

Diagnose der Thrombozytenfunktionsstörungen – eine Herausforderung im Labor

The Diagnosis of Platelet Function Disorders – A Challenge in the Laboratory

Autoren

Karina Althaus¹, Miriam Wagner², Tamam Bakchoul^{1,2}

Institute

- 1 Zentrum für Klinische Transfusionsmedizin gemeinnützige GmbH, Tübingen
- 2 Transfusionsmedizin, Medizinische Fakultät der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen

Schlüsselwörter

Thrombozyten, Thrombozytenfunktionsstörung, Blutung, Thrombozytopenie

Key words

platelet, platelet function defect, bleeding, thrombocytopenia

Bibliografie

DOI <https://doi.org/10.1055/a-0626-6467>

Transfusionsmedizin 2019; 9: 96–108 © Georg Thieme

Verlag KG Stuttgart · New York | ISSN 2191-8805

Korrespondenzadresse

Tamam Bakchoul, MD
Zentrum für Klinische Transfusionsmedizin
gemeinnützige GmbH
Otfried-Müller-Straße 4, 72076 Tübingen
tamam.bakchoul@med.uni-tuebingen.de

ZUSAMMENFASSUNG

Die Ursache von Thrombozytenfunktionsstörungen kann erblich bedingt sein, aber auch infolge von Begleiterkrankungen und Arzneimittelwirkungen auftreten. Die Thrombozytenfunktionsuntersuchung ist jedoch komplex und kaum standardisiert. Die Bestimmung der Thrombozytenzahl und die morphologische Untersuchung der Blutplättchen sind auch für eine erste Beurteilung der Thrombozytenfunktion extrem hilfreich. Bei Patienten mit Verdacht auf eine Thrombozytenfunktionsstörung sollte nach Bestimmung der Thrombozytenzahl und der ersten morphologischen Untersuchung die Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) und wenn möglich die Sekretionsanalyse z.B. in der Durchflusszytometrie bzw.

die Immunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt werden. Bei auffälligen Befunden können weitere spezialisierte Verfahren wie z.B. die Elektronenmikroskopie und genetische Untersuchungen zielführend sein. Hierbei ist eine Vereinheitlichung von Thrombozytenfunktionsanalysen und Antikörperuntersuchungen zwischen den verschiedenen Laboren extrem wichtig, um die Diagnostik auf diesem Gebiet zu optimieren. Wir möchten uns in diesem Artikel auf die angeborene Thrombozytenfunktionsstörung und die derzeit aktuellen Labormethoden fokussieren, um die zugrunde liegenden molekularen und genetischen Defekte genauer bestimmen zu können. Ziel ist es, eine optimale Anwendung des diagnostischen und therapeutischen Ansatzes für die Behandlung von Patienten mit erblichen Thrombozytenfunktionsstörungen zu ermöglichen.

ABSTRACT

Inherited platelet disorders as well as comorbidities or drugs can cause platelet dysfunctions. Platelet function testing is complex and poorly standardized. Evaluation of platelet count, review of peripheral blood cell morphology and bleeding assessment tools can aid the initial differential diagnosis. For patients requiring further laboratory testing, light transmission aggregometry, secretion assays, and immunofluorescence are the most useful next steps and will direct further specialized testing including flow cytometry, electron microscopy, and genetic diagnostics. Standardization of platelet function analysis and antibody testing is essential and can provide a template for clinical laboratories that will optimize diagnosis and assure high quality results. In this article we will focus on platelet function disorders and on current laboratory methods to identify the underlying molecular and genetic defect. Information provided in this article will allow applying the best possible diagnostic and therapeutic approach to patients with inherited as well as acquired platelet disorders. The aim of this review is to provide information on applying the best possible diagnostic and therapeutic approach to patients with inherited as well as acquired platelet function disorders.

Einleitung

Den Thrombozyten kommt in der primären Hämostase eine Schlüsselfunktion zu. Komplexe Signalkaskaden steuern die Interaktion zwischen den Thrombozyten sowie zwischen Thrombozyten und Gefäßwand und bieten die Grundlage für eine suffiziente sekundäre Hämostase. Störungen in der Thrombozytenfunktion führen daher zu einer eingeschränkten Hämostase und der damit verbundenen Blutungsneigung. Das perioperative Blutungsrisiko bei Patienten mit Plättchenfunktionsdefekten liegt mit 24,8% deutlich höher als bei Veränderungen der Plättchenzahl mit 13,4% [1]. Das liegt wahrscheinlich daran, dass Thrombozytenfunktionsstörungen aufgrund der anspruchsvollen Diagnostik im Gegensatz zu den Thrombozytopenien häufig unerkannt bleiben bzw. besonders durch die perioperative Einnahme von Schmerzmitteln in ihrem Defekt potenziert werden. Daher ist eine zielgerichtete Diagnostik gerade im perioperativen Setting, aber auch vor Einnahme von Thrombozytenaggregationshemmern, wichtig.

Ursachen von Thrombozytenfunktionsstörungen

Die Ursachen von Thrombozytenfunktionsstörungen sind vielfältig (► **Tab. 1**). Sie umfassen:

- Rezeptordefekte,
- Granuladefekte,
- Transkriptionsfaktordefekte,
- Signaltransduktionsdefekte,
- Zytoskelettdefekte und
- Defekte der Phospholipidmembran (► **Abb. 1**).

Rezeptordefekte

Glanzmann-Thrombasthenie

Ein qualitativer oder quantitativer Defekt des Glykoproteinrezeptors (GP) IIb/IIIa ist die Ursache für die Glanzmann-Thrombasthenie. Der GP-IIb/IIIa-Rezeptor (GP- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptor) ist ein heterodimeres Glykoprotein auf der Thrombozytenmembran. Ihm kommt die Schlüsselfunktion in der Thrombozytenaggregation zu. Nach Aktivierung, Adhäsion und Ausbreitung der Thrombozyten aggregieren diese über diesen Rezeptor durch Fibrinogenbrücken mit anderen Thrombozyten. Ein Defekt in diesem Rezeptor verhindert die Thrombozytenaggregation. Dieser Defekt kann entweder durch fehlende Expression oder Dysfunktion des Rezeptors entstehen. In der Aggregationsuntersuchung nach Born zeigen diese Patienten eine fehlende Aggregation mit allen Agonisten, wobei die über den Ib-IX-V-Rezeptor vermittelte Agglutination mit Ristocetin normal ist (► **Abb. 2**) [2]. Die IIb- und die IIIa-Untereinheiten des Glykoproteins sind Produkte der *ITGA2B*- und *ITGB3*-Gene [3]. Die Inzidenz einer Glanzmann-Thrombasthenie ist mit 1 : 1 000 000 eine seltene Erkrankung. In Regionen mit gehäufter Konsanguinität beträgt sie bis zu 1 : 200 000 [4]. Je nach Genotyp kann der klinische Phänotyp sehr unterschiedlich sein. Die Genoscope Study verglich den Genotyp und den Phänotyp von 76 betroffenen Familien und hat festgestellt, dass der Phänotyp sehr variabel und nicht nur vom Genotyp abhängig ist. Er scheint auch von epidemiologischen Faktoren, die das Gerinnungssystem und das vaskuläre System betreffen, abzuhängen

[5]. Vererbt wird die Erkrankung überwiegend autosomal-rezessiv, wobei auch eine autosomal-dominante Vererbung möglich ist. Die autosomal-dominante Variante ist mit einer moderaten Makrothrombozytopenie und vollständigem Funktionsverlust beschrieben [3].

