstellung sei auf die Literatur von Oellers verwiesen (Oellers, 2015). Weiterhin wurden der Cut-Off für die rPLT%- und rPLT#-Werte sowie für das MPV mit der gleichzeitig höchsten Sensitivität und Spezifität sowie diese genannten Parameter mit der bestmöglichen Spezifität angegeben. Dies alles geschieht mithilfe der ermittelten biologischen Regeneration.

Zuletzt wird die Klassifikation des rPLT%-Wertes anhand des von der Arbeitsgruppe um Oellers 2014 ermittelten Cut-Offs von $\geq 9,36\%$ in „Regeneration“ und „Nicht-Regeneration“ dargestellt und nachfolgend die Thrombozytenzahl und -indizes in diesen beiden Gruppen verglichen. In diesem Rahmen wird die Korrelation zwischen MPV und rPLT% angegeben.

4.1 PRÄZISION DES ADVIA BEI NIEDRIGEN THROMBOZYTENZAHLEN

Parameter	Einheit	Mittelwert ± Standardabweichung $\bar{x} \pm S$	Variationskoeffizient CV (%)
rPLT ADVIA	%	3,33±1,22	36,67
rPLT ADVIA	10 ⁹ /l	8,13±3,31	40,74
PLT	10 ⁹ /l	13,67±1,54	11,29
MPV	fl	12,33±1,08	8,75
PDW	%	96,65±5,01	5,18
PCT	%	0,02±0,00	26,41
MPC	g/dl	14,93±0,64	4,31
PCDW	g/dl	7,23±0,65	8,94
MPM	pg	1,36±0,08	5,79
PMDW	pg	0,80±0,07	9,26
Large PLTs	10 ⁹ /l	1,87±0,64	34,28

Tab. 3: Präzision des ADVIA 2120 bei Thrombozytenzahlen von ca.15 x 10⁹/l, n=1, 15-fache Messung

Die Variationskoeffizienten der Thrombozytenzahl und -indizes MPV, PDW, MPC, PCDW, MPM, PMDW befinden sich in einem Bereich von 4,31% bis 11,29%, während für PCT und Large Platelets sowie für rPLT% und rPLT# hohe Werte von 26,41% bis 40,74% ermittelt wurden.

rPLT: reticulated platelet; PLT: platelet; PLT: platelet; MPV: mean platelet volume;

PDW: platelet distribution width; PCT: Plateletcrit; MPC: mean platelet component

PCDW: platelet component distribution width; MPM: mean platelet mass;

PMDW: platelet mass distribution width; LPLT: large platelet

Parameter	Einheit	Mittelwert ± Standardabweichung $x \pm S$	Variationskoeffizient CV (%)
rPLT ADVIA	%	1,55±0,63	40,57
rPLT ADVIA	10 ⁹ /l	10,00±4,09	40,88
PLT	10 ⁹ /l	49,07±2,05	4,18
MPV	fl	11,45±0,54	4,76
PDW	%	80,82±3,48	4,31
PCT	%	0,06±0,01	10,89
MPC	g/dl	17,56±0,49	2,81
PCDW	g/dl	8,23±0,36	4,39
MPM	pg	1,54±0,04	2,53
PMDW	pg	0,72±0,04	5,37
Large PLTs	10 ⁹ /l	5,80±1,01	17,49

Tab. 4: Präzision des ADVIA 2120 bei Thrombozytenzahlen von ca. 50 x 10⁹/l, n=1, 15-fache Messung

Die Variationskoeffizienten der Thrombozytenzahl und –indizes MPV, PDW, PCT, MPC, PCDW, MPM, PMDW befinden sich in einem Bereich von 2,53 bis 10,89%, während für Large Platelets hohe Werte von 17,49% und für rPLT# sowie rPLT% noch höhere Werte von 40,88% bzw. 40,57% ermittelt wurden.

rPLT: reticulated platelet; PLT: platelet; PLT: platelet; MPV: mean platelet volume;
 PDW: platelet distribution width; PCT: Plateletcrit; MPC: mean platelet component
 PCDW: platelet component distribution width; MPM: mean platelet mass;
 PMDW: platelet mass distribution width; LPLT: large platelet

Parameter	Einheit	Mittelwert ± Standardabweichung $x \pm S$	Variationskoeffizient CV (%)
rPLT ADVIA	%	1,38±0,37	27,04
rPLT ADVIA	10 ⁹ /l	10,80±3,28	30,35
PLT	10 ⁹ /l	75,73±3,58	4,72
MPV	fl	9,77 ±0,66	6,71
PDW	%	66,35±4,73	7,12
PCT	%	0,07±0,01	13,31
MPC	g/dl	21,31±0,68	3,21
PCDW	g/dl	7,48±0,78	10,43
MPM	pg	1,78±0,02	1,29
PMDW	pg	0,77±0,03	4,05
Large PLTs	10 ⁹ /l	4,67±1,68	35,92

Tab. 5: Präzision des ADVIA 2120 bei Thrombozytenzahlen von ca. 70 x 10⁹/l, n=1, 15-fache Messung

Die Variationskoeffizienten der Thrombozytenzahl und -indizes MPV, PDW, PCT, MPC, PCDW, MPM, PMDW befinden sich in einem Bereich von 1,29 bis 13,31%, während für Large Platelets, rPLT# und rPLT% hohe Werte von 35,92%, 30,35% und 27,04% ermittelt wurden.

rPLT: reticulated platelet; PLT: platelet; PLT: platelet; MPV: mean platelet volume; PDW: platelet distribution width; PCT: Plateletcrit; MPC: mean platelet component PCDW: platelet component distribution width; MPM: mean platelet mass; PMDW: platelet mass distribution width; LPLT: large platelet

4.2 ÜBERPRÜFUNG DER AUSSAGEKRAFT DER RPLT%, RPLT# UND DES MPVS; ÜBERPRÜFUNG DES CUT-OFF OELLERS

4.2.1 ROC-KURVEN

ROC-Kurven dienen der Überprüfung der Aussagekraft bezüglich einer Regeneration. ROC-Kurven ermöglichen die graphische Darstellung der Abhängigkeit von Trefferquote (Richtig-Positiv-Rate) und Fehlerquote (Falsch-Positiv-Rate). Die Analyse anhand von ROC-Kurven ermöglicht die Ermittlung eines Optimums, das heisst, einer Kombination aus höchster Treffer- und geringster Fehlerquote. Zu den ROC-Kurven wurde die jeweilige AUC berechnet und Cut-Offs mit gleichzeitig höchster Sensitivität und Spezifität ermittelt. Untenstehend werden die ROC-Kurven zur Verdeutlichung abgebildet.

Es werden die Werte der AUC, des 95%-Konfidenzintervalls angegeben und der p-Wert dargestellt. Der AUC-Wert ist die Fläche unterhalb der Kurve und spiegelt die Qualität der Methode wider. Er kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen, 0,5 stellt den schlechtesten Wert dar. Unterscheidet der AUC-Wert sich signifikant von 0,5, so kann der Parameter zwischen „Regeneration“ und „Nicht-Regeneration“ unterscheiden. Die genannten Werte sind im Folgenden für die Parameter rPLT%, rPLT# und MPV tabellarisch dargestellt.

Parameter	AUC	95% Konfidenz- intervall	Signifikanz- level p
rPLT%	0,746	0,676-0,807	<0,0001
rPLT#	0,551	0.505-0.597	0.0522
MPV(fl)	0,655	0,581-0,723	0,0002

Tab. 6: ROC-Kurven der drei Parameter rPLT%, rPLT# und MPV
AUC: Fläche unter der ROC-Kurve (area under the ROC curve), n=183
rPLT: reticulated platelet; MPV: mean platelet volume; fl: Femtoliter

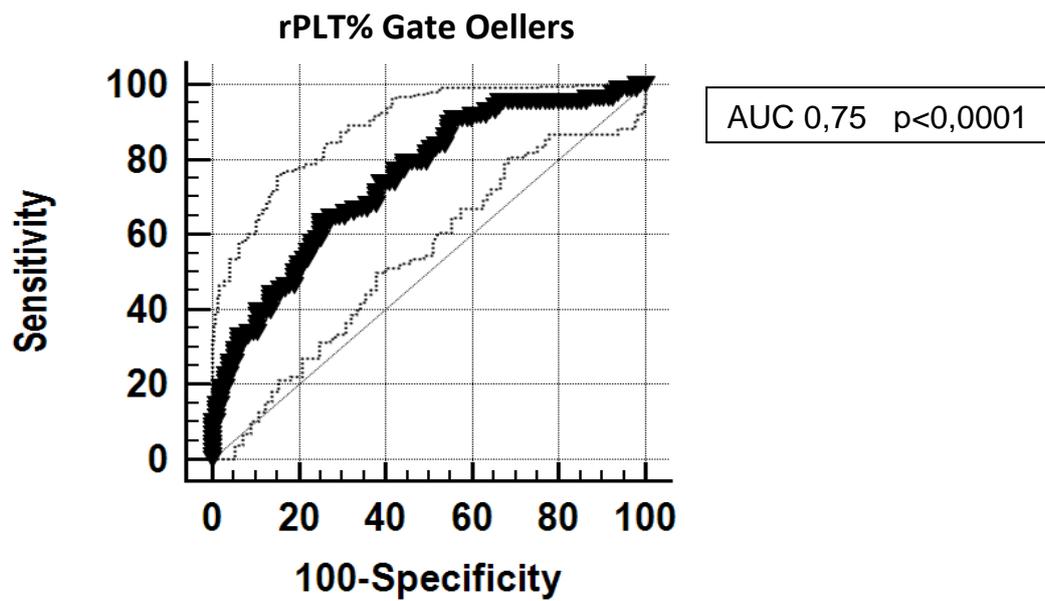


Abb. 9: ROC-Kurve rPLT%, die AUC (area under the curve) beträgt 0,75.
rPLT: reticulated platelets

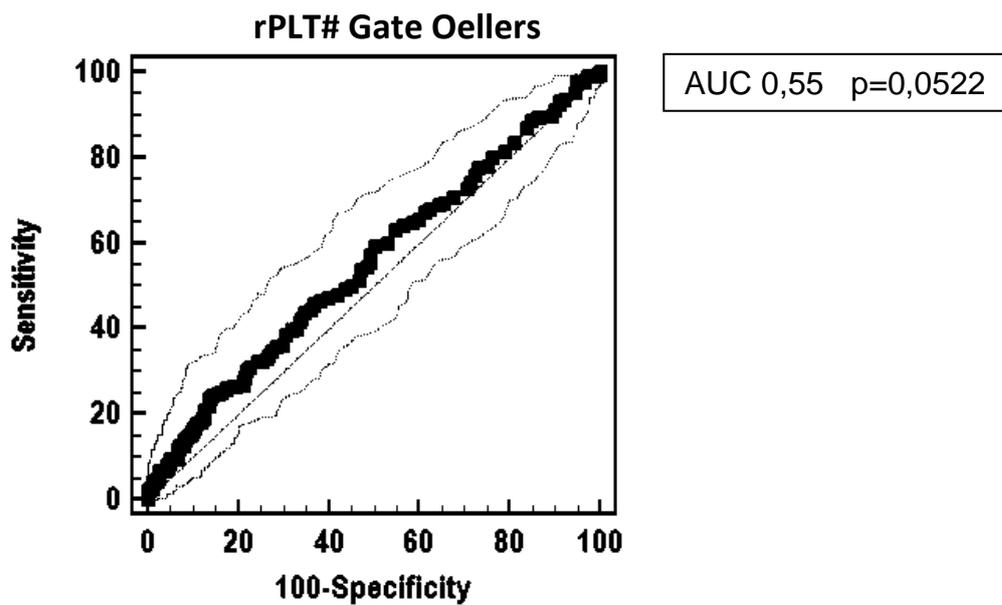
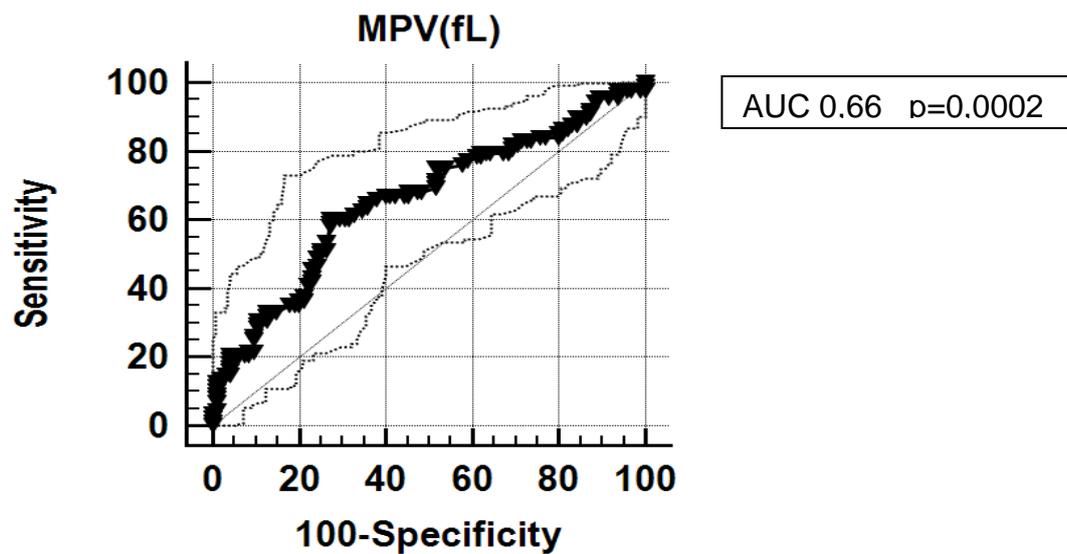


Abb. 10: ROC-Kurve rPLT#, die Fläche unter der Kurve beträgt 0,55
rPLT: reticulated platelets
AUC: area under the curve



**Abb. 11: ROC-Kurve MPV, die AUC (area under the curve) beträgt 0,66.
MPV: mean platelet volume**

Die Betrachtung der ROC-Kurve der rPLT% zeigt, dass der Parameter in der Lage ist, eine Regeneration des thrombozytären Systems anzugeben. Deutlich zeigt die auf der Diagonalen liegende Kurve, dass es sich bei der Beurteilung der Regeneration der Thrombozytenzahl anhand der rPLT# nahezu um einen Zufallsprozess handeln würde.

Der Parameter MPV zeigt mit einer AUC von 0,66 eine gewisse Aussagekraft und kann eventuell orientierend zum rPLT-Prozentwert herangezogen werden.

4.2.2 ERMITTLUNG DER CUT-OFFS MIT HÖCHSTER SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT DER rPLT%, rPLT# UND DES MPVs; DARSTELLUNG DER CUT-OFFS MIT HÖCHSTER SPEZIFITÄT DIESER PARAMETER; ÜBERPRÜFUNG DES CUT-OFF OELLERS

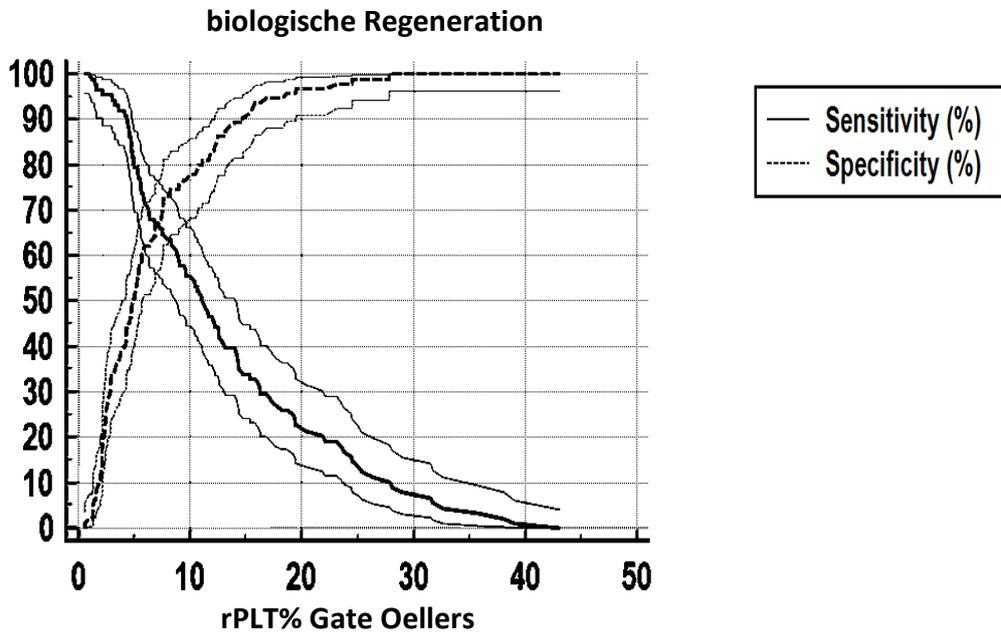


Abb. 12: Darstellung des Schnittpunktes zwischen Sensitivität und Spezifität zur Ermittlung des Cut-Offs mit gleichzeitig höchster Sensitivität und Spezifität anhand der ROC-Kurve.
rPLT: reticulated platelet

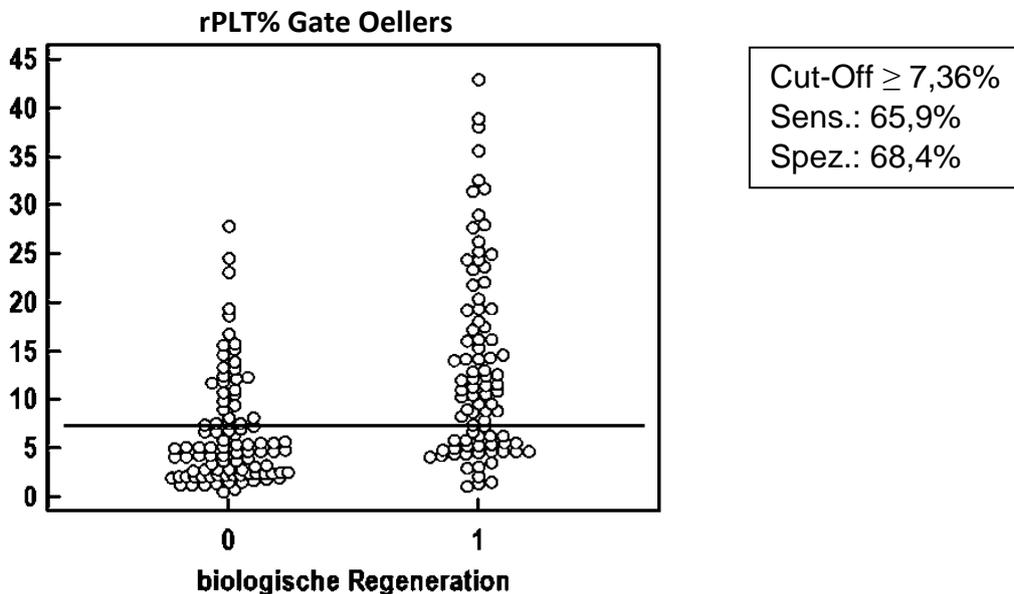


Abb. 13: Darstellung des Cut-Offs rPLT% mit der gleichzeitig höchsten Sensitivität und Spezifität, verdeutlicht im Punktdiagramm, n=183
0: keine biologische Regeneration
1: biologische Regeneration
rPLT: reticulated platelet