Bernard-Soulier-Syndrom (BSS)

Der GP-Ib-IX-V-Rezeptor ist Mitinitiator der Thrombozytenaktivierung. Er ist in der Lage, den Von-Willebrand-Faktor unter starkem Scherstress zu binden. Mit seinem transmembranösen Teil des GP Iba ist er mit Filamin A des Zytoskeletts verbunden und spielt damit eine wichtige Rolle bei der Megakaryopoese und Proplatelet-Formation [6]. Typisch für die Erkrankung sind Riesenthrombozyten (und Thrombozytopenie), die mit Giemsa normal gefärbt sind. In der Aggregometrie zeigen BSS-Patienten eine fehlende Agglutination mit Ristocetin. Vier Gene sind verantwortlich für die Untereinheiten des Rezeptors. Im *GP1BA*-Gen (GP1b α) und im *GP1BB*-Gen (GP1b β) finden sich je 28% der beschriebenen pathogenen Mutationen, wogegen die meisten (44%) pathogenen Mutationen im *GP9*-Gen (GP IX) gefunden werden. Im *GP5*-Gen (GP V) sind bisher keine Mutationen beschrieben, die ein Bernard-Soulier-Syndrom verursachen [7]. Die beschriebene Häufigkeit beträgt auch hier 1 : 1 000 000 [8] mit einer höheren Prävalenz in Regionen mit Konsanguinität [9].

Von-Willebrand-Erkrankung vom Plättchentyp

Bestimmte Mutationen im *GP1BA*-Gen können zu einer gesteigerten Affinität des Ib-IX-V-Rezeptors zum Von-Willebrand-Faktor führen. Die Erkrankung wird dann auch als „Von-Willebrand-Erkrankung vom Plättchentyp“ bezeichnet. Es kommt durch die gesteigerte Bindung der Thrombozyten an den Von-Willebrand-Faktor zu einer milden Thrombozytopenie mit vergrößerten Thrombozyten. In der Aggregometrie kommt es, wie auch beim Von-Willebrand-Syndrom Typ IIb, zu einer gesteigerten Agglutination bereits bei niedriger Konzentration von Ristocetin. Nur ein Plasmatauschversuch, bei dem das Plasma eines gesunden Probanden verwendet wird, führt hier zur richtigen Diagnose [10, 11]. Beim Von-Willebrand-Typ IIb liegt der Defekt im Von-Willebrand-Faktor selbst. Wenn nur das Plasma ausgetauscht wird, zeigten die Thrombozyten des Patienten mit gesundem Probandenplasma ein normales Agglutinationsverhalten.

Glykoprotein-VI-Defekt

Der Glykoprotein-VI-Rezeptor bindet sowohl Kollagen als auch Laminin. Er ist eng mit dem FcR γ -Rezeptor assoziiert und seine Funktionalität erfordert eine Vielzahl von Signaltransduktionskaskaden. Defekte im Rezeptor führen zu einer eingeschränkten Aggregationsantwort nach Induktion mit Kollagen oder mit GP-VI-spezifischen Agonisten wie z. B. dem Schlangengift Convulxin. Neben dem angeborenen Rezeptordefekt können auch Autoantikörper gegen GP VI zu einer Funktionseinschränkung mit Blutungsneigung führen [12]. Die Diagnostik dieser Autoantikörper ist jedoch schwierig, da kommerzielle Teste sie nicht erfassen.

Granuladefekte

Die Exozytose (Freisetzung) von Granula ermöglicht es den Thrombozyten, mit ihren Oberflächenrezeptoren ihre volle Wirkung in der primären Hämostase zu entfalten. Die Thrombozyten besitzen 3 Ar

► **Tab. 1** Zusammenfassung der wichtigsten thrombozytären Erkrankungen sortiert nach dem zugrunde liegenden Defekt.

Erkrankung	molekulare Pathogenese	Aggregometrie	Durchflusszytometrie	weitere Diagnostik
Rezeptordefekte				
Glanzmann-Thrombasthenie	fehlende Expression bzw. Dysfunktion des GP IIb/IIIa	ausgebliebene Aggregation mit allen Agonisten außer Ristocetin	GP-IIb/IIIa-Komplex nicht nachweisbar bzw. vermindert	IB, IF, genetische Testung
Bernard-Soulier-Syndrom	verminderte Expression bzw. Dysfunktion des GP Ib-IX-V	ausgebliebene Agglutination mit Ristocetin	GP-Ib-IX-V-Komplex nicht nachweisbar bzw. vermindert	IB, IF, genetische Testung
Plättchentyp von Willebrand	gesteigerte Affinität des GP-Ib-IX-V-Rezeptors zum Von-Willebrand-Faktor	gesteigerte Agglutination mit Ristocetin in niedriger Konzentration	gesteigerter Bindungsnachweis des Von-Willebrand-Faktors an den GP-Ib-IX-V-Komplex	genetische Testung
Kollagenrezeptordefekt	fehlende Expression bzw. Funktion des GP Ia/IIa oder GP VI	ausgebliebene oder eingeschränkte Aggregation nach Induktion mit Kollagen, CRP oder Convulxin	GP-Ia/IIa-Komplex oder GP VI nicht nachweisbar bzw. vermindert	IB, IF, genetische Testung
Granuladefekte				
α -Granula-Defekt (Grey-Platelet-Syndrom, GFI1B-Defekt, Paris-Trousseau-Syndrom)	fehlende α -Granula, Störung der Freisetzung beim Grey-Platelet-Syndrom und GFI1B-Defekt, oder vergrößerte α -Granula mit gestörter Freisetzung beim Paris-Trousseau-Syndrom	kein einheitliches Muster	vermindert Expression von CD62 nach Aktivierung, jedoch sehr variabler Phänotyp	Blutausstrich, IF, genetische Testung, Nachweis von CD34 auf den Thrombozyten in der IF beim GFI1B-Defekt
δ -Granula-Defekte (z. B. Hermansky-Pudlak-Syndrom, Chediak-Higashi-Syndrom)	fehlende δ -Granula bzw. Störung von deren Freisetzung	verminderte Aggregation mit ADP, fehlende bzw. verzögerte 2. Phase, Desaggregation, kein einheitliches Muster	verminderte Expression von CD63 nach Aktivierung	ATP-Freisetzung, Mepacrin-Test, IF, EM, genetische Testung
α - δ -Granula-Defekte	fehlende α - und δ -Granula bzw. Störung bei deren Freisetzung	kein einheitliches Muster	verminderte Expression von CD62 und CD63 nach Aktivierung, jedoch sehr variabler Phänotyp	Blutausstrich, IF, EM, Mepacrin-Test, ATP-Freisetzung, genetische Testung
Transkriptionsfaktordefekte				
familiäre Thrombozytopenie mit maligner Assoziation	Mutationen im RUNX1	kein einheitliches Muster	unauffällig	Nachweis von MYH10 in den Thrombozyten, IF, IB, genetische Testung
FLI1-assoziierter Granuladefekt	Defekt im FLI1	kein einheitliches Muster	unauffällig	Nachweis von MYH10 in den Thrombozyten, IF, IB, genetische Testung
GATA1-Defekt	Defekt im GATA1 führt zu einer Thrombozytopenie und einer Dyserythropoese	kein einheitliches Muster	unauffällig	Blutausstrich (Makrothrombozytopenie), genetische Testung
ETV6	Defekt im ETV6 führt zur einer geringgradigen Thrombozytopenie	kein einheitliches Muster	unauffällig	Nachweis von ETV6 in den Thrombozyten, IF, IB, genetische Testung
Signaltransduktionsdefekte				
G-Protein-Defekte	je nach G-Protein Einschränkungen im Thrombinrezeptor (PAR-1, PAR-4), ADP-Rezeptor (P2Y1 und P2Y12), Thromboxanrezeptor, Epinephrinrezeptor, Serotoninrezeptor	kein einheitliches Muster	kein einheitliches Muster	genetische Testung
Phospholipasedefekt	Defekt der zytosolischen Phospholipase A2 α oder der Phospholipase C	kein einheitliches Muster	kein einheitliches Muster	genetische Testung
Aspirin-like-Defekt	Störung des Cyclooxygenasewegs (Störungen des COX-1-Enzyms oder der Thromboxansynthetase)	ausgebliebene Aggregation mit Arachidonsäure, ggf. gestörte 2. Phase mit ADP	unauffällig	Thromboxan-A ₂ -Bestimmung, genetische Testung

fortgesetzt

► **Tab. 1** Fortsetzung

Erkrankung	molekulare Pathogenese	Aggregometrie	Durchflusszytometrie	weitere Diagnostik
Defekte im Zytoskelett				
Wiskott-Aldrich-Syndrom	Mikrothrombozytopenie, Infektneigung, Ekzeme	normal	normal	Blutausstrich, genetische Testung
Filamin-A-Defekt	Makrothrombozytopenie	gestörte Aggregation nach Induktion mit Convulxin	normal	IF (nur ein Teil der Thrombozyten besitzt kein Filamin A)
MYH9-assoziierte Erkrankung	Makrothrombozytopenie	fehlendes Shape Change nach Induktion mit Kollagen, ansonsten weitgehend normale Aggregationsantwort	normal	IF (Einschlusskörperchen in den neutrophilen Granulozyten)
β 1-Tubulin-Defekt	Mutation im <i>TUBB1</i> -Gen, Makrothrombozytopenie	weitestgehend normale PLT-Funktion	normal	IF (keine Ringform in den Thrombozyten)
Defekte in der Phospholipidmembran				
Scott-Syndrom	gestörte Expression der negativ geladenen Phospholipide der aktivierten Thrombozyten	normal	eingeschränkte Annexinbindung	verringertes Thrombingenerierungspotenzial
Stormorken-Syndrom	gesteigerte Expression der negativ geladenen Phospholipide bei ruhenden Thrombozyten	normal	gesteigerte Annexinbindung	gesteigertes Thrombingenerierungspotenzial
ADP: Adenosindiphosphat; ATP: Adenosintriphosphat; CRP: Collagen-related Peptide; EM: Elektronenmikroskopie; IB: Immunoblot; IF: Immunfluoreszenzmikroskopie; PLT: Platelet (Thrombozyt)				

ten von Granula (α - und δ -Granula und Lysosomen, ► **Abb. 1 a**). Ein Thrombozyt beinhaltet ca. 50–80 α -Granula mit einem Durchmesser von 200–500 nm und speichert in diesen exogene Proteine wie z. B. PF4, Faktor V, Von-Willebrand-Faktor, P-Selektin, Thrombospondin [13]. Die dichten Granula, auch δ -Granula genannt, sind mit 100–150 nm kleiner und mit 3–8 Granula pro Thrombozyt deutlich seltener als die α -Granula. Sie beinhalten unter anderem membranständiges CD63 und lösliche Komponenten wie ATP, Kalzium, Serotonin und LAMP 2. Die Lysosomen besitzen im Wesentlichen Hydrolasen, LAMP 1 und LAMP 2, aber auch CD63 ist hier zu finden [14]. Es ist eine Vielzahl von unterschiedlichen Granuladefekten beschrieben.

Grey-Platelet-Syndrom

Das Grey-Platelet-Syndrom ist eine Erkrankung, die mit einer Makrothrombozytopenie und in der Lichtmikroskopie blass erscheinenden Thrombozyten verbunden ist. Ursächlich sind Mutationen im *NBEAL2*-Gen [15]. Je nach Mutation fallen manche Patienten zusätzlich durch eine Myelofibrose und einen erhöhten Vitamin-B₁₂-Plasmaspiegel auf. Die α -Granula-Inhaltsstoffe Fibrinogen, vWF und P-Selektin sind reduziert [16].

GF1B-Mutation – Grey-Platelet-like-Defekt

Mutationen im *GF1B*-Gen führen ebenfalls zu einer Makrothrombozytopenie mit blassen Thrombozyten. Die Patienten haben ebenfalls reduzierte α -Granula-Inhaltsstoffe. Der Reifungsmarker CD34 bleibt jedoch auf den Thrombozyten erhalten [17, 18].

Paris-Trousseau-Syndrom

Auch das Paris-Trousseau-Syndrom mit einer Deletion im Chromosom 11q23 führt zu einer Störung in den α -Granula. Der klinische Phänotyp des Paris-Trousseau-Syndroms variiert von einer mäßigen

bis zu einer schweren Thrombozytopenie mit Riesen- α -Granula, die nur eingeschränkt in der Lage sind, ihre Inhaltsstoffe freizusetzen. Die Patienten zeigen eine pathologische Aggregationsantwort auf Kollagen, Adenosindiphosphat (ADP) und Epinephrin [19].

Arthrogrypose-Nierenfunktionsstörung-Cholestase-Syndrom (ARC-Syndrom)