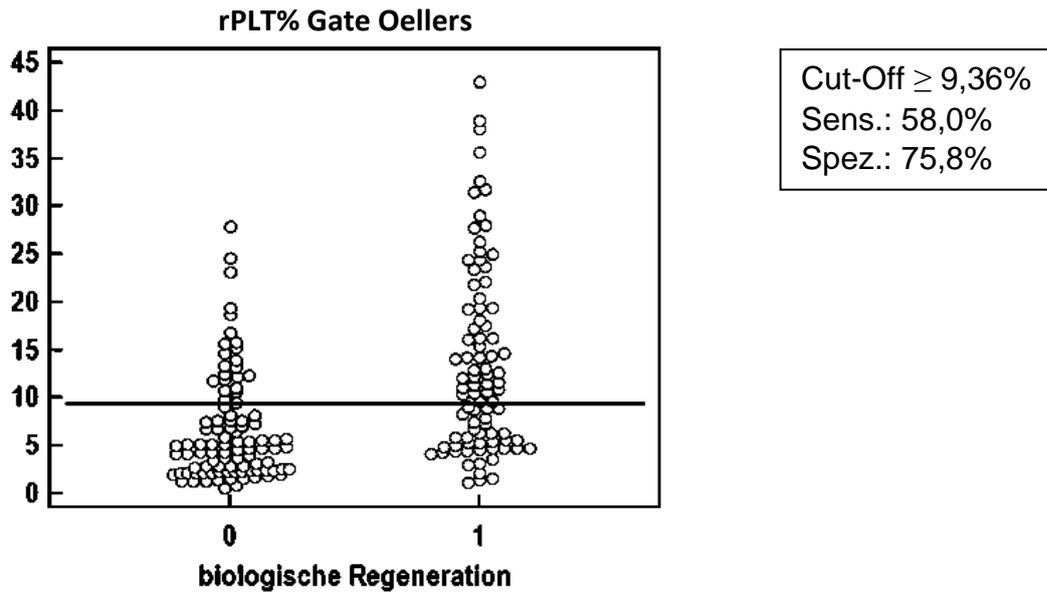


Abb. 14: Darstellung des Cut-Offs nach Oellers im Punktdiagramm mit höherer Spezifität als der Cut-Off von 7,36%, n=183
 0: keine biologische Regeneration
 1: biologische Regeneration
 rPLT: reticulated platelet

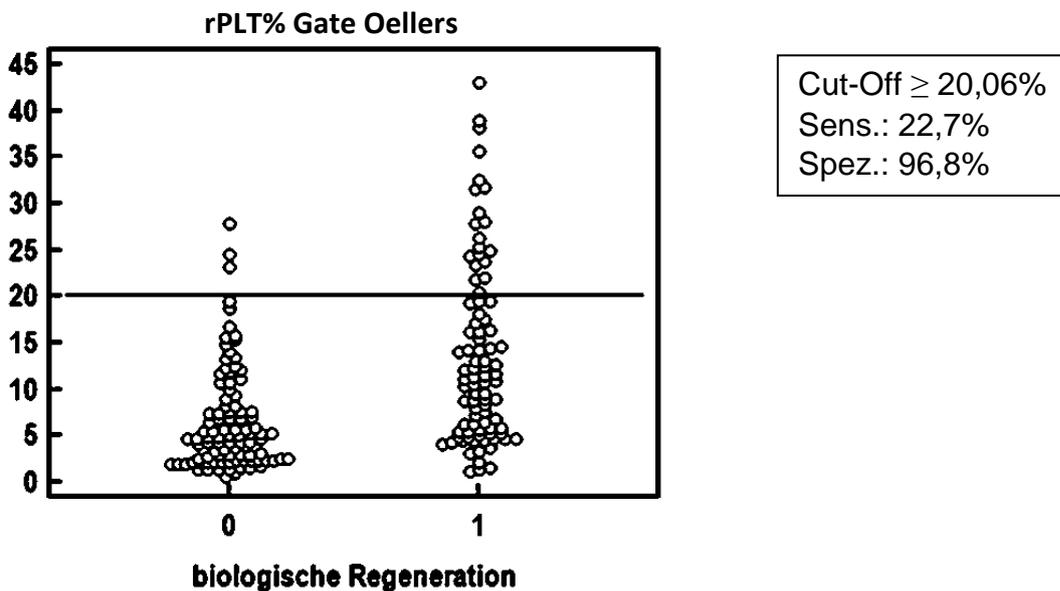


Abb. 15: Darstellung des Cut-Offs mit höchstmöglicher Spezifität. Diese kann erst bei einem Cut-Off von 20,06% erreicht werden, n=183
 rPLT: reticulated platelet

Bei der rPLT-Prozentzahl liegt der Cut-Off mit höchster Sensitivität und Spezifität von 65,9% bzw. 68,4% 2 Prozentpunkte unter dem Cut-Off Oellers bei 7,36%.

Hierbei zeigt jedoch der Cut-Off nach Oellers von 9,36% mit 75,8% eine höhere Spezifität.

Eine sehr hohe Spezifität und damit sichere Aussage über die Regeneration kann erst bei einem Cut-Off von 20,06% und mehr getätigt werden.

Betrachtet man die rPLT#, so liegt der Cut-Off mit höchster Sensitivität und Spezifität von 23,5% bzw. 86,4% bei 8,60 rPLTs.

Eine sehr hohe Spezifität und damit sichere Aussage über die Regeneration kann erst bei einem Cut-Off von 20,18 rPLTs getätigt werden

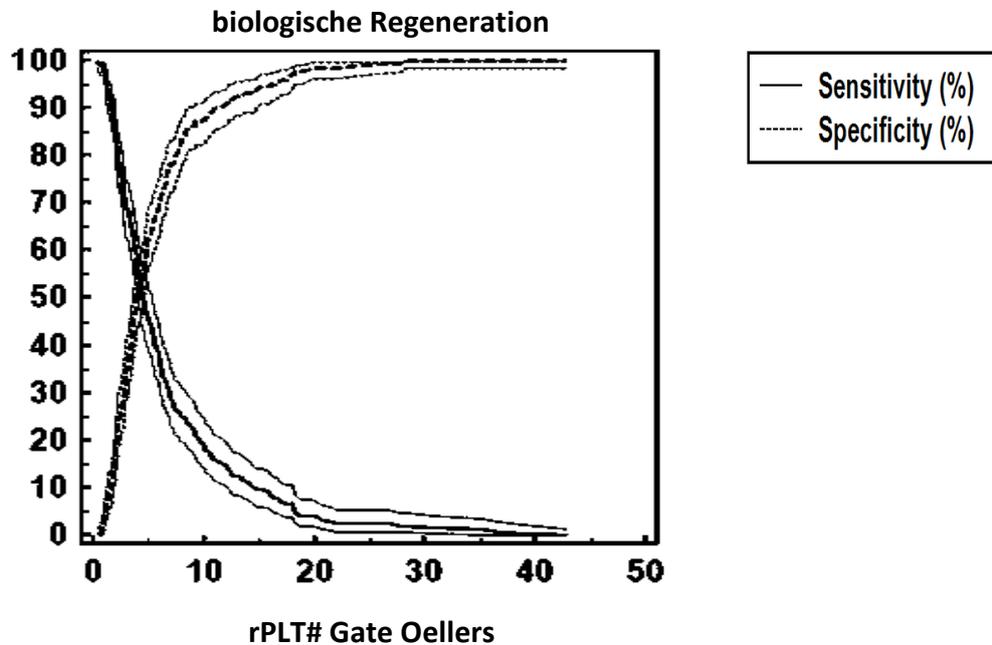


Abb. 16: Darstellung des Schnittpunktes zwischen Sensitivität und Spezifität zur Ermittlung des Cut-Offs mit gleichzeitig höchster Sensitivität und Spezifität anhand der ROC-Kurve.
rPLT: reticulated platelet; #: Absolutzahl

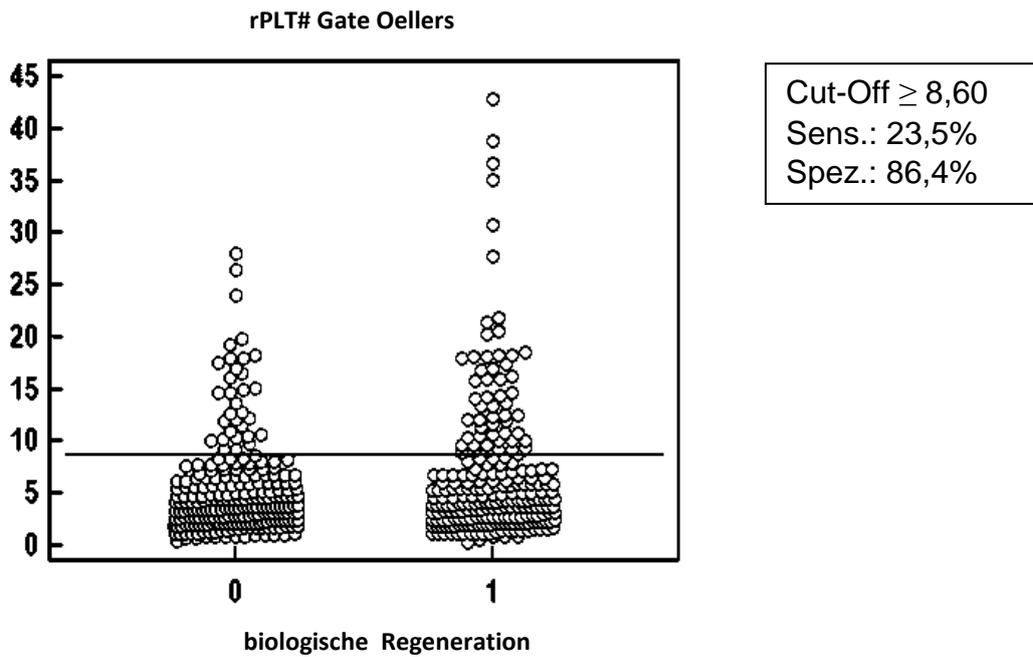


Abb. 17: Darstellung des Cut-Offs rPLT# mit der gleichzeitig höchsten Sensitivität und Spezifität, verdeutlicht im Punktdiagramm, n=183

0: keine biologische Regeneration

1: biologische Regeneration

rPLT: reticulated platelet; #: Absolutzahl

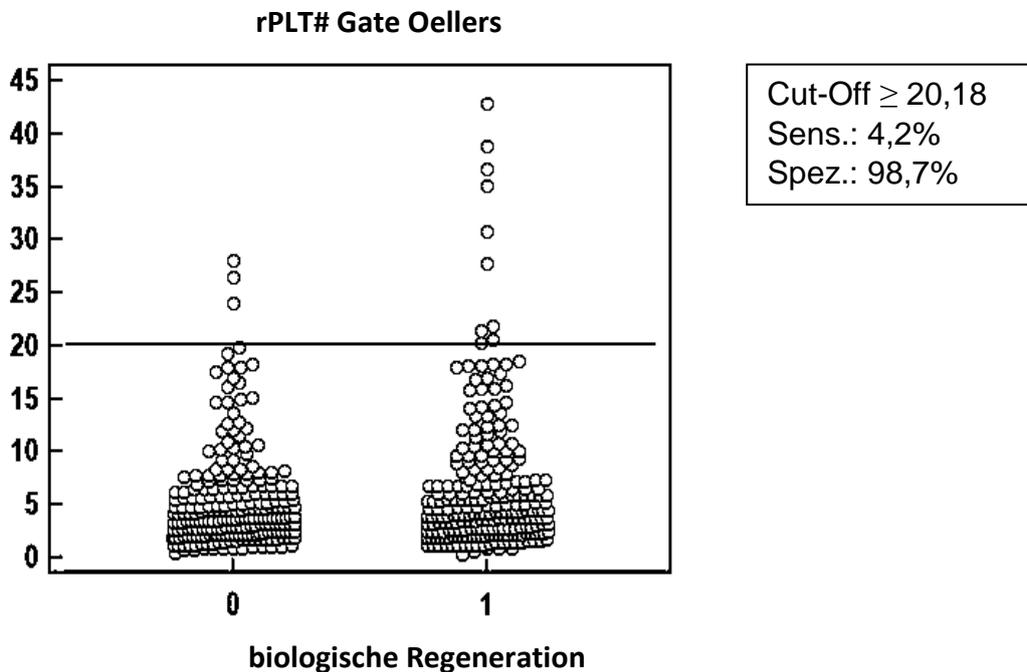


Abb. 18: Darstellung des Cut-Offs mit höchstmöglicher Spezifität. Diese kann erst bei einem Cut-Off von 20,18% erreicht werden, n=183

0: keine biologische Regeneration

1: biologische Regeneration

rPLT: reticulated platelets; #: Absolutzahl

Bei einem MPV von 16,7fl zeigt sich die höchste Sensitivität und Spezifität. Erst bei einem MPV von 23,5fl kann eine Spezifität von 98,9% erreicht werden.

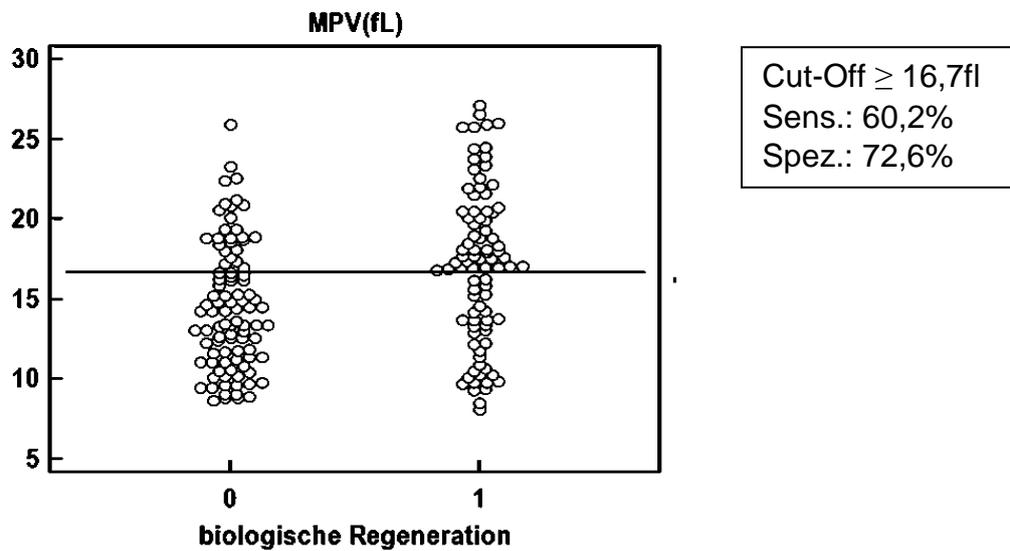


Abb. 19: Darstellung des MPVs mit höchstmöglicher Sensitivität und Spezifität bei einem Cut-Off von 16,7fl, n=183

0: keine biologische Regeneration
1: biologische Regeneration
MPV: mean platelet volume

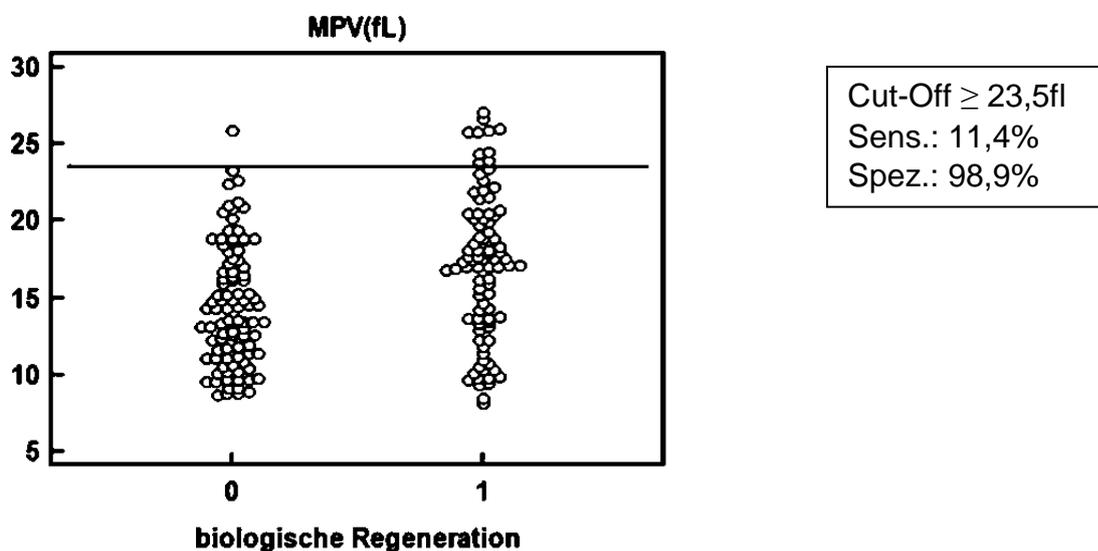


Abb. 20: Darstellung des MPVs bei einem Cut-Off von 23,5fl. Bei diesem Cut-Off kann eine sehr hohe Spezifität von 98,9% erreicht werden, n=183

0: keine biologische Regeneration
1: biologische Regeneration
MPV: mean platelet volume

4.3 VERGLEICH DER THROMBOZYTENZAHL UND -INDIZES IN DEN GRUPPEN „REGENERATION“ UND „NICHT-REGENERATION“ NACH CUT-OFF OELLERS; KORRELATION DER RPLT% MIT DEM MPV

Im Folgenden wird die Einteilung der rPLT% nach errechnetem Cut-Off Oellers in zwei Gruppen („Regeneration“ und „Nicht-Regeneration“) und nachfolgend der Vergleich der Thrombozytenindizes nach dieser entsprechenden Klassifikation angegeben. Die Einteilung nach Cut-Off von Dana Oellers ergab 276 Messungen in der „nichtregenerativen“ Gruppe $< 9,36\%$ und 198 Messungen in der „regenerativen“ Gruppe $\geq 9,36\%$.

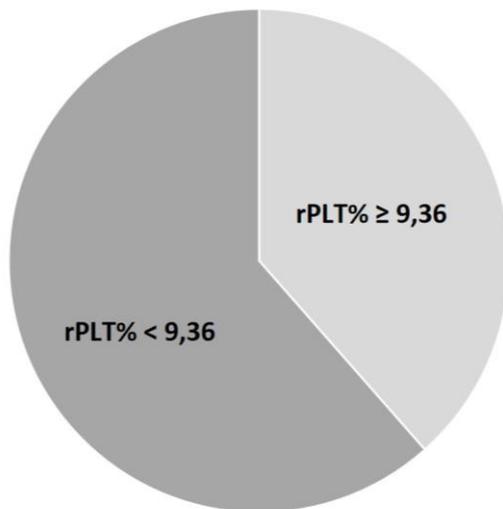


Abb. 21: Darstellung der Klassifikation der rPLTs anhand des Cut-Offs von 9,36%; dunkelgrau („nichtregenerativ“ Gruppe), n= 276, hellgrau („regenerativ“ Gruppe), n= 198
rPLT: reticulated platelet

Beim Vergleich der Thrombozytenzahl und -indizes zwischen den Gruppen stellte sich heraus, dass fast alle signifikante Unterschiede ($p < 0.0001$) aufwiesen. Bei der Thrombozytenzahl, dem Thrombokrit und der mittleren Granularität fanden sich signifikant niedrigere ($p < 0.0001$) Werte in der „regenerativen“ Kategorie.

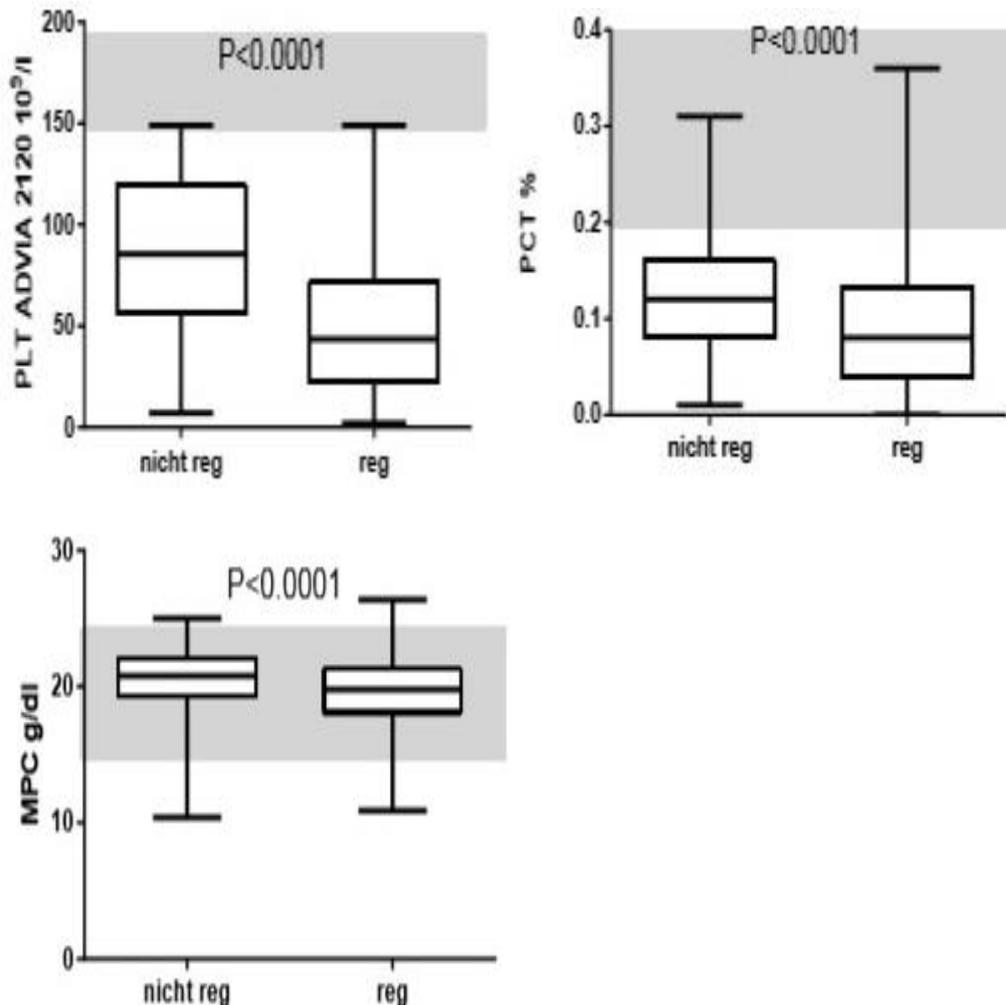


Abb. 22-24: Vergleich der Thrombozytenzahl und -indizes zwischen den beiden Gruppen „Nicht-Regeneration“ (n=276) und „Regeneration“ (n=198)

Box-Whisker-Plots sind begrenzt durch oberes und unteres Quartil und stellen 50% der beobachteten Daten dar. Die Linie in der Box gibt den Median an. Die Antennen stellen die beiden Extremwerte nach oben bzw. unten dar.

Grau unterlegt der von Oellers am ADVIA 120/2120 ermittelte Referenzbereich des Parameters
 PLT: platelets; PCT: plateletcrit; MPC: mean platelet component

Dagegen ergab die Auswertung des mittleren Thrombozytenvolumens, der Verteilungsbreite der mittleren Granularität, der mittleren Plättchenmasse und deren Verteilungsbreite, signifikant höhere ($p < 0,0001$) Werte in der „regenerativen“ Kategorie.

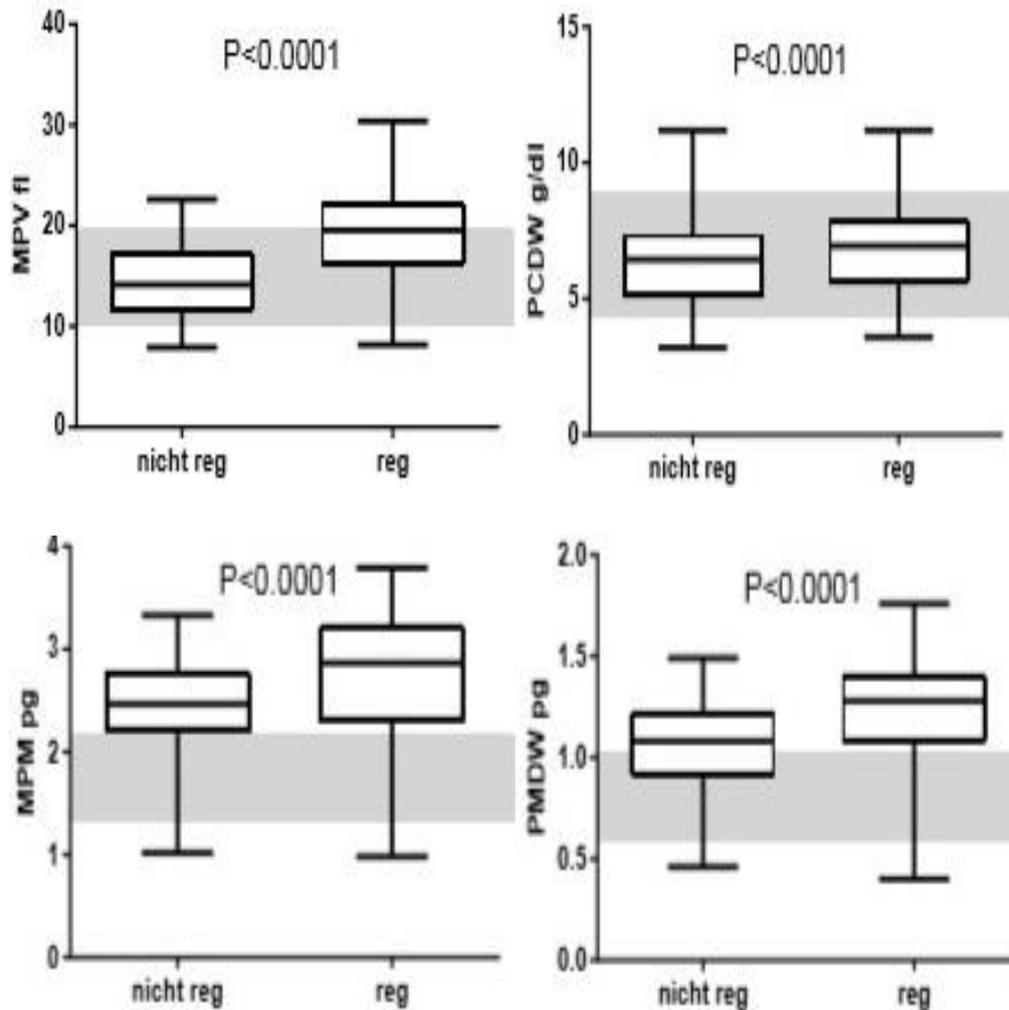


Abb. 25-28: Vergleich der Thrombozytenindizes in den beiden Gruppen „Nicht-Regeneration“ (n=276) und „Regeneration“ (n=198)

grau unterlegt der von Oellers am ADVIA 120/2120 ermittelte Referenzbereich des Parameters

MPV: mean platelet volume; PCDW: platelet component distribution width;

MPM: mean platelet mass; PMDW: platelet mass distribution width

Bei der Thrombozytenverteilungsbreite und den Large Platelets konnten keine signifikanten ($p=0,173$ bzw. $p=0,619$) Unterschiede festgestellt werden.

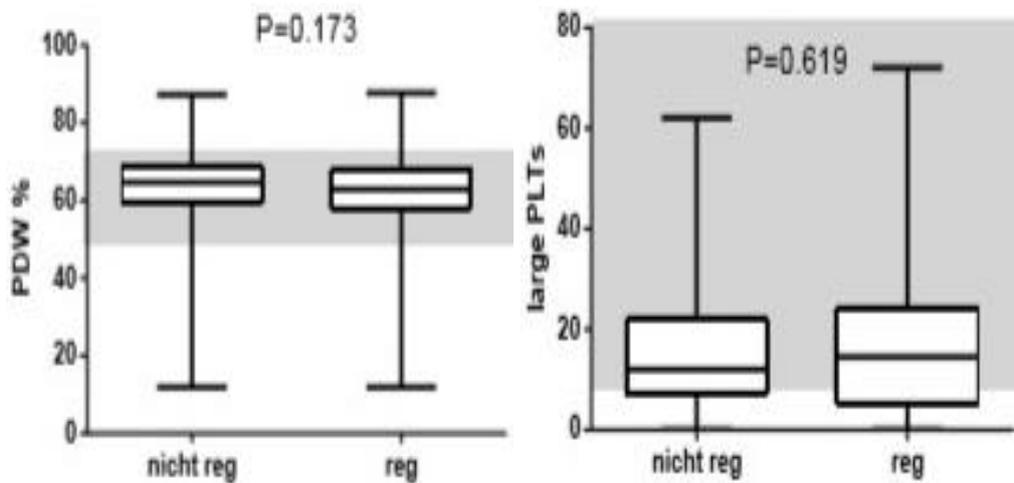


Abb. 29 und 30: Vergleich der Thrombozytenindizes in den beiden Gruppen „Nicht-Regeneration“ (n=276) und „Regeneration“ (n=198).

Grau unterlegt der von Oellers am ADVIA 120/2120 ermittelte Referenzbereich des Parameters PDW: platelet distribution width; LPLT: large platelet

Es besteht nur eine mäßige Korrelation zwischen rPLT% und MPV mit einem Koeffizienten von 0,60.

Parameter und Einheit	r_s
rPLT(%) ADVIA vs. MPV(fl) ADVIA	0,60

Tab. 7: Korrelation zwischen retikulierten Thrombozyten in Prozent und MPV am ADVIA 2120
 r_s : Spearmans Rangkorrelationskoeffizient, n=474

Auf den ersten Blick ist im folgenden Punktdiagramm zu sehen, dass eine große Anzahl der Messungen sowohl über als auch unter dem Cut-Off ein MPV im Referenzbereich aufweist. Der Referenzbereich des MPVs wurde von Oellers anhand von 193 gesunden Hunden am ADVIA 120/2120 ermittelt. Das untere Referenzlimit beträgt 8,9fl und das obere 18,4fl (Oellers, 2015).

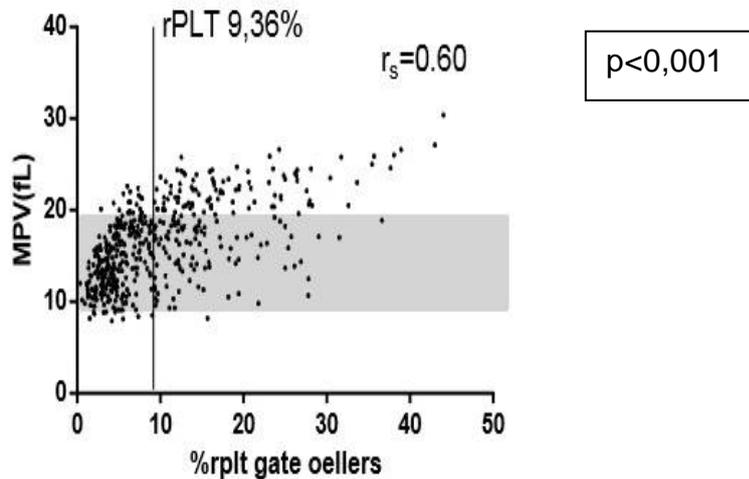


Abb. 31: Korrelation zwischen MPV und rPLT%;

Grau unterlegt der von Oellers am ADVIA 120/2120 ermittelte Referenzbereich des Parameters.

Eine große Anzahl der Messungen sowohl über als auch unter dem Cut-Off von 9,36% weist ein MPV im Referenzbereich auf.

rPLT: reticulated platelet

MPV: mean platelet volume

fl: Femtoliter

r_s : Spearmans Rangkorrelationskoeffizient

5 DISKUSSION

Die Messung und Auswertung von Thrombozytenindizes und insbesondere von retikulierten Thrombozyten stellen in der Veterinärmedizin bisher keine Routineverfahren dar. Mittels rPLTs ist man in der Humanmedizin bereits in der Lage, eine Regeneration bei Thrombozytopenie im Sinne gesteigerter Thrombopoese zu erkennen (Kienast und Schmitz, 1990; Briggs et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit sollte zum einen die Aussagekraft der Parameter rPLT und MPV untersucht werden und zum anderen der rechnerisch ermittelte Cut-Off-Wert (oberes Referenzlimit + CV) von 9,36% retikulierter Thrombozyten (Oellers, 2015), von dem anzunehmen ist, dass er, ähnlich den Retikulozyten bei Anämie und ähnlich den bisherigen Ergebnissen in der Humanmedizin, Aussagekraft über die Knochenmarkaktivität besitzt, überprüft werden. Dazu wurde der biologische Thrombozytenanstieg der Patienten im jeweils vorhandenen Messzeitraum untersucht. Ein Anstieg wurde definiert als eine Erhöhung der Thrombozytenzahl $> 25\%$ vom Ausgangswert (Tag 0) im Vergleich zur letzten Kontrollmessung (min. 2 - max. 28 Tage), wobei 25% dem erlaubten Gesamtfehler (allowable total error, Tea) der Thrombozytenmessung mittels ADVIA 2120 entspricht (Nabity et al., 2014). Die Tiere wurden so anhand ihrer ausreichenden oder fehlenden bzw. unzureichenden Steigerung der Thrombozytenzahl in eine Gruppe mit und ohne biologischen Anstieg eingeteilt. Evaluiert wurden anhand der AUC die Aussagekraft der rPLT%-, rPLT#- und MPV-Werte sowie die Cut-Offs von rPLT% und MPV mit höchster Sensitivität und Spezifität zur Erkennung einer (zukünftigen) Regeneration und außerdem Sensitivität und Spezifität des Cut-Off Oellers von 9,36%. Zudem sollte der klinische Nutzen von Thrombozytenindizes als Marker der Thrombopoese am thrombozytopenischen Hund im Zusammenhang mit dem Cut-Off Oellers untersucht werden.

Die Analyse von rPLTs am ADVIA 120/2120 ist erst seit 2015 möglich (Oellers, 2015). In vorliegender Studie wurden anhand von 474 Messungen von 178 thrombozytopenischen Hunden aus sechs Jahren am ADVIA 2120 retikulierte Thrombozyten sowie Thrombozytenzahl und -indizes ermittelt. Die klinische Aussagekraft der rPLT%- und rPLT#-Werte beim Hund wurde bisher noch nicht bestätigt. Die Korrelation der Thrombozytenindizes mit den retikulierten Thrombozyten wurde für die Veterinärmedizin bisher erst einmal an Proben von gesunden Hunden und Hunden mit verschiedenen zugrundeliegenden Krankheiten am ADVIA 120/2120 durchgeführt. In vorliegender Arbeit fand eine Überprüfung des Cut-Offs nach Oellers anhand eines biologischen Anstiegs der

Thrombozytenzahl sowie ein Vergleich des Thrombozytenvolumenindex MPV an diesem Hämatologiegerät statt. Es handelt sich in dieser Studie im Vergleich zur Arbeit von Oellers um die Daten einer größeren Anzahl an Hunden und zudem um thrombozytopenische Hunde. Nachfolgend sollen die Resultate der Ermittlung des CV am ADVIA bei niedrigen Thrombozytenzahlen sowie die Ergebnisse hinsichtlich retikulierter Thrombozyten und Thrombozytenindizes als Marker der Regeneration diskutiert werden.

5.1 PRÄZISION DES ADVIA BEI NIEDRIGEN THROMBOZYTENZAHLEN

Der Variationskoeffizient der rPLT-Messung bei niedrigen Thrombozytenzahlen ist mit Werten über 20% als hoch zu bezeichnen. Ein hoher Variationskoeffizient spiegelt eine schlechte Messgenauigkeit wieder und sollte bei der Beurteilung von Ergebnissen immer mitbedacht werden. Laut Hoffmann unterscheidet sich der CV am Sysmex bei Thrombozytopenie von demjenigen bei normalen Plättchenzahlen. Die Präzision des Sysmex für die rPLT-Messung bei Thrombozytopenie beträgt 9-36%, im Gegensatz zur Präzision von 7-11% bei physiologischen Thrombozytenzahlen (Hoffmann, 2014). Bei Sysmex XE-2100- und XT-2000i-Modellen kann im Retikulozytenkanal zusätzlich die Fluoreszenz der Blutplättchen ermittelt werden, so dass von der Größe oder Form abweichende Erythrozyten oder auch Riesenthrombozyten im allgemeinen keine großen Probleme bei der Differenzierung der Zellpopulationen bereiten sollten (Mahlberg et al., 2005; Hoffmann, 2014).

Der CV für rPLTs relativ und absolut (% und #) am ADVIA 2120 bewegt sich bei niedrigen Plättchenzahlen in einem ähnlich hohen Bereich wie der von Oellers bei physiologischen Thrombozytenzahlen ermittelte Wert von 35,64% bzw. 36,97% (Oellers, 2015). Er liegt in den Bereichen zwischen $15 \times 10^9/l$ bis $70 \times 10^9/l$ in vorliegender Arbeit ähnlich hoch zwischen nahezu 30% und über 40%. Hier besteht also kein Unterschied zu den Messungen bei physiologischen Thrombozytenzahlen. Dies könnte darin begründet liegen, dass die von Oellers gemessenen Proben zwar Thrombozytenwerte im Referenzbereich zeigen, aber diese mit $318,45 \pm 21,97 \times 10^9/l$ doch im oberen Referenzbereich liegen. Der rPLT-Wert mit $0,73 \pm 0,26\%$ befindet sich dagegen eher in der unteren Norm. Dies kann zur statistischen Unpräzision durchaus beitragen, denn somit reichen schon geringe absolute Abweichungen aus, um den CV zu erhöhen (Oellers, 2015). Die Proben für die Präzision bei niedrigen Thrombozytenzahlen wiesen mit zunehmender Plättchenzahl abnehmende rPLT%-Werte im

Bereich von $3,33 \pm 1,22\%$ ($15 \times 10^9/l$), $1,55 \pm 0,63\%$ ($50 \times 10^9/l$) bzw. $1,38 \pm 0,37\%$ ($70 \times 10^9/l$) auf, was doch deutlich höhere Werte als bei Oellers darstellt.

(Ogura et al., 1995) sprechen im Zusammenhang mit der Impedanzmessung von hohen CV bei niedrigen Thrombozytenzahlen. Die Impedanzmethode stellt ein Widerstandsmessprinzip dar. In Abhängigkeit von ihrem Volumen besitzen Zellen einen elektrischen Widerstand, der anhand von Gleichstromspannung erfasst werden kann (Sysmex Deutschland GmbH, 2012). Impedanzmessung trennt Zellen nur anhand ihrer Größe (Mahlberg et al., 2005). Veränderungen in der Erythrozytenmorphologie, wie es z. B. bei Akanthozyten und noch mehr bei Fragmentozyten der Fall ist, können zu einer starken Abnahme des Zellvolumens führen. Somit können diese veränderten roten Blutzellen unter Umständen nicht von den Thrombozyten differenziert werden bzw. gehen in die Analyse der Thrombozytenindizes mit ein (Sysmex Deutschland GmbH, 2012). Dies könnte eine Erklärung für einen hohen Variationskoeffizienten darstellen. Das Hämatologiegerät ADVIA 2120 trennt die Zellen nicht nur aufgrund ihrer Größe; somit sollte dieser Umstand nicht in gleichem Maße wie bei Impedanzgeräten auftreten.

5.2 RETIKULIERTE THROMBOZYTEN ALS MARKER DER THROMBOPOESE

5.2.1 RPLT-PROZENTZAHL

Dass retikulierte Thrombozyten bei Thrombozytenmangel eine Aussagekraft hinsichtlich der Knochenmarkaktivität und Differenzierung der zugrundeliegenden Pathomechanismen besitzen, ist in der Humanmedizin mittlerweile hinreichend bekannt (Kienast und Schmitz, 1990; Briggs et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die am Sysmex gemessene immature platelet fraction (IPF) bei einem Cut-Off von 7,7% bei der Diagnose der ITP eine Sensitivität von 86,8% und eine Spezifität 92,6% aufweist (Abe et al., 2006).