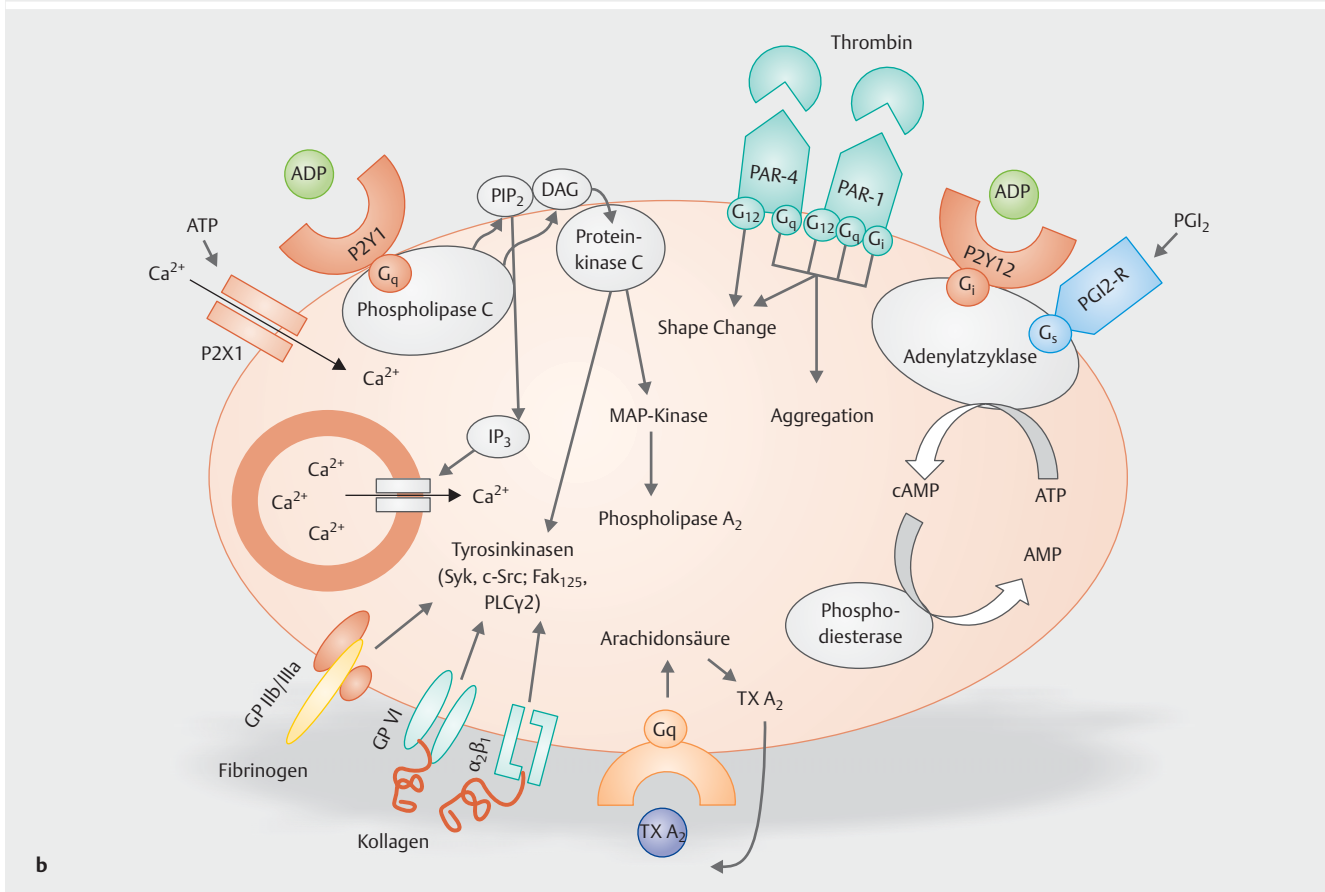
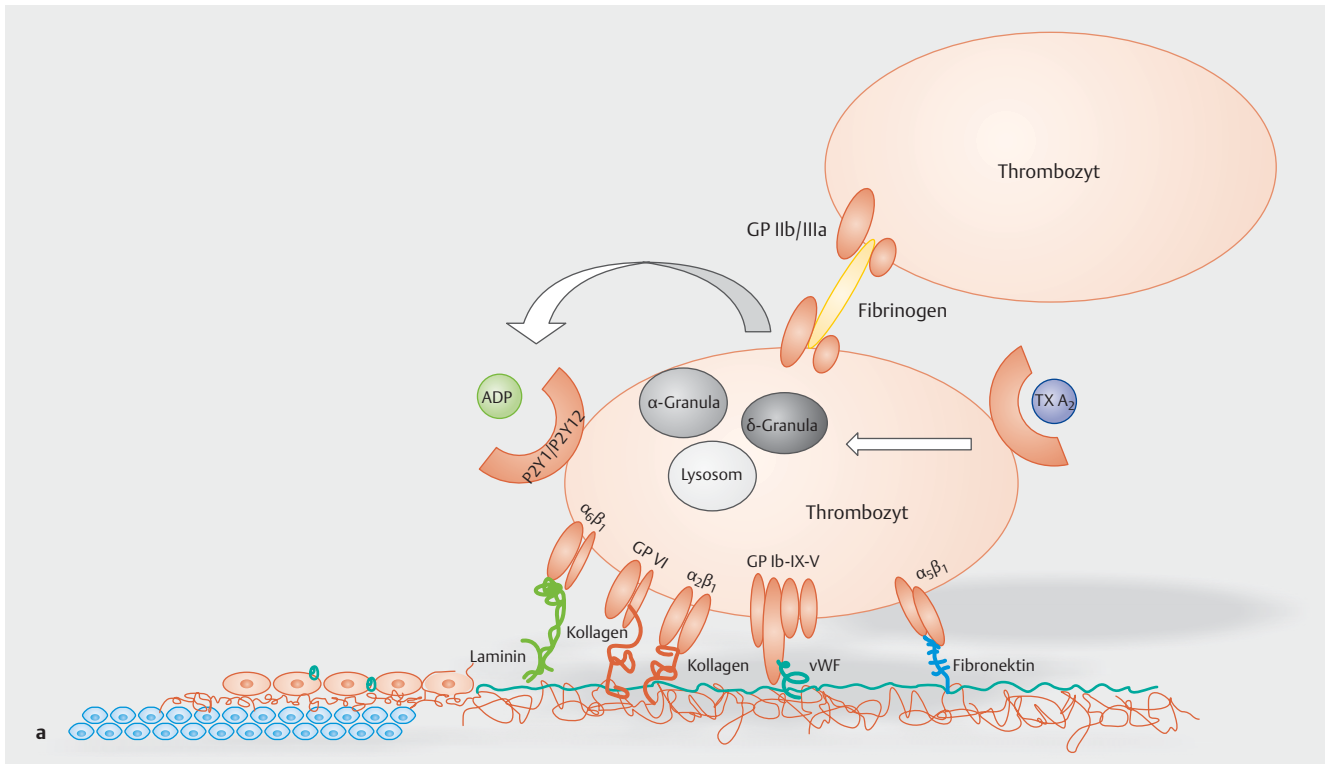
Ein weiterer „grey platelet-like defect“ ist bei Patienten mit ARC-Syndrom zu finden. Charakteristisch für dieses Syndrom ist eine Arthrogryposis (Gelenksteife), Nierenfunktionseinschränkung und Cholestase. Auch hier kommt es durch eine Mutation im *VPS33B*- oder *VIPAS39*-Gen zu einer Reduktion der α -Granula. Über die Erkrankung ist ansonsten wenig bekannt, da die meisten Kinder in den ersten Lebensjahren versterben [20].

Hermansky-Pudlak-Syndrom

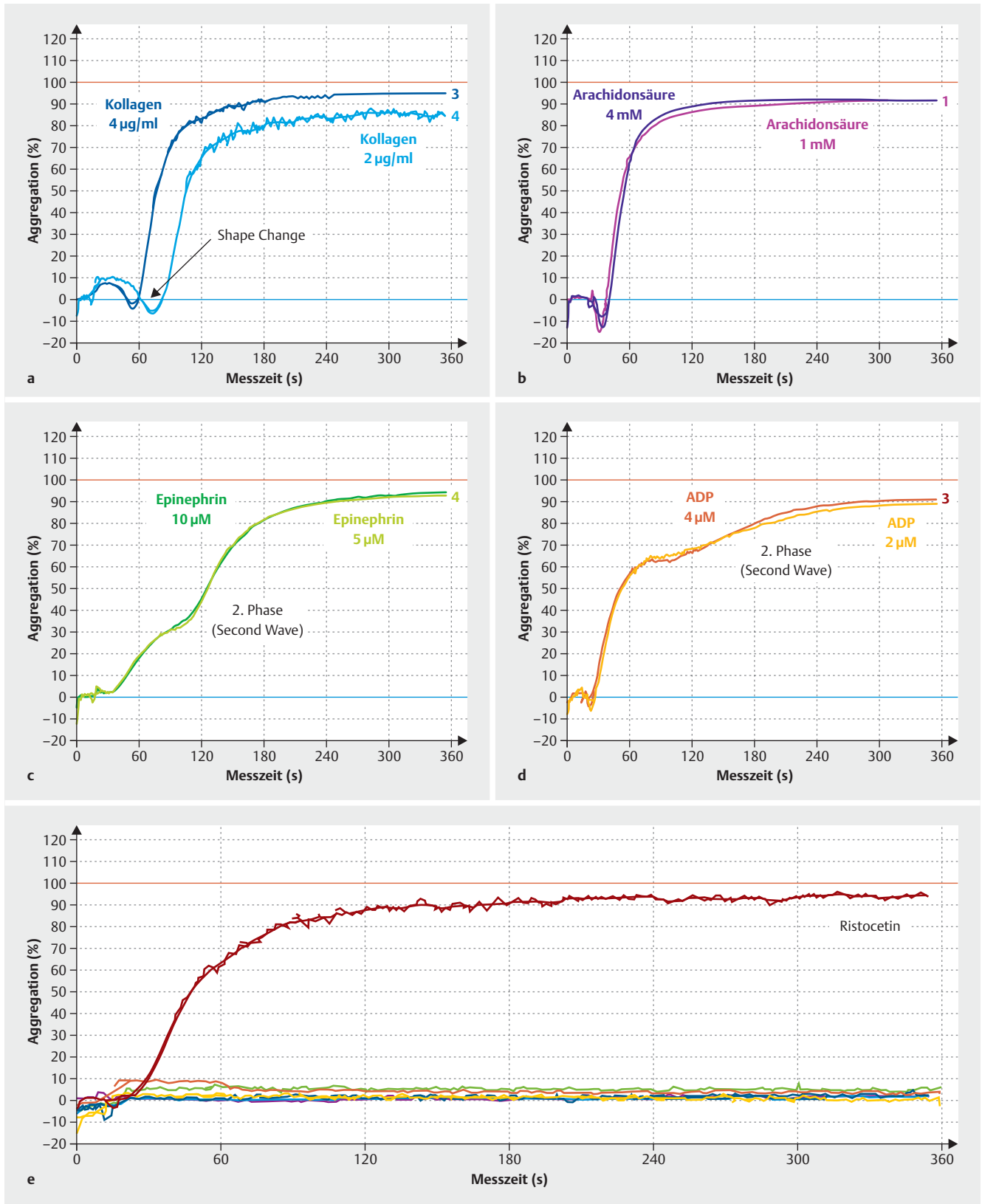
Beim Hermansky-Pudlak-Syndrom kommt es zu einer Einschränkung in den δ -Granula. Weitere klinische Manifestationen sind ein okulokutaner Albinismus mit Nystagmus, eine moderate bis schwere Blutungsneigung und in manchen Fällen kann es zur Lungenfibrose kommen. In der Aggregometrie nach Born zeigt sich bei diesen Patienten eine eingeschränkte Aggregation nach Induktion mit Kollagen, Epinephrin und ADP, da die löslichen Verstärkerkomponenten aus den δ -Granula fehlen. Ursächlich kann eine Mutation in 9 verschiedenen Genen sein. Die Thrombozyten der Patienten zeigen eine reduzierte Ausschüttung von ATP in der Luminoaggregometrie [21].

Chediak-Higashi-Syndrom

Beim Chediak-Higashi-Syndrom kommt es neben dem okulokutanen Albinismus auch noch zur schweren Immundefizienz mit einer progressiven neurologischen Dysfunktion. Eine Mutation im *LYST*-



► **Abb. 1** Der Thrombozyt (a) mit seinen Rezeptoren und den komplexen intrazellulären Signalkaskaden (b), die die komplexe Interaktion zwischen Thrombozyten und Endothel sowie zwischen Thrombozyten untereinander steuern. ADP: Adenosindiphosphat; ATP: Adenosintriphosphat; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; Gi: inhibitorisches G-Protein; Gs: cAMP-abhängiges G-Protein; Gq: Phospholipase-C-gekoppelte G-Proteine; IP₃: Inositol-1,4,5-Trisphosphat; PLCy2: Phospholipase C Gamma 2; TX A₂: Thromboxan A₂; vWF: Von-Willebrand-Faktor.



► **Abb. 2** Lichttransmissionsaggregometrie eines gesunden Spenders mit den Agonisten Kollagen (a), Arachidonsäure (b), Epinephrin (c) und ADP (d). e Typische Lichttransmissionsaggregometrie bei einem Patienten mit Glanzmann-Thrombasthenie. Der Patient zeigt eine normale Agglutination mit Ristocetin, während die Thrombozyten nach Induktion mit allen anderen Agonisten nicht aggregieren.

Gen führt zum δ -Granula-Defekt. Die meisten Patienten erkranken aufgrund des Immundefekts an einer lymphoproliferativen Erkrankung. Die Thrombozyten haben einen ähnlichen Phänotyp wie die Thrombozyten von Patienten mit Hermansky-Pudlak-Syndrom. Auch hier fällt in der Aggregometrie nach Born eine verminderte Aggregationsantwort bei den Agonisten Kollagen, Epinephrin und ADP auf [22].

SLFN14-Gen-Defekt

Mutationen im *SLFN14*-Gen verursachen eine Thrombozytopenie mit deutlicher Reduktion der dichten Granula. Die Patienten zeigen eine reduzierte Aggregationsantwort auf Thrombin Receptor-activating Peptide (TRAP), ADP und Kollagen [23].

Kombinierte α - δ -Granula-Defekte

Kombinierte Defekte in den α - und δ -Granula können die verschiedensten Ursachen haben. Nicht selten ist der genetische Defekt unbekannt. Betroffene Familien weisen häufig eindeutige autosomal-dominante oder -rezessive Vererbungsmodi auf. Jedoch ist das verantwortliche Gen häufig unbekannt [8, 24].

Transkriptionsfaktordefekte

Transkriptionsfaktoren werden in Thrombozyten benötigt, um die Megakaryopoese und die Thrombozytenproduktion zu steuern. Bisher konnten die Transkriptionsfaktoren Runx-related Transcription Factor 1 (*RUNX1*), GATA-binding Protein 1 (*GATA-1*), Friend Leukemia Integration 1 (*FLI1*), Growth Factor Independent 1B (*GFI1B*) und ETS Variant 6 (*ETV6*) mit Thrombozytopenie und unterschiedlich stark ausgeprägter Blutungsneigung in Verbindung gebracht werden. Der *GFI1B*-Defekt führt außerdem zu dem bereits oben beschriebenen α -Granula-Defekt (Grey-Platelet-like-Defekt).

RUNX1-assozierte Thrombozytopenie

In der Megakaryopoese reguliert der Transkriptionsfaktor *RUNX1* die Expression von nicht muskulärem Myosin IIB (*MYH10*). Diese Herunterregulation ist notwendig, um von der Mitose zu Endomitose in der Reifung der Megakaryozyten zu wechseln. Ein Persistieren von *MYH10* in den Thrombozyten ist ein möglicher diagnostischer Marker bei diesen Patienten, die klinisch mit einer familiären Thrombozytopenie und Prädisposition zur AML auffallen [25, 26].

GATA-1-assozierte Thrombozytopenie/Thrombozytopathie

Der Transkriptionsfaktor *GATA-1* ist neben seiner Funktion in den Megakaryozyten auch für die Erythrozytenreifung verantwortlich. Er kommt außer in diesen Zellen auch noch in Mastzellen und eosinophilen Granulozyten vor. Das verantwortliche Gen *GATA1* liegt auf dem X-Chromosom an der Position Xp11.23. Klinisch kommt es bei Mutationen im Transkriptionsfaktor *GATA-1* zu einer Makrothrombozytopenie mit einer Dyserythropoese. *GATA-1* ist funktionell eng mit den Transkriptionsfaktoren *RUNX1* und *FLI1* verbunden [26, 27].

FLI1-assozierte Thrombozytopenie/Thrombozytopathie

Neben dem Transkriptionsfaktor *RUNX1* führt auch *FLI1* zu einem Persistieren von *MYH10*. Das Persistieren von nicht muskulärem Myosin IIB kann auch hier als möglicher Marker auf den Thrombozyten verwendet werden. Ein Verlust oder ein Defekt von *FLI1* kann

zu unterschiedlichen Syndromen führen. Das bereits weiter oben beschriebene Paris-Trousseau-Syndrom ist eines davon. Plättchen aus Megakaryozyten von Mäusen mit *FLI1*-Defekten zeigen eine reduzierte Überlebenszeit und eine eingeschränkte Funktionalität [28]. *FLI1*-Varianten können zur Thrombozytopenie und verschiedenen Granuladefekten führen. Giant- α -Granula und fehlende δ -Granula sind beschrieben. Diese führen zu den charakteristischen funktionellen Defekten wie Desaggregation nach Stimulation mit niedrig dosiertem ADP, Kollagen und TRAP sowie einer gestörten ATP-Sekretion, einer reduzierten Mepacrin-Aufnahme und einer reduzierten CD63-Expression nach TRAP-Stimulation [29].