Retikulierte Thrombozyten wurden zum ersten Mal von Ingram und Coopersmith im Blut von Hunden nach akutem Blutverlust entdeckt (Ingram und Coopersmith, 1969). Darauf folgend wurden sie häufig bei dieser Tierart durchflusszytometrisch nachgewiesen (Kienast und Schmitz, 1990; Dale et al., 1996; Hanahachi et al., 2001; Michimoto et al., 2004)

Dass rPLTs auch beim Hund Aussagekraft bzgl. der Regeneration besitzen, ist anzunehmen. In einer Studie konnten signifikant erhöhte relative rPLT-Werte von 62,8% bei einem Hund mit Evans-Syndrom gemessen werden. Als die Thrombozytenzahl zunahm, sank der rPLT-

Anteil auf 35% und nahm Werte im Referenzbereich an, nachdem auch die Thrombozyten in deren Referenzbereich anstiegen (Michimoto et al., 2004).

Ein ähnliches Ergebnis wie es Michimoto et al. (2004) beschrieben, liegt auch bei einem an Evans-Syndrom erkrankten Hund in vorliegender Arbeit vor.

Der Hund wurde mit niedrigen Thrombozytenzahlen und rPLTs über dem Referenzbereich von 9,36% vorgestellt und stieg im Verlauf bis auf 26,47% an. Erst als die Thrombozytenzahl deutlich stieg, reduzierte sich der rPLT-Prozentwert. Da aufgrund der Retrospektivität bei diesem Hund nur vier Messungen an Tag 0, 1, 4 und 6 vorlagen, kann der weitere mögliche Verlauf bis in den Referenzbereich der rPLTs nicht beurteilt werden. Der deutliche Trend läßt jedoch darauf schließen, dass die Thrombozytenzahl in den physiologischen Bereich ansteigt.

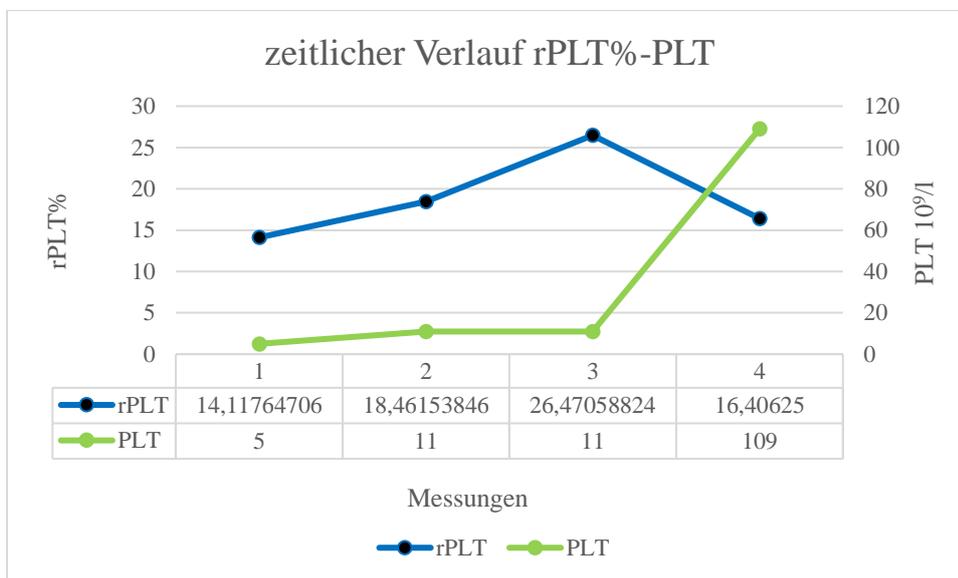


Abb. 32: Verlauf (Tag 0, 1, 4 und 6 bzw. 1.-4. Messung) der rPLT%- und PLT-Werte bei einem Hund mit Evans-Syndrom
rPLT: reticulated platelet
PLT:platelet

Andere Autoren konnten neben einem ebenfalls inversen Verhältnis zwischen Thrombozytenzahl und Anzahl rPLTs feststellen, dass einem Anstieg der rPLT-Prozentzahl eine Steigerung der Thrombozytenzahl binnen maximal 48 Stunden folgte (Pankraz et al., 2009). Auch ein derartiges Ereignis kann in der eigenen Arbeit nachvollzogen werden. Im folgenden Diagramm ist der zeitliche Verlauf der rPLT% und PLTs bei einem Hund mit ITP dargestellt. Dieser Hund zeigt die beschriebenen gegensätzlichen Verläufe, die Thrombozytenzahl steigt jeweils nach zwei Tagen um mehr als 40% an. Es liegen von Anfang an rPLT-Werte über dem errechneten Cut-Off nach Oellers von 9,36% bzw. über dem anhand biologischer Regeneration ermittelten Cut-Off von 7,36% vor.

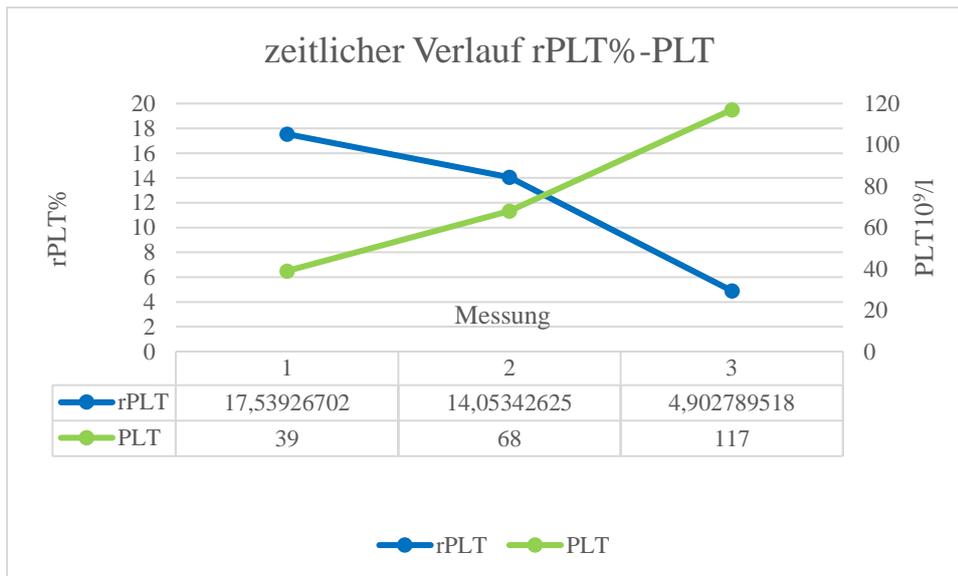


Abb. 33: Hund mit immunmediierter Thrombozytopenie, 3 Messungen an Tag 0, 2 und 4; während die rPLTs sinken, steigt die Thrombozytenzahl kontinuierlich an.

rPLT: reticulated platelet

PLT:platelet

In vorliegender Arbeit werden rPLT%-Werte anhand des biologischen Anstiegs der Thrombozytenzahl bei 178 thrombozytopenischen Hunden überprüft und konnten mit einer AUC von 0,75 als Marker der Regeneration bestätigt werden. Der Cut-Off mit der höchsten Sensitivität und Spezifität von 65,9% bzw. 68,4% liegt bei 7,36%. Der Cut-Off von Oellers mit einem rPLT%-Wert von 9,36 weist eine geringere Sensitivität von 58,0%, dafür aber eine etwas höhere Spezifität von 75,8% auf. Insgesamt sind diese Trefferquoten jedoch als mäßig zu bezeichnen. Es ist anzunehmen, dass die Gründe für die relativ hohe Falsch-Positiv- bzw. Falsch-Negativ-Rate in der Pathophysiologie der Erkrankungen sowie der Methode der rPLT-Analyse und -Auswertung liegen.

Zum einen besteht also die Möglichkeit, dass ein erhöhter rPLT%-Wert auftritt, ohne darauffolgenden Anstieg der Thrombozytenzahl. Eine Erklärung hierfür ist, dass bei nur zwei oder drei Messungen an aufeinanderfolgenden Tagen die Thrombozytenzahl unter Umständen noch nicht angestiegen ist. Es konnte festgestellt werden, dass sich die Thrombozytenzahl erst 24-48 Stunden nach einem rPLT%-Anstieg erhöhte (Pankraz et al, 2009). In einer weiteren Studie erfolgte die Thrombozytenerholung nach Hochdosisschemotherapie, definiert als $>20 \times 10^9/l$ Thrombozyten, im Durchschnitt 11 Tage (range 10-13 Tage) nach PBSC (Peripheral blood stem cell)-Infusion (Tag 0). Eine regelmäßig auftretende Knochenmarkruhe von 8-9 Tagen war zu erwarten. Die Prozentzahl an rPLTs erhöhte sich im Durchschnitt am Tag 8 mit einer Spannweite von 5-9 Tagen (Consolini et al., 2001). Somit stieg hier die Thrombozytenzahl durchschnittlich erst 72 Stunden nach der rPLT-Erhöhung an. Eine weitere

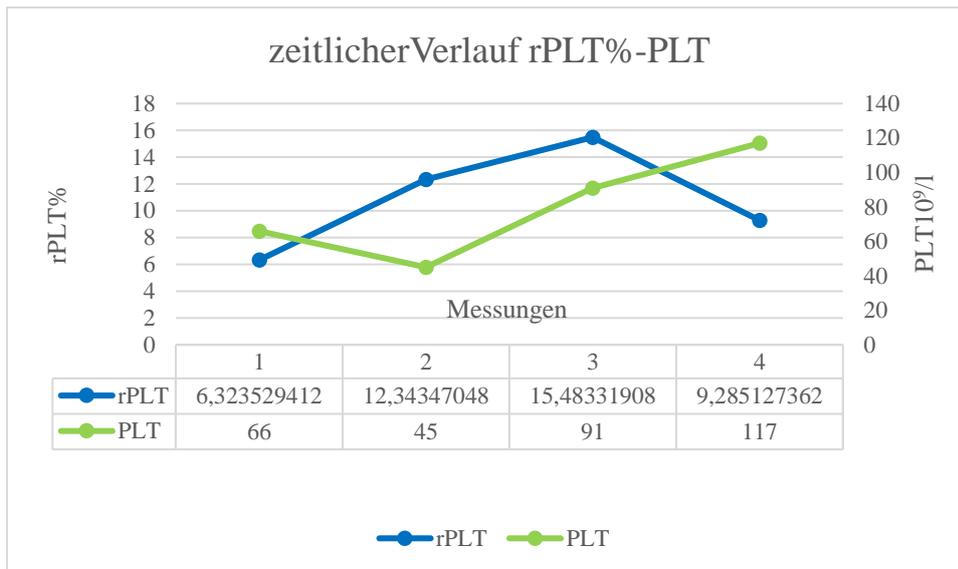
mögliche Ursache für das Ausbleiben des erwarteten Thrombozytenanstiegs ist, dass z. B. bei immunmediierter Thrombozytopenie trotz regenerativer Situation im Knochenmark die Beladung der Platelets durch Antikörper bzw. deren Elimination aus der Zirkulation durch das Monozyten-Makrophagensystem weiter stattfindet oder noch an Intensität zunimmt. Folglich kommt es zu keinem Anstieg der Thrombozytenzahl im beobachteten Zeitraum. Ebenso kann eine Komplikation, z. B. in Form einer disseminierten intravasalen Gerinnung oder einer Blutung hinzukommen, die einem Thrombozytenanstieg trotz gesteigerter Nachproduktion an retikulierten Thrombozyten entgegensteht. Berücksichtigt man, dass bei den rPLTs auch lagerungsbedingte Veränderungen existieren, so können auch präanalytische Gründe für falsch-positive Ergebnisse verantwortlich sein. So wurde in einer Studie anhand von gesunden Individuen gezeigt, dass die IPF% 3 Stunden nach Blutentnahme bei der Messung stabil blieb, dann jedoch bis zu einer signifikanten Erhöhung nach zwei Tagen Lagerungszeit stetig anstieg (Nomura et al., 2010). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch andere Autoren. Sie stellten fest, dass sich IPF%-Werte bei Probenlagerung signifikant ($p < 0.001$) von unmittelbar nach Entnahme analysierten Werten unterschieden (Osei-Bimpong, 2009). Ruisi et al. (2010) konnten eine Abnahme der Stabilität nachweisen. Hierbei traten Abweichungen nach unten um etwa 10% zwischen unmittelbar nach Abnahme und nach vierundzwanzigstündiger Aufbewahrung analysierten Proben auf, wenn der Ausgangswert für die IPF% $> 40\%$ betrug. Da es sich in dieser Arbeit um eine retrospektive Studie handelt, kann nur ausgesagt werden, dass die Analysen innerhalb von maximal sechs Stunden nach Blutentnahme erfolgten. Wie stark sich dieser mögliche Zeiteffekt auf die IPF beim Hund im Einzelfall auswirkt, muss in weiteren Studien geklärt werden.

Eine weitere Möglichkeit für falsch positive Resultate besteht möglicherweise in einer fehlerhaften Analyse der rPLT-Zahl. Im Gegensatz zu den meisten durchflusszytometrischen Analysen, in denen die Thrombozyten neben der Anfärbung noch spezifisch mit CD61-Antikörpern markiert werden, erfolgt die Detektion der rPLTs am ADVIA 2120 nur über Zellvolumen und Absorption. Ivory et al. konnten zeigen, dass sich die Zellpopulationen Retikulozyten und Thrombozyten in den Scattergrammen bei Durchflusszytometrie, in der nur mit Thiazolorange-Anfärbung gearbeitet wird - was methodisch mit der ADVIA 2120 Analyse vergleichbar ist - überschneiden können (Ivory et al., 2007). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass kleine bzw. schwach hämoglobinierte Retikulozyten zur Population der retikulierten Thrombozyten gezählt werden könnten. Somit kann es durchaus vorkommen, dass eine falsch hohe rPLT-Prozentzahl auftritt, woraufhin kein Anstieg der Thrombozytenzahl zu erwarten ist. Dieser Fall tritt auch dann ein, wenn ein zu großes Gate

zur rPLT-Analyse gewählt wird. Der ADVIA 2120 gibt den Anteil retikulierter Thrombozyten nicht automatisch an. Oellers konnte die rPLT-Messung durch das Anlegen eines manuellen Gates ermöglichen. Zunächst wurde dabei über ein erstes gesetztes Gate die gesamte Thrombozytenpopulation registriert und im zweiten Schritt, über ein weiteres Gate, die Population der retikulierten Thrombozyten. Dieses manuelle Gate erwies sich bei der Betrachtung der Scattergramme der großen Zahl aller Proben in der Arbeit von Oellers als sehr zuverlässig bzgl. der Trennung der Thrombozyten von anderen Zellpopulationen (Oellers, 2015). Trotzdem ist zu erwähnen, dass es sich dabei um ein festes Gate handelt und die Gefahr von Interferenzen bei manuellen Gates höher ist. Um diese Fehlerquelle zu minimieren, bedürfte es eines algorithmischen Gates, das sich automatisch an der Population der Erythrozyten und Thrombozyten orientiert. Das heisst, das Gate für die retikulierten Thrombozyten würde automatisch entsprechend der Zellpopulationen entlang der Y-Achse angepasst werden.

Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass eine geringe Prozentzahl an rPLTs auftritt, aber dennoch ein Anstieg der Thrombozytenzahl folgt. Auch für diese Konstellation kommen verschiedene Gründe in Frage. Zum einen ist die Methode der Auswertung in vorliegender Arbeit zu berücksichtigen. Grundsätzlich werden nur die rPLTs zum Zeitpunkt 0 betrachtet. Der Anstieg wird über einen Zeitraum definiert, somit erfolgt ein Gegenüberstellen eines Zeitpunkts gegen einen Zeitraum. Es ist durchaus möglich, dass zu einem Zeitpunkt am Tag 0 (erste Messung im Retikulozytenkanal) die rPLT-Prozentzahl noch nicht hoch ist bzw. noch nicht über dem erforderlichen Cut-Off liegt, während die Thrombozytenzahl am Ende des Messzeitraums (max. 28 Tage, min. 2 Tage) um >25% erhöht ist. Es ist wahrscheinlich, dass bei einigen Tieren die rPLTs erst zu darauffolgenden Messzeitpunkten ansteigen, die durch diese Methode der rPLT-Betrachtung ausschließlich am ersten Messtag nicht mehr in die Statistik eingehen. Laut Ingram und Coopersmith zeigte sich die größte Anzahl an retikulierten Thrombozyten erst 5-10 Tage nach akutem Blutverlust (Ingram und Coopersmith, 1969). Demnach ist nach der Blutung die Thrombozytopenie nachweisbar, die retikulierten Thrombozyten aber erst zu einem späteren Zeitpunkt.

Zur Verdeutlichung ist ein Diagramm über den zeitlichen Verlauf der rPLT%- und der PLT-Werte dargestellt.



**Abb. 34: Verlauf (Tag 0, 3, 14 und 28) der rPLT% und PLT bei einem thrombozytopenischen Hund . Die rPLT-Prozentzahl am Tag 0 befindet sich mit 6,32% sowohl unter dem Cut-Off von Oellers als auch dem Cut-Off von 7,36% und zeigt somit den späteren Anstieg noch nicht an. Das Verhalten der rPLT% in den Tagen zwischen den Messungen ist unbekannt. An Tag 3, 14 und 28 befinden sich die rPLT über dem Cut-Off von 7,36% bzw. an Tag 3 und 14 auch über dem Cut-Off von 9,36%.
rPLT: reticulated platelet
PLT:platelets**

Dies ist auch aus der Retikulozytendiagnostik bekannt. Fällt ein Hund im Blutbild mit einer Anämie auf und hat keine Erhöhung der Retikulozyten über den Referenzbereich bzw. in einen als regenerativ zu bewertenden Bereich, so muss berücksichtigt werden, dass dieser Anstieg noch folgen könnte und es sich um ein Frühstadium der Anämie handelt.

Grundsätzlich muss bedacht werden, dass die Messung zum Zeitpunkt 0 jeden beliebigen Zeitpunkt des Krankheitsverlaufs anzeigen kann. So ist es oftmals der Fall, dass nach Feststellung der Thrombozytopenie therapeutische Massnahmen eingeleitet wurden. Spricht das Tier darauf an, so steigt die rPLT- bzw. Thrombozytenzahl erst danach an.

Weiterhin scheint der Anstieg des rPLT%-Wertes nach Art der immunvermittelten Thrombozytopenie (primär/sekundär) im Zusammenhang mit dem IgG-Peak zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufzutreten. Im Gegensatz zu den meisten Hunden mit primärer ITP hatten Hunde, die experimentell mit *Babesia gibsoni* infiziert wurden, zum Zeitpunkt des Platelet surface-associated Immunglobuline G (PSAIG)-Peaks keinen erhöhten Prozentsatz an retikulierten Platelets. Die Erhöhung trat in diesem Fall zeitverzögert nach einer Woche auf. Wilkerson gibt hierbei jedoch keine Zeitpunkte für das Auftreten der PSAIG-Peaks an (Wilkerson et al., 2001).

Desweiteren muss berücksichtigt werden, dass die Mehrfachmessungen je nachdem, wieviele Analysen im Retikulozytenkanal vorliegen, unter Umständen nur einen kleinen Ausschnitt der Erkrankung darstellen.

Natürlich kann auch in falsch-negativen Fällen die Methode der Analyse der retikulierten Thrombozyten eine Rolle spielen. Es ist möglich, dass diese juvenilen Zellen entweder nicht detektiert werden, wenn sie fälschlicherweise als kleine Retikulozyten gezählt werden, oder ihre Prozentzahl geringer ausfällt, wenn fälschlicherweise Mikroerythrozyten als Thrombozyten gezählt werden.

Das heißt, die Beurteilung der rPLTs hängt, wie oben bereits erwähnt, vom gewählten Gate bei der Analyse ab (Pankraz et al., 2009; Gelain et al., 2010a; Oellers, 2015).

Darüberhinaus handelt es sich bei den Hunden in dieser Arbeit nicht selten um Erkrankungen, die unter Umständen mit Fragmentation der Erythrozyten einhergehen können, wie z. B. beim Evans-Syndrom bzw. der Kombination aus IMHA und sek. ITP. Fragmentozyten könnten aufgrund ihrer geringeren Größe durchaus zur Population der Thrombozyten gezählt werden, was natürlich den prozentualen Anteil an rPLTs verringert. Gleichermäßen ist es möglich, dass sogenannte Ghosts, dabei handelt es sich um Erythrozyten ohne Hämoglobin, fälschlicherweise als Thrombozyten gemessen werden. Weitere Studien dazu sind wünschenswert.

Ein dritter Grund für niedrige rPLT%-Werte trotz darauffolgenden Anstiegs der Thrombozytenzahl könnte zudem in der Eigenschaft der rPLTs begründet liegen.

Diese gelten als hämostatisch aktiver und somit könnte ein relativ zu den adulten Thrombozyten schnellerer Verbrauch der jungen rPLTs vorliegen (McBane et al., 2014). Werden die beiden Populationen nicht mit gleicher Geschwindigkeit aus der Zirkulation entzogen, so spiegelt sich dies trotz erhöhter Knochenmarkaktivität in einem reduzierten rPLT-Prozentwert wider.

5.2.2 RPLT-ABSOLUTZAHL

In der Humanmedizin finden sich Beschreibungen zu den rPLT-Prozentwerten sowie – Absolutwerten.

Es muss bei einem Plättchenmangel aufgrund erhöhter peripherer Zerstörung bedacht werden, dass die Schwere der bei Messung noch vorhandenen Zerstörung, Auswirkungen auf die Absolutzahl rPLTs haben kann.

Im Gegensatz zur Prozentzahl rPLT, also dem Anteil retikulierter Thrombozyten an der gesamten Thrombozytenpopulation, ist die Absolutzahl in Fällen, in denen gesteigerter Verbrauch bzw. gesteigerte Zerstörung vorliegt, häufig nicht erhöht (Barlage und Schmitz; 2007).

Einige Autoren sehen das Problem der Verwendung der Absolutzahl besonders bei hochgradiger Thrombozytopenie, da relative Werte sehr hoch sein können, während die Absolutwerte immer noch sehr niedrig sind (Briggs et al., 2006).

Auch in vorliegender Arbeit erwies sich die rPLT-Absolutzahl als weniger geeignet für die Beurteilung der Thrombopoese beim thrombozytopenischen Hund. Ein Großteil der Fälle bewegte sich innerhalb des von Oellers am ADVIA ermittelten Referenzbereiches für retikulierte Thrombozyten von $1,3 \times 10^9/l$ bis $10,9 \times 10^9/l$ (Oellers, 2015). Zahlreiche Tiere wiesen eine mittelgradige bis hochgradige Thrombozytopenie auf.

Das Knochenmark kann die Thrombopoese maximal um das 3-5-fache steigern und so käme es zu einem Abfall der Absolutzahl an rPLTs bei Werten unter $20 \times 10^9/l$ (Barlage und Schmitz; 2007). Auch in einer Studie von Wilkerson et al. (2001) waren aufgrund der grundsätzlich sehr niedrigen Zahl an Thrombozyten, die absoluten Zahlen an retikulierten Thrombozyten häufig im Referenzbereich. Erhöhte retikulierte Thrombozytenzahlen bei thrombozytopenischen Hunden fanden sich erst bei Thrombozytenwerten zwischen $50 \times 10^9/l$ und $100 \times 10^9/l$. Die Autoren führten dazu aus, dass gerade bei sehr niedrigen Plättchenzahlen unter $20 \times 10^9/l$ eine starke und rasche Zerstörung bzw. Entfernung aus der Zirkulation der jungen wie der reifen Thrombozyten vorliegen muss. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch andere Arbeitsgruppen. Die absoluten Zahlen an rPLTs stiegen erst im Thrombozytenzahlbereich zwischen $60 \times 10^9/l$ bis $100 \times 10^9/l$, bei niedrigeren Plättchenzahlen befand sich die rPLT-Absolutzahl im Referenzbereich oder darunter (Ault et al., 1992).

Zusammenfassend ist zu den retikulierten Thrombozyten in der Tiermedizin zu sagen, dass sie Potenzial als Marker der Regeneration besitzen. Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wird jedoch deutlich, dass, vermutlich angesichts von Gründen, die die Krankheit des Hundes und die Analyse, Auswertung und letztlich auch die Eigenschaften der rPLTs betreffen, nicht in allen Fällen eine sichere Aussage über Regeneration anhand der ermittelten rPLT%-Cut-Offs möglich ist. Eine standardisierte Analyse in Form automatischer rPLT-Detektion mit minimierter Interferenz am ADVIA 2120, wie bereits in der Humanmedizin an der Sysmex XN-Serie mit eigens dafür entwickeltem Messkanal realisiert (Hoffmann, 2014), wäre besonders im Hinblick auf weitere Studien wünschenswert.

5.3 MPV ALS MARKER DER THROMBOPOESE

Komplizierter als die Beziehung zwischen retikulierten Thrombozyten und gesteigerter Thrombopoese gestaltet sich die Frage nach dem Zusammenhang zwischen erhöhter Thrombopoese im Sinne einer Regeneration und dem mittleren Thrombozytenvolumen. Dies konnte bis heute auch in der Humanmedizin noch nicht zufriedenstellend geklärt werden. Hoffmann (2014) kommt zu dem Schluss, dass retikulierte Thrombozyten nicht zwingend groß sein müssen. Derselben Meinung sind auch andere Autoren. Für sie stellt die Tatsache, dass eine signifikant negative Korrelation zwischen rPLTs und MPV bei normalen Thrombozytenzahlen gezeigt werden konnte, klar, dass rPLTs auch klein sein können (Dusse und Freitas, 2015). Die Polyploidie des Megakaryozyten korreliert mit der Anzahl an Thrombozyten, die er später produzieren wird (Boudreaux, 2010). Bessmann stellte in seiner Studie fest, dass die mittlere Ploidität der Megakaryozyten direkt und linear mit dem MPV korreliert. Er schlussfolgerte, dass Knochenmark mit stark ploiden Megakaryozyten auch Thrombozyten produziert, die sowohl größer als auch heterogener sind (Bessman, 1984).

Dieser Zusammenhang konnte von anderen nicht bestätigt werden. So wurde im Mausmodell festgestellt, dass die Effekte einer experimentellen Thrombozytopenie auf das MPV und die Megakaryozytenploidität getrennte Ereignisse darstellen. Zum einen trat in der Studie bei nur geringgradiger Thrombozytopenie keine Megakaryozytenploidität auf, obwohl sich das MPV signifikant erhöhte, zum anderen begann nach der Induktion einer akuten, schweren Thrombozytopenie die MPV-Erhöhung schon nach acht Stunden, wohingegen der Shift in der Ploidieverteilung erst nach 40 Stunden einsetzte (Corash et al., 1987). Also scheint von der Megakaryozytenploidität als Hinweis auf die Produktion von jungen Thrombozyten nicht automatisch ein Rückschluss auf die Größe von neu generierten Thrombozyten gezogen werden zu können.

Dagegen gibt es Autoren, die davon ausgehen, dass ein erhöhtes MPV aufgrund von größeren, jungen PLTs bei regenerativer Thrombozytopenie auftritt. Sie sehen es als ein Charakteristikum der primären ITP (Schwartz et al., 2014). Verschiedene Autoren wie z. B. Dircks et al. und Sullivan et al. erzielten unterschiedliche Resultate. So konnten Erstere bei keinem der Hunde mit Verdacht auf primäre immunvermittelte Thrombozytopenie (pITP) ein erhöhtes MPV feststellen, wohingegen aber bei allen vorhandenen Knochenmarkuntersuchungen genau dieser Hunde eine erhöhte Megakaryopoese festgestellt werden konnte (Dircks et al., 2009).

Letztere dagegen betrachteten ebenfalls das MPV im Zusammenhang mit den Ergebnissen von Knochenmarkanalysen und für sie spiegelt ein erhöhtes MPV die Knochenmarkaktivität wider (Sullivan et al., 1995).

Der in dieser Studie am ADVIA 2120 vorgenommene Vergleich der Thrombozytenindizes in den nach Cut-Off Oellers eingeteilten Gruppen zeigt für fast alle Indizes signifikante ($p < 0,0001$) Unterschiede. Für die Parameter PLT, PCT, MPC zeigen sich signifikant niedrigere Werte in der „regenerativen“ Gruppe, die mit rPLT-Anteilen $\geq 9,36\%$ gekennzeichnet ist. Für die Indizes MPV, PCDW, MPM und PMDW hingegen, lassen sich signifikant höhere Werte in der „regenerativen“ Gruppe nachweisen. Bei der PDW sowie den Large PLTs konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Trotz der Signifikanz ist anhand der Box-Whisker-Plots zu sehen, dass bei allen Indizes, ausgenommen das MPV, deutliche Überlappungen bestehen. Diesbezüglich muss der von Oellers ermittelte Cut-Off betrachtet werden. Von dem oberen Referenzwert auszugehen und den CV miteinzubeziehen führte zu einem hohen und somit „strengen“ Cut-Off-Wert. Es muss berücksichtigt werden, dass auch Patienten mit einem rPLT-Wert von weniger als 9,36% durchaus regenerativ sein können. Dieser rechnerisch ermittelte Grenzwert wurde in vorliegender Arbeit klinisch überprüft. Es stellte sich heraus, dass ein Cut-Off von 7,36% eine gleichzeitig höhere Sensitivität und Spezifität zeigt, der Cut-Off Oellers jedoch eine wünschenswert höhere Spezifität besitzt.

Betrachtet man die Korrelation der rPLT%- mit den MPV-Werten in vorliegender Arbeit, so handelt es sich um eine mäßige Korrelation mit einem Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten von 0,60. Es ist in der Graphik deutlich zu sehen, dass sich eine Vielzahl von Messungen auch in der nach Cut-Off Oellers eingeteilten „regenerativen“ Gruppe im Referenzbereich des MPVs befindet. Der Referenzbereich des MPVs wurde von Oellers anhand von 193 gesunden Hunden am ADVIA 120/2120 ermittelt. Das untere Referenzlimit beträgt 8,9fl und das obere 18,4fl (Oellers, 2015). Dennoch korrelieren die Parameter im Gegensatz zur Arbeit von Oellers.

Die von Oellers erstellte Korrelation anhand der Gesamtzahl an Hunden ($n=362$) ergab mit einem Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten von 0,25, dass es sich um zwei unabhängige Parameter handelt. Demnach scheint das MPV nicht die retikulierten Platelets als ausschließlich größere Thrombozyten widerzuspiegeln. Oellers nimmt an, dass die Thrombozytengröße keine Aussage über die Knochenmarkaktivität und die Ursache einer Thrombozytopenie zulässt (Oellers, 2015). Hierbei muss grundsätzlich bedacht werden, dass es sich bei dem gemessenen Parameter um das durchschnittliche Thrombozytenvolumen

handelt. Evtl. sollte eine differenziertere Betrachtung der Thrombozytengröße des einzelnen Thrombozyten stattfinden. Bedenkt man, dass das am ADVIA 120/2120 ermittelte Thrombozytenvolumen einen weiten Referenzbereich von 8,9fl-18,4fl aufweist, so läßt sich mathematisch nachvollziehen, dass auch ein Prozentsatz von z. B. 10% retikulierter Thrombozyten über dem Referenzbereich, beispielsweise mit 23fl, das MPV nicht wesentlich erhöht, wenn der restliche Anteil der Thrombozyten im Referenzbereich liegt. Evtl. müsste eine nach Höhe des rPLT-Prozentwertes gestaffelte Betrachtung des MPVs stattfinden, unter Umständen korrelieren diese Parameter in höheren Prozentbereichen über 30% weit mehr. Folgende Untersuchungen dazu sind wünschenswert.

In dieser Arbeit liegen bei einem nicht unerheblichen Teil an Messungen die rPLT-Werte in einem relativen hohen Bereich von 20,4 bis 44,0% (n=56). In der Annahme, dass die Kinetik der rPLTs bei Mensch und Hund ähnlich ist, handelt es sich um rPLT-Prozentzahlen im höheren bzw. hohen Bereich. So wies in einer Studie der rPLT-Prozentwert (IPF%) bei akuter ITP mit einer Plättchenzahl $<50 \times 10^9/l$ eine Spanne von 9,2-33,1% auf (Briggs et al., 2004). Bei weiteren Autoren verhielt es sich ähnlich bzgl. der Höchstwerte der IPF bei ITP mit 1,0-33,8% (Jung et al., 2010). Die rPLTs wurden in beiden Studien am Sysmex gemessen. Hoffmann stellte fest, dass sich am Sysmex gemessene Werte zwischen 50-60% später als Interferenzartefakt mit Leukozytenfragmenten herausstellten (Hoffmann, 2014). Bei den Hunden in der Studie von Oellers handelte es sich nun, wie bereits erwähnt, um gesunde Hunde und Hunde mit verschiedenen Erkrankungen, die als Patienten am Fachbereich Veterinärmedizin der JLU vorgestellt wurden (Oellers, 2015). Daher ist davon auszugehen, dass deutlich weniger rPLT%-Zahlen in diesem Bereich vorhanden waren. Geht man also von einem größeren Volumen der retikulierten Thrombozyten aus, so haben rPLT-Prozentzahlen in den hohen Bereichen, wie sie zum Teil in dieser Arbeit vorliegen, evtl. größere Auswirkungen auf das MPV. Dies könnte einen möglichen Grund für die abweichenden Ergebnisse in dieser Arbeit zu dem von Oellers ermittelten Korrelationskoeffizienten darstellen.

Hinsichtlich der mäßigen Korrelation muss aber auch in Betracht gezogen werden, dass das MPV ausser durch das Vorhandensein junger Thrombozyten bei Thrombozytopenie auch im Rahmen anderer Erkrankungen bzw. Umstände erhöht sein kann. So existiert eine vererbte Makrothrombozytose. Beim Cavalier King Charles Spaniel mit β 1-Tubulin-Defekt finden sich deutlich größere Thrombozyten in der Zirkulation. Entsprechend weisen diese Tiere auch ein erhöhtes MPV auf (Davis et al., 2008). Auch beim Norfolk Terrier kommt eine vererbte Form der Makrothrombozytose vor.

Diese großen Thrombozyten weisen ebenfalls, wie die retikulierten Thrombozyten, einen erhöhten RNA-Gehalt auf (Gelain et al., 2010a), was die Unterscheidbarkeit von den rPLTs erschwert. Auch bei inflammatorischen Entzündungen kann es u.a. zu einer MPV-Erhöhung kommen. Moritz et al. (2005) stellten signifikante MPV-Zunahmen bis zu 29,3fl bei septischen sowie nichtseptischen Entzündungen fest. Die Autoren halten es für wahrscheinlich, dass es sich dabei um große Thrombozyten aufgrund einer gesteigerten Thrombopoese handelt. Allerdings waren nur 6 von 20 Hunden zum Zeitpunkt der Messung thrombozytopenisch. Da es sich in dieser Arbeit um Patienten der Klinik für Kleintiere der JLU handelte, also ausschließlich um kranke Tiere, war auch bei den Erkrankungen der Hunde in den eigenen Daten häufig ein Entzündungsprozess beteiligt oder zugrundeliegend. Eine MPV-Erhöhung anhand Inflammation ist also nicht ausgeschlossen.

Ebensowenig können die Auswirkungen auf das MPV von unter Umständen gesteigert ablaufender Apoptose abgeschätzt werden. So zeigte durch physikalischen Stress künstlich erzeugte Apoptose morphologische Veränderungen wie z. B. eine Schrumpfung der Zelle und Verbreitung von thrombozytären MPs. Die Autoren geben an, dass die Abgabe von MPs durch die Thrombozyten verantwortlich für die Abnahme des Zellvolumens ist (Gyulxhandanyan et al., 2012).

Wilkerson erwähnt die Entstehung von thrombozytären MPs bei Hunden mit ITP durch IgG-Fab/Fc-Bindung an die Thrombozytenoberfläche (Wilkerson et al., 2001). Diese MPs wurden u.a. bei über der Hälfte der Hunde mit primärer, sowie allen Hunden mit sekundärer ITP gefunden. Die Bedeutung dieser durch Membranknospung aktivierter Thrombozyten entstehenden, prokoagulatorisch aktiven Partikel beim Hund ist noch unklar (Wilkerson et al., 2001; Wilkerson und Shuman, 2001).

In einer Studie von Northern und Tvedten (1992) ist die ITP sogar durch ein niedriges mittleres Thrombozytenvolumen gekennzeichnet. So ließen sich alle Fälle von Mikrothrombozytopenie, ausser einem, der ITP zuordnen. Auch können bei der ITP Mikrothrombozyten durch die Fragmentierung von Thrombozyten entstehen und einen möglichen Laborbefund darstellen (Kohn, 2012). Möglicherweise zeigt sich die Kombination aus Mikrothrombozyten durch Fragmentation und großen retikulierten Thrombozyten bei folgender Regeneration auch innerhalb der Studie von Northern und Tvedten (1992). Bei 17 von 31 Hunden mit ITP konnte eine Mikrothrombozytose zu Beginn bei Krankheitsausbruch festgestellt werden, ebenso aber auch das Auftreten von großen Thrombozyten bei 18 von 31 Hunden, wohl als Marker gesteigerter Thrombopoese. In vorliegender Arbeit lag der Thrombozytopenie bei 67 Messungen (22 Tiere) eine ITP zugrunde. (Definiert über:

Thrombozytenzahlen $<50 \times 10^9/l$, typische (Blutungs-) Symptome, eingeschlossen Schwäche und Blässe, ein Ansprechen auf Immunsuppressiva innerhalb von max. 15 Tagen (Kohn, 2012) mit einem Anstieg der Thrombozytenzahl um $\geq 20 \times 10^9/l$ (Wang et al., 2002) als Anzeichen einer beginnenden Thrombozytenerholung). Somit stellt sich auch hier die Frage nach den Auswirkungen einer möglichen Mikropartikelbildung oder Thrombozytenfragmentation auf das MPV. In einer weiteren Studie veränderte sich das MPV bei Aktivierung. Die Autoren konnten zeigen, dass sich das mittlere Thrombozytenvolumen ex vivo innerhalb von Minuten sowohl erhöhen als auch erniedrigen kann. Das Volumen der Thrombozyten nahm als Aktivierungsmerkmal bei Kollagen- und Kälteexposition zu und bei Wärmeeinwirkung von 37°C ab, was vermutlich als ein Zustand erhöhter Widerstandsfähigkeit zu deuten ist. Für die Autoren ist somit ersichtlich, dass es sich beim MPV nicht nur um eine Reflektion des Thrombozytenalters handelt (Park et al., 2002).

Für Bancroft et al. (2000) spiegelt das MPV entweder eine veränderte Stimulation oder die Thrombopoese wider. So wurden die Veränderungen des MPVs bei Kontakt mit Antikoagulanzen untersucht. Durch den Einfluss von EDTA wies das MPV signifikante Erhöhungen nach zwei Stunden (1.48%, $p=0.005$) und nochmals nach einer weiteren Stunde (5.02%, $p=0.005$) auf. Somit scheint die Zeit, die von der Blutabnahme bis zur Analyse vergeht, eine Rolle zu spielen und kann zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Auch Threutte et al. wiesen bei EDTA-Verwendung eine MPV-Erhöhung um bis zu 30% nach (Threutte et al., 1984). Eine weitere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls eine MPV-Erhöhung nach 48 Std. in geringerem Ausmaß von 8,8fl auf 10,3fl feststellen (Vogelaar et al., 2002). Dastjerdi et al. (2006) stellten bei 61 Patienten, bei denen sowohl EDTA- als auch Citratblut am automatisierten Hämatologiegerät gemessen wurde fest, dass bei Messung innerhalb einer Stunde sowohl EDTA als auch Citrat als Gerinnungshemmer zur genauen MPV-Messung herangezogen werden kann. Wie schon bei möglicher lagerungsbedingter Erhöhung der IPF erläutert, kann auch hierzu aufgrund der Retrospektivität nur angegeben werden, dass die Blutproben innerhalb von sechs Stunden analysiert wurden.