ETV6-assozierte Thrombozytopenie/Thrombozytopathie

Patienten mit einer *ETV6*-Mutation fallen meist durch eine milde Thrombozytopenie auf. Es liegen keine vergrößerten Thrombozyten vor und die Funktion ist nur geringfügig eingeschränkt. *ETV6* kann auch als Marker für die Erkrankung selbst verwendet werden. Die *ETV6*-Mutation ist ein Risikofaktor für die Entwicklung einer akuten lymphatischen Leukämie [30].

Signaltransduktionsdefekte

Signaltransduktionsdefekte können auf verschiedene G-Proteine in Thrombozyten zurückgeführt werden. Auch ein Defekt des Phosphatidylinositolmetabolismus kann ursächlich für Signaltransduktionsdefekte sein. Wenn z. B. eine Tyrosinkinase nicht in der Lage ist, Proteine zu phosphorylieren und damit zu aktivieren oder zu inhibieren, kann die Thrombozytenfunktion erheblich gestört sein. Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren werden vor allem in der Aktivierung und Rekrutierung weiterer Thrombozyten benötigt. G-Proteine sind mit gebundenem Guanosindiphosphat (GDP) inaktiv. Bindet jedoch Guanosintriphosphat (GTP) an die Untereinheit des G-Proteins, werden diese aktiviert. Es gibt sowohl inhibitorische G-Proteine als auch aktivierende G-Proteine [31]. Zu den Rezeptoren gehören die Thrombinrezeptoren (protease-aktivierte Rezeptoren) PAR-1 und PAR-4 sowie die ADP-Rezeptoren P2Y1 und P2Y12, der Thromboxanrezeptor, der Epinephrinrezeptor und der Serotoninrezeptor. Die G-Proteine triggern wiederum die Phospholipase (PLC), die wichtige Second Messenger wie Inositol-1,4,5-Triphosphat und Diacylglycerol (DAG) in Thrombozyten freisetzt und so das zytosolische Kalzium erhöht [32, 33].

Aspirin-like-Defekt

Der sogenannte Aspirin-like-Defekt führt ebenfalls zu einer gestörten Thrombozytenfunktion. Das Aggregationsmuster entspricht dem Aggregationsmuster nach Einnahme von Aspirin. Die 2. Phase der Aggregationsantwort nach Induktion mit ADP und Kollagen ist erniedrigt. Die Aggregationsantwort nach Zugabe des Agonisten Arachidonsäure fehlt vollständig [34]. Es können Defekte im Rezeptor, in der zytosolischen Phospholipase A₂, in der Cyclooxygenase 1, in der Thromboxansynthese, in der Phospholipase C oder in der Tyrosinphosphorylierung zum klinischen Phänotyp führen [24].

Zytoskelettdefekte

Defekte im Zytoskelett verursachen in der Regel eine Thrombozytopenie. Dabei sind sowohl eine Mikrothrombozytopenie als auch eine Makrothrombozytopenie möglich. Der X-chromosomale Defekt, das Wiskott-Aldrich-Syndrom, ist charakterisiert durch eine

Thrombozytopenie mit besonders kleinen Thrombozyten, Ekzemen und Immundefizienz. Ursächlich ist eine Mutation im WAS-Gen, die zu einer gestörten F-Aktin-Polymerisation führt und so das komplexe klinische Syndrom verursacht [35]. Bei den Zytoskelettdéfekten im Filamin A, β 1-Tubulin und MYH9-assoziierten Erkrankungen kommt es zu einer Makrothrombozytopenie. Diese führen zu einer verschlechterten Gerinnselretraktion und einer Thrombusinstabilität [36, 37].

Membranphospholipiddefekte

Bei der Aktivierung von Thrombozyten kommt es zur Expression von negativ geladenen Phospholipiden. Diese sind notwendig, um Thrombin auf der Oberfläche zu generieren. Patienten mit dem sogenannten Scott-Syndrom sind nicht in der Lage, diese negativ geladenen Oberflächen zu präsentieren und damit genügend Thrombin für eine suffiziente Gerinnung zu produzieren. Die Thrombozyten sind sonst funktionell intakt, aber nicht in der Lage, die primäre Hämostase mit der sekundären Hämostase zu verknüpfen. Bei den Thrombozyten beobachtet man eine gestörte Annexinbindung oder ein deutlich reduziertes Thrombingenerierungspotenzial [38]. Dagegen kommt es beim Stormorken-Syndrom zu einer erhöhten Präsentation von negativ geladenen Phospholipiden. Dieses führt zu einer gesteigerten Aktivierung. Bereits unstimulierte Thrombozyten tragen vermehrt Annexin V, PAC-1, P-Selektin und CD63 auf ihrer Oberfläche [39].

Die Diagnostik der Thrombozytenfunktionsstörung

Eine gute Hilfestellung bietet die erst kürzlich aktualisierte AWMF-Leitlinie zur Diagnose von Thrombozytenfunktionsstörungen und Thrombozytopathien.

Blutungsanamnese

Es gibt eine Vielzahl von Gerinnungsfragebögen zur Erfassung der Blutungsanamnese. Durch eine strukturierte Anamnese lässt sich z. B. das Von-Willebrand-Syndrom sicher erfassen. Einer dieser Fragebögen ist der ISTH-Bleeding-Score. Er wird aktuell sowohl für Kinder als auch Erwachsene eingesetzt. Nicht sicher erfassen lassen sich dagegen die thrombozytären Erkrankungen [40, 41].

Labordiagnostik

Präanalytik

Die Thrombozytenkonzentration im peripheren Blut ist ein wegweisender Parameter bei der Thrombozytendiagnostik und wird bei jedem kleinen Blutbild mitbestimmt. Während der Blutentnahme sollte die Aktivierung von Thrombozyten vermieden werden, indem auf Stauung der Venen verzichtet wird. Bei der Untersuchung der Thrombozytenfunktion ist die Präanalytik sehr entscheidend. So sollten die Röhrchen nicht in der Kälte bzw. im Kühlschrank gelagert werden, sondern bei Raumtemperatur transportiert werden. Innerhalb von 4 h nach Blutentnahme sollten Thrombozytenfunktionsuntersuchungen abgeschlossen sein [42]. Thrombozyten besitzen keinen Kern und haben nur limitierte Fähigkeiten zur De-novo-Proteinsynthese. Medikamente, wie Azetylsalizylsäure, hemmen daher die Enzyme der Thrombozyten

irreversibel für den Rest ihrer Lebensdauer. Deswegen sollten Ärzte gezielt nach Einnahme von Medikamenten, wie Azetylsalizylsäure, Indomethacin oder anderen nicht steroidalen Antirheumatika fragen, da Patienten diese Medikation oft nicht als „Medikamente“ betrachten. Aber auch Arzneimittel wie Antibiotika, verschiedene kardiovaskuläre Medikamente oder auch Psychopharmaka können die Thrombozytenfunktion beeinflussen und zu einer abnormalen Thrombozytenfunktion führen [43].

Dementsprechend sollten Patienten für eine optimale Thrombozytenfunktionstestung 7–10 Tage vorher keines dieser Medikamente eingenommen haben.