Letztlich scheinen junge Thrombozyten schlicht nicht immer größer sein zu müssen.

Schwartz et al. konnte feststellen, dass auch Blutplättchenvorläufer von geringer Größe unter $4\mu\text{m}$ noch Thrombozyten hervorbringen können (Schwartz et al., 2010). Das heisst also, dass auch kleine Thrombozyten bei Regeneration vorhanden sein können.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Studie

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der retikulierten Platelets (rPLTs) und des mittleren Thrombozytenvolumens (MPV) des Hundes hinsichtlich der Aussagekraft als Marker der Thrombopoese. Die Beurteilung erfolgte anhand eines ermittelten biologischen Thrombozytenanstiegs bei thrombozytopenischen Hunden. In diesem Rahmen wurde der 2015 von Oellers für das Hämatologiesystem ADVIA 2120 publizierte, rechnerisch ermittelte Cut-Off für Regeneration überprüft und die Thrombozytenzahl sowie -indizes im Hinblick auf diesen Grenzwert betrachtet.

Material und Methoden

Es wurden mittels ADVIA 2120™ (Siemens) gemessene 474 Rohdaten thrombozytopenischer Hundebloodproben (178 Hunde) retrospektiv analysiert. Evaluiert wurden neben den Thrombozytenparametern PLT, MPV, PDW, PCT, MPC, PCDW, MPM, PMDW, LPLT und PLT Clumps, die Prozentzahl (rPLT%) sowie die Absolutzahl (rPLT#) retikulierter Thrombozyten. Die Tiere wurden anhand ihres Anstiegs der Thrombozytenzahl in eine Gruppe mit und ohne biologischen Anstieg innerhalb eines definierten Zeitraums eingeteilt. Als biologische Regeneration wurde ein Anstieg der Thrombozytenzahl >25% vom Ausgangswert (Tag 0) im Vergleich zur letzten Kontrollmessung gewertet, wobei 25% dem erlaubten Gesamtfehler (allowable total error, TEa) der Thrombozytenmessung mittels ADVIA 2120 entspricht (Nabity et al., 2014).

Es wurden ROC-Kurven erstellt und die AUC für rPLT%, rPLT# sowie MPV ermittelt. Evaluiert wurden Sensitivität und Spezifität zur Erkennung einer (zukünftigen) Regeneration dieser Parameter. Der Cut-Off Oellers wurde in diesem Rahmen überprüft. Weiterhin wurden Cut-Offs für rPLT%, rPLT#, sowie MPV mit höchstmöglicher Spezifität erstellt.

Außerdem erfolgte mithilfe des Cut-Offs nach Oellers eine Klassifikation der Messungen als nichtregenerativ (rPLT <9,36%, n=276) bzw. regenerativ (rPLT ≥9,36%, n=198). Die PLT-Zahl und -Indizes in beiden Gruppen wurden verglichen. Die Korrelation zwischen MPV und rPLT% wurde ermittelt. Für den ADVIA 2120 erfolgte die Berechnung der Präzision für die Messung der retikulierten Thrombozyten sowie PLT-Zahl und -Indizes in drei verschiedenen niedrigen Thrombozytenzahlbereichen innerhalb der Serie.

Zur statistischen Auswertung dienten ROC-Analysen, der Gruppenvergleich erfolgte anhand des Mann Whitney U-Tests und die Korrelation wurde mithilfe des Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten ermittelt.

Ergebnisse

Die Variationskoeffizienten (CVs) der Thrombozytenzahl und -indizes MPV, PDW, MPC, PCDW, MPM, PMDW bei Messungen von annähernd $15 \times 10^9/l$ befanden sich in einem moderaten Bereich von 4,31 bis 11,29%, während für PCT hohe Werte von 26,41% ermittelt wurden. Die CVs bei Thrombozytenzahlen von ca. $50 \times 10^9/l$ und $70 \times 10^9/l$ ergaben für MPV, PDW, MPC, PCDW, MPM, PMDW und PCT ebenfalls moderate Werte zwischen 1,29% und 13,31%.

Bei allen drei experimentellen Thrombozytopenie-Ausprägungen zeigten sich die CVs für die retikulierten PLTs in hohen Bereichen. Die CVs für rPLT% lagen zwischen 27,04% und 40,57% und für rPLT# zwischen 30,35% und 40,88%, wobei die CVs für rPLT% und rPLT# bei Thrombozytenwerten von ca. $70 \times 10^9/l$ die niedrigsten Werte zeigten. In allen drei Thrombozytenzahlbereichen ($15-$, $50-$, $70 \times 10^9/l$) wiesen außerdem Large Platelets hohe CVs zwischen 17,49% und 35,92% auf.

Bei einer Gesamtzahl von 183 Fällen -3 Tiere wurden in großen Zeitintervallen jeweils einmal, sowie ein Tier zweimal neuvorgestellt, so dass sich bei einer Anzahl von 178 Tieren eine Fallzahl von 183 ergab- zeigten 88 von 183 Fällen (239/474 Messungen) im vorhandenen Messzeitraum einen Anstieg der Thrombozytenzahl von >25% von Tag 0 auf den letzten gemessenen Tag (Range: 2-28 Tage, 2-6 Messungen). 95 von 183 Fällen (235/474 Messungen) zeigten keine PLT%- Erhöhung auf >25% im vorhandenen Zeitraum. Die höchste Sensitivität und gleichzeitig Spezifität zeigte sich bei einem Cut-Off von $\geq 7,36\%$ rPLT% mit 65,9% Sensitivität und 68,4% Spezifität. Der Cut-Off von $\geq 9,36\%$ zeigt eine mäßige Sensitivität von 58,0%, bei jedoch höherer Spezifität von 75,8%. Erst bei einem Cut-Off von $\geq 20,06\%$ beträgt die Spezifität 96,8%. Insgesamt betrug die Fläche (AUC) unter der Receiver-Operating-Characteristic (ROC)-Kurve für die rPLT% Messung 0,75 bezüglich der Erkennung einer Regeneration. Die Aussagekraft bzgl. der Knochenmarkaktivität mithilfe der absoluten rPLT-Zahl wurde ebenfalls überprüft. Es zeigte sich, dass bei einem rPLT#-Wert von $\geq 8,60 \times 10^9/l$ eine Sensitivität und Spezifität von 23,5% bzw. 86,4% vorliegt. Erst bei einem Cut-Off von $20,18 \times 10^9/l$ kann eine Spezifität von 98,7% erreicht werden, wobei die Fläche unter der ROC-Kurve sehr gering war (AUC-ROC: 0,55).

Das MPV zeigt bei $\geq 16,7$ fl eine Sensitivität von 60,2% und eine Spezifität von 72,6% (AUC-ROC 0,66). Erst bei einem MPV von $\geq 23,5$ fl kann eine Spezifität von 98,9% erreicht werden.

Beim Vergleich der Thrombozytenindizes in den Gruppen „Regeneration“ und „Nicht-Regeneration“ und waren PLT, PCT und MPC signifikant niedriger in der „regenerativen“ Gruppe, MPV, PCDW, MPM, und PMDW dagegen signifikant höher (alle $p < 0.0001$). PDW und die Zahl der Large PLTs unterschieden sich nicht. Bis auf das MPV war die Überlappung beider Gruppen groß, die Korrelation rPLT%-MPV mit $r_s = 0.60$ jedoch mäßig. Das MPV lag in beiden Gruppen überwiegend in dem von Oellers ermittelten Referenzbereich (8,9 fl-18,4 fl (Oellers, 2015)).

Schlussfolgerung

Auch beim Hund besitzen rPLTs eine Aussagekraft bzgl. der Thrombopoese.

Der Cut-Off von $\geq 9,36\%$ rPLTs zeigt bei schlechterer Sensitivität eine wünschenswert hohe Spezifität und kann demnach herangezogen werden. Eine sichere Aussage über die Regeneration erlaubt jedoch erst ein Cut-Off von $\geq 20,06\%$. Insgesamt korreliert das MPV nur mäßig mit der rPLT-Prozentzahl bei mäßiger Sensitivität und Spezifität. Es kann zusätzlich orientierend herangezogen werden. Die Absolutzahl an rPLTs dagegen ist weniger als Marker der Thrombopoese geeignet.

Zwischen den Thrombozytenindizes PCT, MPC, PCDW, MPM und PMDW bestehen signifikante Unterschiede in den Gruppen „Regeneration“ und „Nicht-Regeneration“. Weitere Studien zur Aussagekraft dieser noch relativ unbekanntes Indizes bei Thrombozytopenie im Hinblick auf die Thrombopoeseaktivität oder auch auf zugrundeliegende Pathomechanismen sind vielversprechend und wünschenswert.

Der Variationskoeffizient der rPLTs am ADVIA 2120 bei niedrigen Thrombozytenzahlen steht nun zur Verfügung.

7 SUMMARY

Objective

The aim of the present study was to investigate the reticulated platelets (rPLT) and mean platelet volume (MPV) in terms of their significance as markers of regeneration and thrombopoietic activity, respectively. The classification of regeneration was based on the “biological response”, i.e. the rise of platelet numbers in thrombocytopenic dogs. In this context, the cut-off for regeneration published previously for the hematology System ADVIA 2120 by Oellers 2015, has been re-evaluated as well as the diagnostic use of platelet indices.

Materials and Methods

474 raw data of blood samples from thrombocytopenic dogs (178 dogs) were analyzed retrospectively using ADVIA 2120™ (Siemens). The percentage (rPLT%) and the absolute number of rPLTs (rPLT#) were evaluated in addition to platelet count (PLT) and platelet indices MPV, PDW, PCT, MPC, PCDW, MPM, PMDW as well as large platelets. The animals were divided into groups with and without regeneration of platelets based on the biological response, i.e. the increase in platelet count within a defined period. An increase in platelet count >25% from baseline (day 0) as compared to the last control measure was considered as biological response, whereby 25% is consistent with the allowable total error (TEa) of the measurement of platelets by the ADVIA 2120 (Nabity et al. 2014). Sensitivity and specificity were evaluated for the detection of a (future) regeneration of platelets for rPLT%, rPLT#, MPV and the cut-off on day 0. Cut-off values indicative of platelet regeneration were established for the rPLT%, rPLT# and MPV values on day 0.

Furthermore, using the cut-off after Oellers, measurements were classified as “non-regenerative” (rPLT <9.36%, n= 276) or “regenerative” (rPLT ≥9.36%, n= 198). In both groups, PLT-indices were compared. The correlation between MPV and rPLT% were determined. Moreover, the intra-assay precision of rPLT measurement for samples with a low platelet count was determined for ADVIA 2120.

For statistical analysis, receiver operating characteristic (ROC) analysis were used. The comparison between groups was made by using the Mann Whitney U-test, and the correlation between measurements was calculated using the Spearman correlation coefficient.

Results

In a sample with 15×10^9 plts/l, the coefficient of variation (CV) was ranged between 4.30% and 11.29% for the platelet count and platelet indices MPV, PDW, MPC, PCDW, MPM, PMDW, while it was higher for PCT with 26.41%. The CV in platelet counts of 50×10^9 /l and 70×10^9 /l showed for MPV, PDW, MPC, PCDW, MPM, PMDW and PCT ranges between 1.29% and 13.31%. In all grades of experimental thrombocytopenia, the CV was high for rPLT% ranging between 27.04% and 40.57% and for rPLT# respectively ranging between 30.35% and 40.88%. The lowest values for the CV for rPLT% and rPLT# were obtained for the sample with 70×10^9 plts/l. In all grades of thrombocytopenia, (15 -, 50 -, 70×10^9 plts/l) the CV for large platelets was also high ranging between 17.49% and 35.92%.

With a total number of 183 cases -3 dogs were newly presented in large time intervals each once, as well as one animal twice and were considered as new cases, therefore 183 cases at a number of 178 animals- 88 (239/474 measurements) showed an increase in platelet count of >25% from day 0 to the last day measured in existing measurement period (range: 2-28 days, 2-6 measurements). 95 cases (i.e., 235/474 measurements) showed no increase of PLT% >25% in the existing period. The highest sensitivity and specificity at the same time was seen at a cut-off of $\geq 7.36\%$ rPLT% with 65.9% sensitivity and 68.4% specificity, the cut-off of $\geq 9.36\%$ shows moderate sensitivity of 58.0%, but with higher specificity of 75.8%. At a value of rPLT% of $\geq 20.06\%$ maximum specificity of 96.8% can be achieved. Overall, the area under ROC curve (AUC) for the measurement of rPLT% was 0.75 regarding the recognition of a regeneration of platelets.

The diagnostic use of the absolute rPLT number (rPLT#) regarding thrombopoiesis was also examined. A value of rPLT# of $\geq 8.60 \times 10^9$ /l, shows highest sensitivity and specificity at the same time of 23.5% and 86.4%. At a value of rPLT# of $\geq 20.18 \times 10^9$ /l maximum specificity of 98.7% can be achieved. The area under the ROC curve was very low (AUC-ROC 0.55).

At a cut off of ≥ 16.7 fl (reference range 8.9fl-18.4fl (Oellers 2015), MPV shows highest sensitivity and specificity at the same time of 60.2% and 72.6% to detect future regeneration of platelets. Increasing the cut-off value for the MPV to a value ≥ 23.5 fl would be necessary to achieve a specificity of 98.9%. The area (AUC) under ROC curve for the measurement of MPV was 0.66 regarding the recognition of a regeneration of platelets.

When comparing the platelet indices in the groups “non-regeneration” and “regeneration” of PLTs, platelet indices PCT, MPC were significantly lower in the “regenerative” than in the “non-regenerative” group. In contrast, MPV, PCDW, MPM and PMDW were significantly

higher in the “regenerative” than in the “non-regenerative” group (all $p < 0.0001$). PDW and the number of large PLT did not differ between groups. However, except for the MPV, the overlap of the two groups was large. There was a moderate correlation between rPLT% and MPV with $r_s = 0.60$. In both groups, the MPV was primarily within the reference range (8.9fl to 18.4fl).

Conclusion

Even as in humans, dog rPLTs are a useful diagnostic tool to assess thrombopoiesis.

At a cut-off of $\geq 9.36\%$, rPLTs shows in poorer sensitivity a desirable high specificity to detect platelet regeneration and can therefore be used. A reliable statement about the regeneration, however, is only possible a cut-off of $\geq 20.06\%$. Overall, at a cut-off value just above the reference interval, the MPV correlated only moderately with the rPLT-percentage with moderate sensitivity and specificity. It might be used as orienting marker of platelet regeneration. The absolute number of rPLTs, however, is less suitable as a marker of thrombopoiesis.

There are significant differences between the platelet parameters PLT, PCT, MPC and MPV, PCDW, MPM and PMDW in the groups “regeneration” and “non-regeneration”. Further studies evaluating the utility of these relatively unknown PLT indices to assess thrombopoiesis and underlying pathological mechanisms of thrombocytopenia are promising and desirable.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Abe Y, Wada H, Tomatsu H, Sakaguchi A, Nishioka J., Yabu Y, Onishi K, Nakatani K, Morishita Y, Oguni S, Nobori T (2006): A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF). *Thrombosis Research* 118: 463–469.

Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL (2000): A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404: 193–197.

Aster RH (2013): chapter 41 Drug-induced thrombocytopenia. In: Michelson AD (Hrsg.), *Platelets*. Elsevier/Academic Press 3. Auflage, London, 835–849.

Ault KA, Rinder HM, Mitchell J, Carmody MB, Vary CP, Hillman RS (1992): The significance of platelets with increased RNA content (reticulated platelets). A measure of the rate of thrombopoiesis. *American Journal of Clinical Pathology* 98: 637–646.

Avecilla ST, Bohlen P, Crystal RG, Dias S, Eaton D, Hackett NR, Hartman TE, Hattori K, Heissig B, Hicklin DJ, Jin DK, Liao F, Lyden D, Rafii S, de Sauvage F, Shido K, Tejada R, Witte L, Zhang F, Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, Tejada R, Liao F, Shido K, Jin DK, Dias S, Zhang F, Hartman TE, Hackett NR, Crystal RG, Witte L, Hicklin DJ, Bohlen P, Eaton D, Lyden D, Sauvage F de, Rafii S (2004): Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nature Medicine* 10: 64–71.

Bachman DE, Forman MA, Hostutler RA, Corn S, Lin J, Kociba GJ (2015): Prospective diagnostic accuracy evaluation and clinical utilization of a modified assay for platelet-associated immunoglobulin in thrombocytopenic and nonthrombocytopenic dogs. *Veterinary Clinical Pathology* 44: 355–368.

Balduini CL, Noris P, Spedini P, Belletti S, Zambelli A, Da Prada GA (1999): Relationship between size and thiazole orange fluorescence of platelets in patients undergoing high-dose chemotherapy. *British Journal of Haematology* 106: 202–207.

Bancroft AJ, Abel EW, McLaren M, Belch, J. J. F. (2000): Mean platelet volume is a useful parameter: a reproducible routine method using a modified Coulter Thrombocytometer. *Platelets* 11: 379–387.

Barlage S, Schmitz G.(2007): retikulierte Thrombozyten. In: Sack U, Tarnok A, Rothe G (Hrsg.), *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Karger, Basel; 372-380

Bergmann F (2006): Kap. 32 Physiologie des Thrombozyten. In: Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J (Hrsg.), *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Springer, Berlin, 333–338.

Beseoglu K (2003): Splenektomie bei hämatologischen Erkrankungen. Eine retrospektive Studie. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Chirurgische Klinik A, Dissertation.

Bessman JD (1984): The relation of megakaryocyte ploidy to platelet volume. *American Journal of Hematology* 16: 161–170.

- Bessmann JD, Williams LJ, Gilmer PR (1981):** Mean platelet volume. The inverse relation of platelet size and count in normal subjects. *American Journal of Clinical Pathology* 76: 289–293.
- Bommer NX, Shaw DJ, Milne EM, Ridyard AE (2008):** Platelet distribution width and mean platelet volume in the interpretation of thrombocytopenia in dogs. *Journal of Small Animal Practice* 49: 518–524.
- Botsch V (2009):** Thrombozytopenie beim Hund. München, Ludwig-Maximilians-Universität, medizinische Kleintierklinik, Dissertation.
- Boudreaux MK (2010):** chapter 9 Thrombopoiesis. In: Weiss DJ, Wardrop KJ (Hrsg.), *Schalm's veterinary hematology*. Wiley-Blackwell 6th ed., Ames, Iowa, 56–60.
- Briggs C, Hart D, Kunka S, Oguni S, Machin SJ (2006):** Immature platelet fraction measurement: a future guide to platelet transfusion requirement after haematopoietic stem cell transplantation. *Transfusion Medicine* 16: 101–109.
- Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ (2004):** Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *British Journal of Haematology* 126: 93–99.
- Brooks MB, Laforcade ADE (2010):** chapter 85 Acquired Coagulopathies. In: Weiss DJ, Wardrop KJ (Hrsg.), *Schalm's veterinary hematology*. Wiley-Blackwell 6th ed., Ames, Iowa, 654–660.
- Bugert P, Klüter H (2010):** Kap. 4 Das thrombozytäre Transkriptom. In: Pötzsch B, Madlener K (Hrsg.), *Hämostaseologie*. Springer-Verlag 2. Aufl., Berlin, Heidelberg, 43–50.
- Car BD (2010):** chapter 5 The hematopoietic system. In: Weiss DJ, Wardrop KJ (Hrsg.), *Schalm's veterinary hematology*. Wiley-Blackwell 6th ed., Ames, Iowa, 27–35.
- Cesari F, Marcucci R, Gori AM, Caporale R, Fanelli A, Casola G, Balzi D, Barchielli A, Valente S, Giglioli C, Gensini GF, Abbate R (2013):** Reticulated platelets predict cardiovascular death in acute coronary syndrome patients. *Thrombosis and Haemostasis* 109: 846–853.
- Chantrey J, Chapman PS, Patterson-Kane JC (2002):** Haemolytic-uraemic syndrome in a dog. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 49: 470–472.
- Consolini R, Calleri A, Bengala C, Legitimo A, Conte PF (2001):** Evaluation of thrombopoiesis kinetics by measurement of reticulated platelets and CD34+ cell subsets in patients with solid tumors following high dose chemotherapy and autologous peripheral blood progenitor cell support. *Haematologica* 86: 959–964.
- Corash L, Chen HY, Levin J, Baker G, Lu H, Mok Y (1987):** Regulation of thrombopoiesis: effects of the degree of thrombocytopenia on megakaryocyte ploidy and platelet volume. *Blood* 70: 177–185.
- Dale GL, Friese P, La Hynes, Burstein SA (1995):** Demonstration that thiazole-orange-positive platelets in the dog are less than 24 hours old. *Blood* 85: 1822–1825.
- Dale GL, Wolf RF, Hynes LA, Friese P, Burstein SA (1996):** Quantitation of platelet life span in splenectomized dogs. *Exp Hematol* 24: 518–523.

- Dastjerdi MS, Emami T, Najafian A, Amini M (2006):** Mean platelet volume measurement, EDTA or citrate? *Hematology* 11: 317–319.
- Davis B, Toivio-Kinnucan M, Schuller S, Boudreaux MK (2008):** Mutation in beta1-tubulin correlates with macrothrombocytopenia in Cavalier King Charles Spaniels. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22: 540–545.
- Day MJ (2010):** chapter 33 Immune-mediated anemias in the dog. In: Weiss DJ, Wardrop KJ (Hrsg.), *Schalm's veterinary hematology*. Wiley-Blackwell 6th ed., Ames, Iowa, 216–225.
- De Blasi RA, Cardelli P, Costante A, Sandri M, Mercieri M, Arcioni R (2013):** Immature platelet fraction in predicting sepsis in critically ill patients. *Intensive Care Medicine* 39: 636–643.
- Di Mario A, Garzia M, Leone F, Arcangeli A, Pagano L, Zini G (2009):** Immature platelet fraction (IPF) in hospitalized patients with neutrophilia and suspected bacterial infection. *The Journal of Infection* 59: 201–206.
- Dircks BH, Schuberth H, Mischke R (2009):** Underlying diseases and clinicopathologic variables of thrombocytopenic dogs with and without platelet-bound antibodies detected by use of a flow cytometric assay: 83 cases (2004-2006). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 235: 960–966.
- Dusse LMS, Freitas LG (2015):** Clinical applicability of reticulated platelets. *Clinica Chimica Acta* 439: 143–147.
- Ebner K:** Untersuchungen zu Triggerfaktoren der thrombotisch thrombozytopenischen Purpura (TTP) in Mäusen. Gießen, Lahn, Dissertation.
- Flegel WA, Wagner FF (2010):** Kap. 11 Blutgruppen: Alloantigene auf Erythrozyten. In: Kiefel V (Hrsg.), *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*. Springer 4. Aufl., Berlin, Heidelberg, 133-168
- Frey H, Althaus FR (Hrsg.) (2010):** Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. Enke, Stuttgart.
- Gelain ME, Tutino G, Rossi G, Bertazzolo W (2010a):** High fluorescent platelets fraction in macrothrombocytopenic Norfolk Terrier. 20th ECVIM-CA Annual Congress, Toulouse.
- Gelain ME, Tutino GF, Pogliani E, Bertazzolo W (2010b):** Macrothrombocytopenia in a group of related Norfolk terriers. *The Veterinary Record* 167: 493–494.
- George JN, Aster RH (2009):** Drug-induced thrombocytopenia: pathogenesis, evaluation, and management. *Hematology* 1: 153–158.
- Giles C (1981):** The platelet count and mean platelet volume. *British Journal of Haematology* 48: 31–37.
- Greinacher A, Lubenow N, Hinz P, Ekkernkamp A (2003):** Heparininduzierte Thrombozytopenie. *Deutsches Ärzteblatt* 100: A 2220–2229.
- Gyulkhandanyan AV, Mutlu A, Freedman J, Leytin V (2012):** Markers of platelet apoptosis: methodology and applications. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 33: 397–411.

- Hanahachi A, Kano R, Hasegawa A, Moritomo T, Watari T, Tsujimoto H (2001):** Thiazole orange-positive platelets in healthy and thrombocytopenic dogs. *Veterinary Record* 149: 122–123.
- Hartwig JH (2013):** chapter 8 The platelet cytoskeleton. In: Michelson AD (Hrsg.), *Platelets*. Elsevier/Academic Press 3. Auflage, London, 145–168.
- Hennel E, Kentouche K, Beck J, Kiehntopf M, Boeer K (2012):** Immature platelet fraction as marker for platelet recovery after stem cell transplantation in children. *Clinical Biochemistry* 45: 749–752.
- Himmelfarb J, Holbrook D, McMonagle E, Ault K (1997):** Increased reticulated platelets in dialysis patients. *Kidney International* 51: 834–839.
- Hoffmann JJML (2014):** Reticulated platelets: analytical aspects and clinical utility. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 52: 1107–1117.
- Hoffmann JJML, van den Broek NMA, Curvers J (2013):** Reference intervals of reticulated platelets and other platelet parameters and their associations. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 137: 1635–1640.
- Holloway S, Senior D, Roth L, Tisher CC (1993):** Hemolytic uremic syndrome in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 7: 220–227.
- Hoth M, Wischmeyer E (2012):** Kap. 6 Blut. In: Behrends J, Bischofberger J, Deutzmann R (Hrsg.), *Duale Reihe Physiologie*. Thieme 2. Auflage, Stuttgart, 164–191.
- Ingram M, Coopersmith A (1969):** Reticulated platelets following acute blood loss. *British Journal of Haematology* 17: 225–229.
- Italiano JE, Hartwig JH (2013):** chapter 2 Megakaryocyte development and platelet formation. In: Michelson AD (Hrsg.), *Platelets*. Elsevier/Academic Press 3. Auflage, London, 27–49.
- Ivory K, Sarria B, Fairweather-Tait SJ, Hughes DA (2007):** Reticulated platelets interfere with flow cytometric reticulocyte counts. *International Journal of Laboratory Hematology* 29: 352–360.
- Jones DL, Wagers AJ (2008):** No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9: 11–21.
- Jones OP (1960):** Origin of megakaryocyte granules from Golgi vesicles. *The Anatomical Record* 138: 105–113.
- Josefsson EC, Dowling MR, Lebois M, Kile BT (2013):** chapter 3 The regulation of platelet life span. In: Michelson AD (Hrsg.), *Platelets*. Elsevier/Academic Press 3. Auflage, London, 51–65.
- Jung H, Jeon H, Kim H, Kim S (2010):** Immature platelet fraction: establishment of a reference interval and diagnostic measure for thrombocytopenia. *The Korean Journal of Laboratory Medicine* 30: 451–459.
- Kaito K, Otsubo H, Usui N, Yoshida M, Tanno J, Kurihara E, Matsumoto K, Hirata R, Domitsu K, Kobayashi M (2005):** Platelet size deviation width, platelet large cell ratio, and mean platelet volume have sufficient sensitivity and specificity in the diagnosis of immune thrombocytopenia. *British Journal of Haematology* 128: 698–702.

- Kampanatkosol R, Thomson T, Habeeb O, Glynn L, Dechristopher PJ, Yong S, Jeske W, Maheshwari A, Muraskas J (2014):** The relationship between reticulated platelets, intestinal alkaline phosphatase, and necrotizing enterocolitis. *Journal of Pediatric Surgery* 49: 273–276.
- Karpatkin S (1972):** Human platelet senescence. *The Annual Review of Medicine* 23: 101–128.
- Kaspers B, Göbel T (2005):** Kap. 10.4 Hämostase. In: Engelhardt W von, Breves G (Hrsg.), *Physiologie der Haustiere*. Enke 2. Aufl., Stuttgart, 207–213.
- Kaufman RM, Captain Airo R, Pollack S, Crosby WH (1965):** Circulating megakaryocytes and platelet release in the lung. *Blood* 26: 720–731.
- Kaushansky K (1997):** Thrombopoietin. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 8: 45–50.
- Kaushansky K (2003):** Thrombopoietin: a tool for understanding thrombopoiesis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 1: 1587–1592.
- Kaushansky K (2005):** The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *The journal of Clinical Investigation* 115: 3339–3347.
- Kaushansky K (2007):** Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood* 111: 981–986.
- Kessler M, Kaser-Hotz B, Kandel-Tschiederer B (2012):** Kap. 36 Tumorerkrankungen, Neoplasien, Krebs. In: Suter P, Kohn B, Schwarz G (Hrsg.), *Praktikum der Hundeklinik*. Enke 11. Aufl., Stuttgart, 1089–1151.
- Kickler TS, Oguni S, Borowitz MJ (2006):** A clinical evaluation of high fluorescent platelet fraction percentage in thrombocytopenia. *American Journal of Clinical Pathology* 125: 282–287.
- Kieffer N, Guichard J, Farcet J, Vainchenker W, Breton-Gorius J (1987):** Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets. *European Journal of Biochemistry* 164: 189–195.
- Kienast J, Schmitz G (1990):** Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood* 75: 116–121.
- Kim HK, Kim J, Ham CK, Lee DS, Park S, Cho H (2008):** Prognostic value of platelet indices as determined by ADVIA 120 in patients suspected of having disseminated intravascular coagulation. *International Journal of Laboratory Hematology* 30: 117–123.
- Kohn B (2012):** Kap. 11 Anämien, Polyzythämien, Gerinnungsstörungen. In: Suter P, Kohn B, Schwarz G (Hrsg.), *Praktikum der Hundeklinik*. Enke 11. Aufl., Stuttgart, 248–283.
- Kohn B, Giger U (2001):** Kap 19. Anämien, Polyzythämien, Gerinnungsstörungen. In: Niemand HG, Suter PF, Arnold P (Hrsg.), *Praktikum der Hundeklinik*. Kapitel 19. Anämien, Polyzythämien, Gerinnungsstörungen. Parey 9. Aufl., Berlin, 623–657.
- Korkmaz S, Uslu AU, Aydin B, Dogan O, Sencan M (2013):** Pre-treatment and post-treatment changes in platelet indices in patients with immune thrombocytopenia. *Saudi Medical Journal* 34: 591–596.

- Lachowicz JL, Post GS, Moroff SD, Mooney SC (2004):** Acquired amegakaryocytic thrombocytopenia - four cases and a literature review. *Journal of Small Animal Practice* 45: 507–514.
- Latger-Cannard V, Hoarau M, Salignac S, Baumgart D, Nurden P, Lecompte T (2012):** Mean platelet volume: comparison of three analysers towards standardization of platelet morphological phenotype. *International Journal of Laboratory Hematology* 34: 300–310.
- Leader A, Pereg D, Lishner M (2012):** Are platelet volume indices of clinical use? A multidisciplinary review. *Annals of Medicine* 44: 805–816.
- Levi M (2004):** Current understanding of disseminated intravascular coagulation. *British Journal of Haematology* 124: 567–576.
- Lewis DC, Meyers KM (1996):** Canine idiopathic thrombocytopenic purpura. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 10: 207–218.
- Leytin V (2012):** Apoptosis in the anucleate platelet. *Blood Reviews* 26: 51–63.
- Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, Weyrich AS (2001):** Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *The Journal of Cell Biology* 154: 485–490.
- Mahlberg R, Gilles A, Läsch A (2005):** Hämatologie. Theorie und Praxis für medizinische Assistenzberufe. Wiley-VCH, 2. Aufl., Weinheim.
- Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JL, Collinge JE, Hilton AA, Ellis S, Kelly PN, Ekert PG, Metcalf D, Roberts AW, Huang DCS, Kile BT (2007):** Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell* 128: 1173–1186.
- McAnulty JF, Rudd RG (1985):** Thrombocytopenia associated with vaccination of a dog with a modified-live paramyxovirus vaccine. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 186: 1217–1219.
- McBane RD, Gonzalez C, Hodge DO, Wysokinski WE (2014):** Propensity for young reticulated platelet recruitment into arterial thrombi. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 37: 148–154.
- McCrae KR (2013):** chapter 44 Thrombocytopenia in pregnancy. In: Michelson AD (Hrsg.), *Platelets*. Elsevier/Academic Press 3. Auflage, London, 909–927.
- Meintker L, Haimerl M, Ringwald J, Krause SW (2013):** Measurement of immature platelets with Abbott CD-Sapphire and Sysmex XE-5000 in haematology and oncology patients. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 51: 2125–2131.
- Michelson AD (2013):** chapter 39 The clinical approach to disorders of platelet number and function. In: Michelson AD (Hrsg.), *Platelets*. Elsevier/Academic Press 3. Auflage, London, 813–817.
- Michimoto T, Okamura T, Suzuki K, Watari T, Hasegawa A, Kano R (2004):** Thiazole orange positive platelets in a dog with Evans' syndrome. *Journal of Veterinary Medical Science* 66: 1305–1306.
- Minter FM, Ingram M (1971):** Platelet volume: density relationships in normal and acutely bled dogs. *British Journal of Haematology* 20: 55–68.
- Mischke R (2003):** *Praktische Hämatologie bei Hund und Katze*. Schlütersche, Hannover.

- Mischke R (2014):** Kap. 13 Hämostase. In: Moritz A (Hrsg.), *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. Schattauer 7. Aufl., Stuttgart, 197–242.
- Monteagudo M, Amengual MJ, Muñoz L, Soler JA, Roig I, Tolosa C (2008):** Reticulated platelets as a screening test to identify thrombocytopenia aetiology. *Q J Med* 101: 549–555.
- Moritz A (2000):** Der Einsatz lasergestützter Multiparameter-Hämatologiesysteme in der Veterinärmedizin. Gießen, Justus-Liebig-Universität, Medizinische und Gerichtliche Veterinärklinik Innere Krankheiten der Kleintiere, Habilitationsschrift.
- Moritz A, Bauer N (2014):** Kap. 12 Knochenmarkuntersuchung. In: Moritz A (Hrsg.), *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. Schattauer 7. Aufl., Stuttgart, 160-196
- Moritz A, Walcheck BK, Weiss DJ (2005):** Evaluation of flow cytometric and automated methods for detection of activated platelets in dogs with inflammatory disease. *American Journal of Veterinary Research* 66: 325–329.
- Nabity MB, Camus MS, Harr KE, Flatland B, Freeman K, Vap LM (2014):** Determination of allowable total error for hematology and coagulation measurands. *Veterinary Clinical Pathology*: E16.
- Nakamura RK, Tompkins E, Bianco D (2012):** Therapeutic options for immune-mediated thrombocytopenia. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 22: 59–72.
- Nelson RB, Kehl D (1981):** Electronically determined platelet indices in thrombocytopenic patients. *Cancer* 48: 954–956.
- Nieuwland R, Vanderpol E, Gardiner C, Sturk A (2013):** chapter 22 Platelet-derived microparticles. In: Michelson AD (Hrsg.), *Platelets*. Elsevier/Academic Press 3. Auflage, London, 453–467.
- Nomura T, Kubota Y, Kitanaka A, Kurokouchi K, Inage T, Saigo K, Iseki K, Baba N, Yamaoka G, Arai T, Taminato T (2010):** Immature platelet fraction measurement in patients with chronic liver disease: a convenient marker for evaluating cirrhotic change. *International Journal of Laboratory Hematology* 32: 299–306.
- Noronha JFA, Costa FF, Saad STO, Lorand-Metze IGH, Grotto HZW (2007):** Evaluation of reticulated platelets in patients with sickle cell diseases. *Thrombosis Research* 121: 259–267.
- Northern J, Tvedten HW (1992):** Diagnosis of microthrombocytosis and immune-mediated thrombocytopenia in dogs with thrombocytopenia: 68 cases (1987-1989). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 200: 368–372.
- Ntaios G, Papadopoulos A, Chatzinikolaou A, Saouli Z, Karalazou P, Kaiafa G, Girtovitis F, Kontoninas Z, Savopoulos C, Hatzitolios A, Alexiou-Daniel S (2008):** Increased values of mean platelet volume and platelet size deviation width may provide a safe positive diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Acta Haematologica* 119: 173–177.
- O'Rourke LG (2010):** chapter 14 Preclinical evaluation of compound-related cytopenias. In: Weiss DJ, Wardrop KJ (Hrsg.), *Schalm's veterinary hematology*. Wiley-Blackwell 6th ed., Ames, Iowa, 85–91.

- Oellers D (2015):** Die Analyse retikulierter Thrombozyten beim Hund mit den Hämatologiegeräten Sysmex XT-2000iV und ADVIA 120/2120. Giessen, Justus-Liebig-Universität, Klinikum Veterinärmedizin, Klinische Pathophysiologie und klinische Laboratoriumsdiagnostik, Dissertation.
- Ogawa M (1993):** Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 81: 2844–2853.
- Ogura M, Yasuno M, Kobayashi Y, Tsukada T (1995):** Clinical significance of platelet volume indices estimated by automated blood cell analyzer. *Rinsho byori. The Japanese Journal of Clinical Pathology* 43: 385–390.
- Olver CS (2010):** chapter 6 Erythropoiesis. In: Weiss DJ, Wardrop KJ (Hrsg.), Schalm's veterinary hematology. Wiley-Blackwell 6th ed., Ames, Iowa, 36–42.
- O'Malley CJ, Rasko JE, Basser RL, McGrath KM, Cebon J, Grigg AP, Hopkins W, Cohen B, O'Byrne J, Green MD, Fox RM, Berndt MC, Begley CG (1996):** 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* 88: 3288–3298.
- Orcutt ES, Lee JA, Bianco D (2010):** Immune-mediated hemolytic anemia and severe thrombocytopenia in dogs: 12 cases (2001-2008). *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 20: 338–345.
- Osei-Bimpong A (2009):** The effect of storage on the clinical utility of the immature platelet fraction. *Hematology* 14: 118–121.
- Overmann JA, Modiano JF, O'Brian TO (2010):** chapter 3 Stem cell biology. In: Weiss DJ, Wardrop KJ (Hrsg.), Schalm's veterinary hematology. Wiley-Blackwell 6th ed., Ames, Iowa, 14–19.
- Öztürk ZA, Dag MS, Kuyumcu ME, Cam H, Yesil Y, Yilmaz N, Aydinli M, Kadayifci A, Kepekci Y (2013):** Could platelet indices be new biomarkers for inflammatory bowel diseases? *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 17: 334–341.
- Pankraz A, Bauer N, Moritz A (2009):** Comparison of flow cytometry with the Sysmex XT2000iV automated analyzer for the detection of reticulated platelets in dogs. *Veterinary Clinical Pathology* 38: 30–38.
- Parco S, Vascotto F (2012):** Application of reticulated platelets to transfusion management during autologous stem cell transplantation. *OncoTargets and Therapy* 5: 1–5.
- Park Y, Schoene N, Harris W (2002):** Mean platelet volume as an indicator of platelet activation: methodological issues. *Platelets* 13: 301–306.
- Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE (2005):** The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *The Journal of Clinical Investigation* 115: 3348–3354.
- Peng J, Friese P, Heilmann E, George JN, Burstein SA, Dale GL (1994):** Aged platelets have an impaired response to thrombin as quantitated by P-selectin expression. *Blood* 83: 161–166.