Pseudothrombozytopenie

Bestimmte Antikoagulanzen wie z. B. EDTA oder Zitrat, die schon als konzentrierte Lösungen in den Blutentnahmeröhrchen vorbefüllt sind, können mit Rezeptoren auf der Oberfläche der gepressten Thrombozyten interagieren. Bei EDTA kommt es zu einer Konformationsänderung des IIb/IIIa-Rezeptors auf den Thrombozyten, die ein kryptisches Epitop freigibt. Besitzt der Patient Autoantikörper gegen dieses Epitop, kommt es zur Pseudothrombozytopenie [44]. Dies ist nicht ungewöhnlich, wenn EDTA-Röhrchen benutzt werden. Solch eine Pseudothrombozytopenie (► **Abb. 3 a**) lässt sich durch den Nachweis normaler Thrombozytenzahlen im Zitratblut oder Heparinblut oder durch den Nachweis von Thrombozytenaggregaten im gefärbten Blutausschrieb bestätigen bzw. ausschließen.

Screeningmethoden

Wenn Screeningtests wie z. B. PFA-100 oder VerifyNow eine Blutgerinnungsstörung erkennen lassen, müssen vor allem bei einer verlängerten Verschlusszeit nicht thrombozytäre Gründe (z. B. Von-Willebrand-Syndrom, niedrige Hämatokritwerte, Medikamente) ausgeschlossen werden. Die Screeningstests spielen aufgrund der niedrigen Sensitivität und Spezifität eine untergeordnete Rolle bei der Diagnose von Thrombozytenfunktionsstörungen [45].

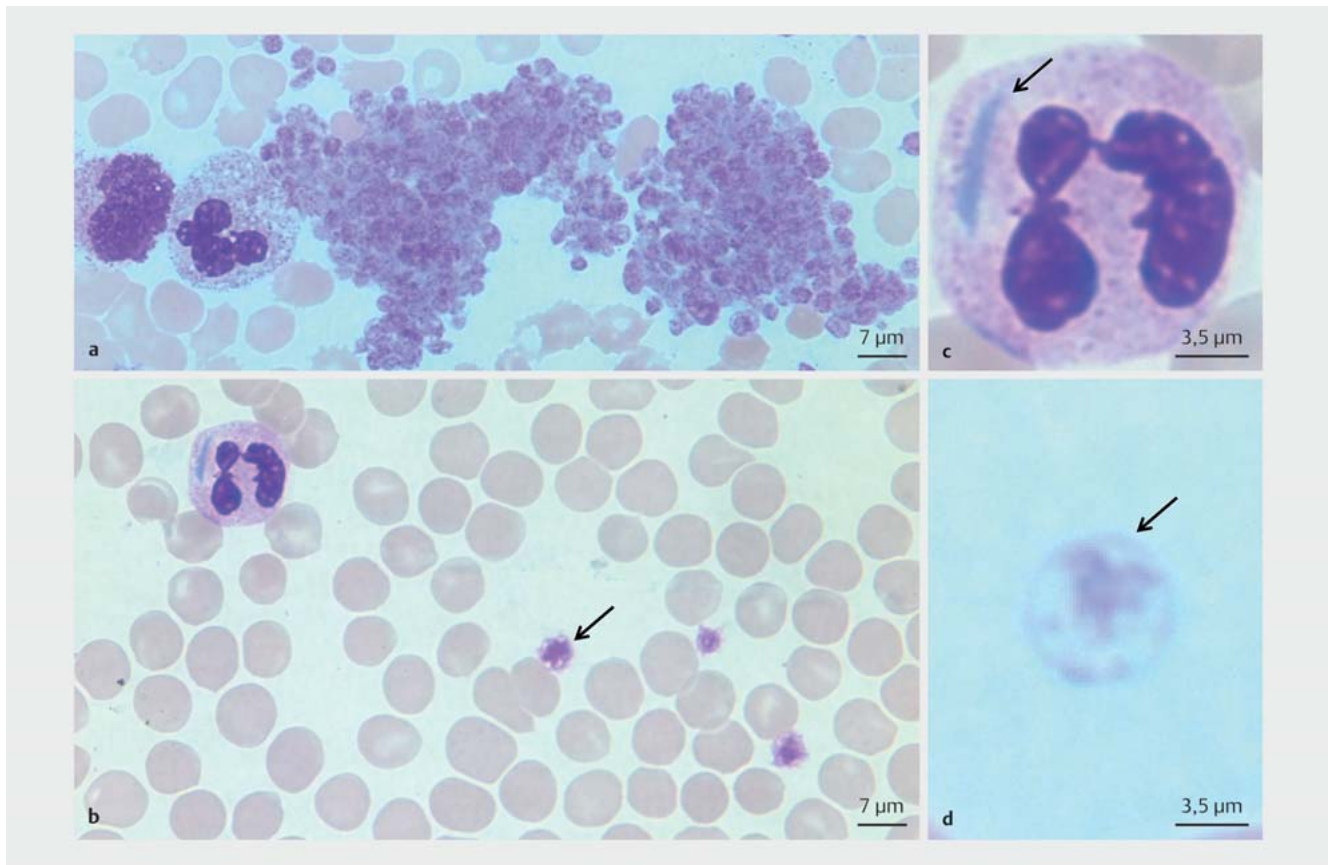
Erste Untersuchungen zur Eingrenzung der Diagnose

Besteht bei persistierender Thrombozytopenie/Thrombozytopathie oder bei auffälliger Familienanamnese mit mehreren betroffenen Familienmitgliedern der Verdacht auf eine angeborene Thrombozytopenie mit Thrombozytopathie, sind das mittlere Thrombozytenvolumen (MPV) und der einfache Blutausschrieb oft wegweisend für die richtige Diagnose.

Ein MPV oberhalb des oberen Normwerts, oft > 13 fl (oder nicht messbar), ist typisch für eine Makrothrombozytopenie (z. B. MYH9 [Myosin heavy Chain 9], TUBB1 [β 1-Tubulin], BSS). Ist dazu die Thrombozytenverteilungskurve breitbasig oder gar mehrgipflig (► **Abb. 4**), ist die Diagnose bereits weitestgehend eingegrenzt. Ein MPV unterhalb des unteren Normbereichs kann ebenfalls auf eine hereditäre Thrombozytopenie hinweisen (z. B. Wiskott-Aldrich-Syndrom, amegakaryozytäre Thrombozytopenien) [46, 47].

Blutausschriebdiagnostik

Der nächste Schritt ist die sorgfältige Bewertung des Blutausschriebs. Hierbei sollte auf folgende Charakteristika hereditärer Thrombozytopenien geachtet werden:



► **Abb. 3** a Blutausstrich eines Patienten mit Pseudothrombozytopenie und Thrombozytenaggregaten. b Makrothrombozytopenie mit Riesenthrombozyten bei einem Patienten mit einer MYH9-assoziierten Erkrankung. c Typischer Einschlusskörper in einem Granulozyten bei einem Patienten mit einer MYH9-assoziierten Erkrankung. d Blasser Thrombozyt eines Patienten mit Grey-Platelet-Syndrom.