- Pons I, Monteagudo M, Lucchetti G, Muñoz L, Perea G, Colomina I, Guiu J, Obiols J (2010):** Correlation between immature platelet fraction and reticulated platelets. Usefulness in the etiology diagnosis of thrombocytopenia. *European Journal of Haematology* 85: 158–163.
- Psaila B, Bussel JB (2013):** chapter 40 Immune thrombocytopenia. In: Michelson AD (Hrsg.), *Platelets*. Elsevier/Academic Press 3. Auflage, London, 819–833.
- Putsche JC, Kohn B (2008):** Primary immune-mediated thrombocytopenia in 30 dogs (1997-2003). *Journal of the American Animal Hospital Association* 44: 250–257.
- Radley JM, Haller CJ (1982):** The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood* 60: 213–219.
- Raskin RE, Latimer KE, Tvedten H (2011):** Kap. 4 Veränderungen des weißen Blutbilds. In: Willard MD, Tvedten H (Hrsg.), *Labordiagnostik in der Kleintierpraxis*. Urban & Fischer, München, 73–107.
- Rinder HM, Bonan JL, Anandan S, Rinder CS, Rodrigues PA, Smith BR (1994):** Noninvasive measurement of platelet kinetics in normal and hypertensive pregnancies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 170: 117–122.
- Robinson MSC, Mackie IJ, Khair K, Liesner R, Goodall AH, Savidge GF, Machin SJ, Harrison P (1998):** 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* 100: 351–357.
- Robinson MSC, Mackie IJ, Machin SJ, Harrison P (2000):** Two colour analysis of reticulated platelets. *Clinical and Laboratory Haematology* 22: 211–213.
- Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, Michel M, Provan D, Arnold DM, Bussel JB, Cines DB, Chong BH, Cooper N, Godeau B, Lechner K, Mazzucconi MG, McMillan R, Sanz MA, Imbach P, Blanchette V, Kühne T, Ruggeri M, George JN (2009):** Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood* 113: 2386–2393.
- Ruggeri ZM, Jackson SP (2013):** chapter 20 Platelet thrombus formation in flowing blood. In: Michelson AD (Hrsg.), *Platelets*. Elsevier/Academic Press 3. Auflage, London, 399–423.
- Ruisi MM, Psaila B, Ward MJ, Villarica G, Bussel JB (2010):** Stability of measurement of the immature platelet fraction. *American Journal of Hematology* 85: 622–624.
- Rukshin V, Azarbal B, Finkelstein A, Shah PK, Cercek B, Tsang V, Kaul S (2003):** Effects of GP IIb/IIIa Receptor Inhibitor Tirofiban (Aggrastat) in Ex Vivo Canine Arteriovenous Shunt Model of StentThrombosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 41: 615–624.
- Russel KE (2010):** chapter 77 Platelet kinetics and laboratory evaluation of thrombocytopenia. In: Weiss DJ, Wardrop KJ (Hrsg.), *Schalm's veterinary hematology*. Wiley-Blackwell 6th ed., Ames, Iowa, 576–585.
- Saigo K, Sakota Y, Masuda Y, Matsunaga K, Narita H, Hashimoto M, Takenokuchi M, Kubota Y, Nomura T, Nobuhara Y, Sugimoto T, Imoto S, Kumagai S (2007):** Clinical utility of new parameters provided by XE-2100 RET channel. *Sysmex Journal International* 17: 81–94.

- Saigo K, Sakota Y, Masuda Y, Matsunaga K, Takenokuchi M, Nishimura K, Sugimoto T, Sakurai K, Hashimoto M, Yanai T, Hayakawa A, Takeshima Y, Nomura T, Kubota Y, Kumagai S (2008):** Automatic detection of immature platelets for decision making regarding platelet transfusion indications for pediatric patients. *Transfusion and Apheresis Science* 38: 127–132.
- Sanders WE, Reddick RL, Nichols TC, Brinkhous KM, Read MS (1995):** Thrombotic thrombocytopenia induced in dogs and pigs. The role of plasma and platelet vWF in animal models of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 15: 793–800.
- Scheinin TM, Koivuniemi AP (1963):** Megakaryocytes in the pulmonary circulation. *Blood* 22: 82–87.
- Schulze H (2008):** Neue Erkenntnisse zur Zellbiologie der Thrombozytose und Pathophysiologie congenitaler Thrombozytopenien. Berlin, Medizinische Fakultät Charité, Habilitationsschrift.
- Schulze H (2010):** Gegenwärtige Modelle der Thrombozytose. *Der Pathologe* 31: 183–187.
- Schulze H, Korpál M, Hurov J, Kim S, Zhang J, Cantley LC, Graf T, Shivdasani RA (2006):** Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood* 107: 3868–3875.
- Schwandt-Müller F (2013):** Kap. 4 Paraneoplastische Syndrome. In: Kessler M (Hrsg.), *Kleintieronkologie*. Enke 3. Aufl., Stuttgart, 23–32.
- Schwartz D, Sharkey L, Armstrong PJ, Knudson C, Kelley J (2014):** Platelet volume and plateletcrit in dogs with presumed primary immune-mediated thrombocytopenia. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28: 1575–1579.
- Schwer HD, Lecine P, Tiwari S, Italiano JE, Hartwig JH, Shivdasani RA (2001):** A lineage-restricted and divergent β -tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Current Biology* 11: 579–586.
- Schwartz H, Köster S, Kahr WHA, Michetti N, Kraemer BF, Weitz DA, Blaylock RC, Kraiss LW, Greinacher A, Zimmerman GA, Weyrich AS (2010):** Anucleate platelets generate progeny. *Blood* 115: 3801–3809.
- Scott MA, Jutkowitz LA (2010):** chapter 78 Immune-Mediated Thrombocytopenia. In: Weiss DJ, Wardrop KJ (Hrsg.), *Schalm's veterinary hematology*. Wiley-Blackwell 6th ed., Ames, Iowa, 586–595.
- Sedlmayr P, Hübl W. (2007):** Untersuchungen von Retikulozyten und fetalen Erythrozyten. In: Sack U, Tärnok A, Rothe G (Hrsg.), *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Karger, Basel; 381-399
- Selleng K, Greinacher A (2006):** Medikamenteninduzierte Immunthrombozytopenien. *Internistische Praxis* 46: 753–765.
- Siegel RS, Rae JL, Barth S, Coleman RE, Reba RC, Kurlander R, Rosse WF (1989):** Platelet survival and turnover: Important factors in predicting response to splenectomy in immune thrombocytopenic purpura. *American Journal of Hematology* 30: 206–212.

- Siegel-Axel D, Langer H, Lindemann S, Gawaz M (2006):** Die Rolle von Thrombozyten bei Entzündungs- und Atheroskleroseprozessen. *Medizinische Klinik* 101: 467–475.
- Siemens (2009):** ADVIA® 2120i/2120/120. Trainingshandbuch, Revision: 2.
- Siemens (2010):** ADVIA® 2120/2120i Hematology Systems Operator's Guide. Siemens Healthcare.
- Singh H, Chaudhary R, Ray V (2003):** Platelet indices as quality markers of platelet concentrates during storage. *Clinical and Laboratory Haematology* 25: 307–310.
- Smyth SS, McEver RP, Weyrich AS, Morrell CN, Hoffman MR, Arepally GM, French PA, Dauerman HL, Becker RC (2009):** Platelet functions beyond hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 7: 1759–1766.
- Stiegler G, Stohlawetz P, Brugger S, Jilma B, Vierhapper H, Hocker P, Panzer S (1998):** Elevated numbers of reticulated platelets in hyperthyroidism: direct evidence for an increase of thrombopoiesis. *British Journal of Haematology* 101: 656–658.
- Stokol T (2010):** chapter 88 Disseminated intravascular coagulation. In: Weiss DJ, Wardrop KJ (Hrsg.), *Schalm's veterinary hematology*. Wiley-Blackwell 6th ed., Ames, Iowa, 679–688.
- Sullivan PS, Manning KL, McDonald TP (1995):** Association of mean platelet volume and bone marrow megakaryocytopoiesis in thrombocytopenic dogs: 60 cases (1984-1993). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 206: 332–334.
- Sysmex Deutschland GmbH (2012):** Fragmentozyten, Akanthozyten und Stechapfel-Formen – eine Herausforderung an das hämatologische Labor. Online in Internet: URL: http://www.sysmex.de/fileadmin/media/f101/Xtra/Themenblaetter/15.2.02_Fragmentozyt_vs_Akanthozyt_RZ.pdf [Abrufdatum: 04.10.2014]
- Tarnow I, Kristensen AT (2010):** chapter 142 Evaluation of platelet function. In: Weiss DJ, Wardrop KJ (Hrsg.), *Schalm's veterinary hematology*. Wiley-Blackwell 6th ed., Ames, Iowa, 1123–1132.
- Thomas JS (2010):** chapter 79 Non-immune-mediated thrombocytopenia. In: Weiss DJ, Wardrop KJ (Hrsg.), *Schalm's veterinary hematology*. Wiley-Blackwell 6th ed., Ames, Iowa, 596–604.
- Thomas-Kaskel A, Mattern D, Köhler G, Finke J, Behringer D (2007):** 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. *Clinical Cytometry* 72: 241–248.
- Thon JN, Italiano JE (2012):** Does size matter in platelet production? *Blood* 120: 1552–1561.
- Threatte GA, Adrados C, Ebbe S, Brecher G (1984):** Mean platelet volume: the need for a reference method. *American Journal of Clinical Pathology* 81: 769–772.
- Uhrynowska M, Maślanka K, Kopeć I, Sakiewicz J, Łopacz P, Orzińska A, Brojer E (2012):** Reticulated platelet count used for differentiation of the type of thrombocytopenia in pregnant women. *Ginekologia Polska* 83: 265–269.

- Vogelaar S, Posthuma D, Boomsma D, Kluff C (2002):** Blood sample stability at room temperature for counting red and white blood cells and platelets. *Vascular Pharmacology* 39: 123–125.
- Wang C, Smith BR, Ault KA, Rinder HM (2002):** Reticulated platelets predict platelet count recovery following chemotherapy. *Transfusion* 42: 368–374.
- Wardrop KJ (2010):** chapter 19 Infectious injury to bone marrow. In: Weiss DJ, Wardrop KJ (Hrsg.), *Schalm's veterinary hematology*. Wiley-Blackwell 6th ed., Ames, Iowa, 118–120.
- Weiss D, Tvedten H (2011):** Kap. 2 Großes Blutbild und Knochenmarkuntersuchung. In: Willard MD, Tvedten H (Hrsg.), *Labordiagnostik in der Kleintierpraxis*. Urban & Fischer, München, 13–41.
- Weiss DJ (2007):** Hemophagocytic syndrome in dogs: 24 cases (1996-2005). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 230: 697–701.
- Weiss DJ (2010a):** chapter 16 Drug -induced blood cell disorders. In: Weiss DJ, Wardrop KJ (Hrsg.), *Schalm's veterinary hematology*. Wiley-Blackwell 6th ed., Ames, Iowa, 98–104.
- Weiss DJ (2010b):** chapter 17 Myelonecrosis and acute inflammation. In: Weiss DJ, Wardrop KJ (Hrsg.), *Schalm's veterinary hematology*. Wiley-Blackwell 6th ed., Ames, Iowa, 106–111.
- Weiss DJ (2010c):** chapter 18 Chronic inflammation and secondary myelofibrosis. In: Weiss DJ, Wardrop KJ (Hrsg.), *Schalm's veterinary hematology*. Wiley-Blackwell 6th ed., Ames, Iowa, 112–117.
- Weiss DJ (2010d):** chapter 38 Pure red cell aplasia. In: Weiss DJ, Wardrop KJ (Hrsg.), *Schalm's veterinary hematology*. Wiley-Blackwell 6th ed., Ames, Iowa, 251–255.
- Weiss DJ, Souza CD (2010):** chapter 45 Monocytes and macrophages and their disorders. In: Weiss DJ, Wardrop KJ (Hrsg.), *Schalm's veterinary hematology*. Wiley-Blackwell 6th ed., Ames, Iowa, 298–306.
- Weyrich AS, Dixon DA, Pabla R, Elstad MR, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA (1998):** Signal-dependent translation of a regulatory protein, Bcl-3, in activated human platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 5556–5561.
- White JG (2013):** chapter 7 Platelet structure. In: Michelson AD (Hrsg.), *Platelets*. Elsevier/Academic Press 3. Auflage, London, 117–143.
- Wilkerson MJ, Shuman W (2001):** Alterations in normal canine platelets during storage in EDTA anticoagulated blood. *Veterinary Clinical Pathology* 30: 107–113.
- Wilkerson MJ, Shuman W, Swist S, Harkin K, Meinkoth J, Kocan AA (2001):** Platelet size, platelet surface-associated IgG, and reticulated platelets in dogs with immune-mediated thrombocytopenia. *Veterinary Clinical Pathology* 30: 141–149.
- Würtz M, Wulff LN, Grove EL, Kristensen SD, Hvas A (2012):** Influence of renal function and platelet turnover on the antiplatelet effect of aspirin. *Thrombosis Research* 129: 434–440.
- Yeaman MR, Bayer AS (2013):** chapter 37 Antimicrobial host defense. In: Michelson AD (Hrsg.), *Platelets*. Elsevier/Academic Press 3. Auflage, London, 767–801.

Zenker I, Keller L, Meichner K, Unterer S, Hartmann K (2009): Immune mediated destruction of platelets in dogs with heat stroke: A prospective study. *Tierärztliche Praxis* 37: 314–318.

Zucker ML, Murphy CA, Rachel JM, Martinez GA, Abhyankar S, McGuirk JP, Reid KJ, Plapp FV (2006): Immature platelet fraction as a predictor of platelet recovery following hematopoietic progenitor cell transplantation. *Laboratory Hematology* 12: 125–130.

9 ABKÜRZUNGEN

#	absolut
µm	Mikrometer
14C-SRA	14C-Serotonin release assay
AA	aplastische Anämie
ACS	acute coronary syndrome
ADAMTS 13	a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13
ADP	Adenosindiphosphat
AIHA	autoimmunhämolytische Anämie
Apaf	apoptotic protease-activating factor
AT	Antithrombin
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	area under the curve
Bcl	B-cell lymphoma
BFU-Meg	burst-forming unit- megakaryocytes
B-L	B-Lymphozyt
CBC	complete blood count (kleines Blutbild)
CD	cluster of differentiation
CD62P	P-Selektin
CFU-GEMM	colony-forming unit-granulocyte-erythroid-macrophage-megakaryocyte
CFU-Meg	cell-forming unit-megakaryocytes
CHCM	corpuscular hemoglobin concentration mean (mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten)
CML	chronisch myeloische Leukämie
c-mpl	cellular homologue of a retrovirus complex inducing myeloproliferative leukemia
CV	coefficient of variation
D	Dysplasie
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DIABLO	direct IAP-binding protein with low PI
DIFF	Leukozyten-Differenzierung
DIG	disseminierte intravasale Gerinnung
DISC	death-inducing signaling complex
DMS	demarkierendes Membransystem
EC	Endothelzelle
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FADD	Fas-associated death domain
FasL	Fas ligand
FGF	fibroblast growth factor
fl	Femtoliter
GDP	Guanosindiphosphat
GP	Glykoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
HFPF	high fluorescent platelet fraction

HIPA-Test	heparin-induzierter Plättchen-Aktivierungs-Test
HIT	heparininduzierte Thrombozytopenie
HPS	Hermansky-Pudlak Syndrom
HUS	hämolytisch urämisches Syndrom
IBD	inflammatory bowel disease
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IMHA	immunmedierte hämolytische Anämie
IPF	immature platelet fraction
ITP	immunmedierte Thrombozytopenie
IVIG	intravenöse Immunglobuline
kDa	Kilodalton
KL	c-kit ligand
LAMP	lysosomal associated membrane protein
LIF	leukemia inhibiting factor
LPLT	large platelet (großer Thrombozyt>20fl)
MCH	mean corpuscular hemoglobin (mittlere Hämoglobinkonzentration der Einzelerythrozyten)
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MIT	medikamenteninduzierte Immunthrombozytopenie
ml	Milliliter
MP	microparticle
MPC	mean platelet component concentration (mittlere Konzentration innerer Thrombozytenbestandteile)
MPM	mean platelet mass (mittlere Thrombozytenmasse)
MPS	mononukleär-phagozytierendes System
MPV	mean platelet volume
m-RNA	messenger RNA
MS	Myelosuppression
n	Anzahl der Patienten bzw. Messungen
nm	Nanometer
NSAIDS	nichtsteroidale Antiphlogistika
PAF	plättchenaktivierender Faktor
PBSC	peripheral blood stem cell
PCDW	Verteilungsbreite der MPC
PCR	polymerase chain reaction
PCT	plateletcrit (Thrombokrit)
PDW	platelet distribution width (Verteilungsbreite des Thrombozytenvolumens)
PF	platelet factor
pITP	primäre immunmedierte Thrombozytopenie
P-LCR	platelet large cell ratio (Anteil großer Thrombozyten)
PLT	platelet (Thrombozyt)
PLT clumps	Thrombozytenagglutinate
PMDW	platelet mass distribution width (Verteilungsbreite der Thrombozytenmasse)
PS	Phosphatidylserin
PSAIgG	platelet surface-associated immunglobuline G
QBC	quantitative buffy coat

RBC	red blood cells
RETI	Retikulozyten
RNA	ribonucleic acid
ROC-Kurve	Receiver-Operating-Characteristic-Kurve (Grenzwertoptimierungskurve)
rPLT	reticulated platelet (retikulierter Thrombozyt)
r-RNA	ribosomale RNA
SAChe ⁺	small acetylcholinesterase-positive
SDF	stromal-derived factor
SLE	systemischer Lupus erythematoses
SMAC	second mitochondria-derived activator of caspases
SPD	storage pool disease
SSW	Schwangerschaftswoche
TAFI	thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor
TEa	allowable total error
TF	tissue factor
TFPI	tissue factor pathway inhibitor
TL	TNF-like ligand
TNF	Tumornekrosefaktor
TO	Thiazolorange
TPO	Thrombopoetin
TRADD	TNF-receptor-associated death domain
TRAP	thrombin receptor activating peptide
TTP	thrombotisch-thrombozytopenische Purpura
Tz	Thrombozyten
UFC	Unified Fluidic Circuit
UFH	unfraktioniertes Heparin
vWF	von-Willebrand-Faktor
μl	Mikroliter

10 DANKSAGUNG

Hiermit möchte ich allen danken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Von ganzem Herzen möchte ich Herrn Prof. Dr. Andreas Moritz für die Gelegenheit zu einer so interessanten und vielseitigen Doktorarbeit danken. Danke für die unermüdliche Unterstützung und Betreuung auf professioneller sowie persönlicher Ebene, die man sich zu keiner Zeit hätte besser wünschen können.

PD Dr. Natali Bauer möchte ich ganz besonders herzlich für ihre stetige, professionelle Hilfe bei der statistischen Auswertung und bei Fachfragen danken.

Allen Mitarbeitern des Klinikums Veterinärmedizin, Klinische Pathophysiologie und klinische Laboratoriumsdiagnostik möchte ich für die konstruktive Zusammenarbeit danken. Im Besonderen danke ich dem Team des Labors für seine bereitwillige und herzliche Unterstützung.

Der Firma Sysmex Europe GmbH danke ich für die Bereitstellung der Gerätesoftware.

Dank auch an Dipl.-Ing. Gottfried Prechtel für die Erläuterungen der Software.

Vielen Dank an Dr. Dana Oellers für das Zurverfügungstellen ihrer Daten und ihre Starthilfe.

Danken möchte ich auch Jannika Fuchs und allen, die diese Zeit der Dissertation so unvergesslich machten.

Vor allem möchte ich meiner Großmutter Irene und meinem Freund Harry danken, die mir mit Ihrer tiefen Liebe die Kraft gegeben haben, meinen großen Traum zu erfüllen.

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Murnau, den 11.11.2015

Rabea Manuela Welker



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6480-8



9 783835 196480 8