1. vergrößerte Thrombozyten (Makrothrombozytopenien, Riesenthrombozyten ► **Abb. 3 b**): Als Anhaltspunkt gilt, dass ca. 5 normal große Thrombozyten in einen Erythrozyten „passen“, während sie bei Makrothrombozytopenien z. T. fast so groß wie Erythrozyten sind. Bei den Makrothrombozytopenien sind die meisten Thrombozyten deutlich vergrößert. Eine sehr heterogene Thrombozytenpopulation weist auf eine gesteigerte Thrombozytenproduktion, z. B. bei ITP (idiopathische thrombozytopenische Purpura), oder eine Von-Willebrand-Erkrankung Typ IIb hin.
2. Einschlusskörper in den Granulozyten (MYH9-assoziierte Thrombozytopenien, ► **Abb. 3 c**): Hier finden sich ein oder mehrere hellblau angefärbte runde bis spindelförmige Einschlusskörperchen im Zytoplasma der Granulozyten.
3. nicht angefärbte Thrombozyten (Grey-Platelet-Syndrom, ► **Abb. 3 d**). Hier sind die Thrombozyten vergrößert und erscheinen typischerweise blass-grau.
4. vergrößerte Thrombozyten und eine Dyserythropoese (GATA-1-Mutation)
5. verkleinerte, gut anfärbare Thrombozyten (Wiskott-Aldrich-Syndrom)

Auch wenn die weiterführenden Untersuchungen spezialisierten Laboren vorbehalten sind, ist dann bereits der wichtigste Schritt erfolgt, nämlich die richtige Weichenstellung zur Vermeidung un-

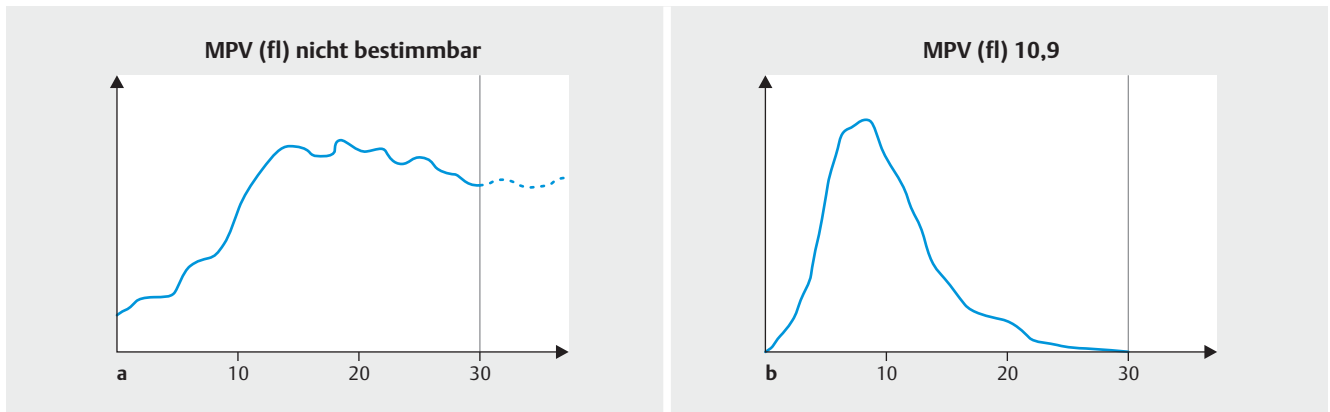
wirksamer, aber nebenwirkungsreicher Therapien aufgrund einer Fehldiagnose.

Immunfluoreszenzmikroskopie

Eine Möglichkeit, die Diagnose einzugrenzen und zumindest viele der bekannten hereditären Defekte zu erkennen, ist die Immunfluoreszenzuntersuchung des Blutausstrichs [48]. Diese beruht auf dem Nachweis der charakteristischen Fehlverteilung von Thrombozytenproteinen. Die Präanalytik ist denkbar einfach. 10–15 ungefärbte Blutausstriche (3 µl je Ausstrich) werden luftgetrocknet und können dann mit der normalen Post verschickt werden. Die Thrombozyten sind auf den Objektträgern für mehrere Tage stabil. Die eigentliche Darstellung der thrombozytären Strukturen hingegen ist aufwendig und erfordert für jede Struktur eine speziell angepasste Fixierung bzw. Färbetechnik (► **Tab. 2, Abb. 5**).

Thrombozytenfunktionsuntersuchung

Weder die morphologische noch die genetische Untersuchung erlaubt allein eine Aussage über die Thrombozytenfunktion. Dies ist nur mit der Aggregometrie bzw. Messung der Thrombozytenaktivierung in der Durchflusszytometrie nach entsprechender Stimulierung der Thrombozyten in vitro möglich und erfordert die persönliche Vorstellung des Patienten im Speziallabor, da die Blut-



► **Abb. 4** a Patient mit vergrößerten Thrombozyten. Der Patient zeigt eine breitbasige MPV-Kurve. Eine Bestimmung des MPV ist maschinell nicht möglich. b MPV-Kurve eines gesunden Blutspenders.

probe innerhalb weniger Stunden untersucht werden muss. Bei niedrigen Thrombozytenwerten und vergrößerten Thrombozyten wird oft eine größere Menge Vollblut benötigt, um genügend Thrombozyten zu isolieren, was bei Kindern oft problematisch ist [49].

Lichttransmissionsaggregometrie (LTA)

Die Lichttransmissionsaggregometrie, auch Aggregometrie nach Born genannt, stellt den Goldstandard der Thrombozytenfunktionsuntersuchungen dar. Die Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) misst die Thrombozytenaggregation im plättchenreichen Plasma. Durch die Aggregation der Thrombozyten kommt es zu einer Steigerung der Lichtdurchlässigkeit in der Küvette. Dieses kann optisch gemessen werden (► **Abb. 2**). Die Kurven, die von der LTA abgeleitet werden, können in 3 Hauptphasen eingeteilt werden. Zunächst docken die Agonisten an die Thrombozyten an und werden dadurch geprimt. Dies führt dazu, dass die Thrombozyten von ihrer diskoiden Form in eine eher sphärische mit ausgedehnten Filopodien übergehen. Hierbei kann in der LTA ein vorübergehender kleiner Abfall der Lichtdurchlässigkeit beobachtet werden (Shape Change). Danach erfolgt die „erste Welle“, die reversible fibrinogenabhängige Aggregation. Die „zweite Welle“ zeigt die irreversible Aggregation infolge der Thromboxan-A₂-Formation und Sekretion der Granula an. Ristocetin induziert durch Konformationsänderung des Von-Willebrand-Faktors eine Bindung an GP Ib α und somit eine Thrombozytenagglutination. Diese Messung erlaubt die Diagnostik eines Bernard-Soulier-Syndroms und von Subtypen des Von-Willebrand-Syndroms. Typischerweise wird in der LTA der maximale Anstieg der Lichtdurchlässigkeit nach der Agonistenzugabe (max. % Aggregation) dokumentiert. Die gemessenen Werte werden mit denen von gesunden Probanden verglichen. Die Referenzbereiche werden in den Laboren durch Thrombozytentestungen von mehreren (mindestens 20) gesunden Spendern im jeweiligen Labor festgelegt. Die LTA ist damit unabhängig vom Hämatokrit des Patienten. Durch die dynamische Messung der verschiedenen Aggregationsphasen nach Induktion mit verschiedenen Agonisten ermöglicht die LTA eine umfassende Beurteilung der Thrombozytenfunktion. Gemäß den internationalen Empfehlungen der ISTH wird plättchenreiches Plasma bei 37°C unter Scherstress mit den in der ► **Tab. 3** [50] beschriebenen Ago-

nisten inkubiert. Daneben existieren noch eine Reihe anderer Methoden, die häufig als Screeningtests eingesetzt werden: PFA-100 und PFA-200, VerifyNow, Plateletworks und Multiplate [51]. Diese Tests sind schnell durchführbar, jedoch unspezifisch für Thrombozytendefekte. So hat sich der PFA-100 eher als sensitiv in der Diagnostik des Von-Willebrand-Syndroms [52] erwiesen. Alle Methoden, die mit Vollblut arbeiten, sind sehr empfindlich gegenüber Veränderung des Hämatokrits und der Thrombozytenzahl.

Impedanzaggregometrie

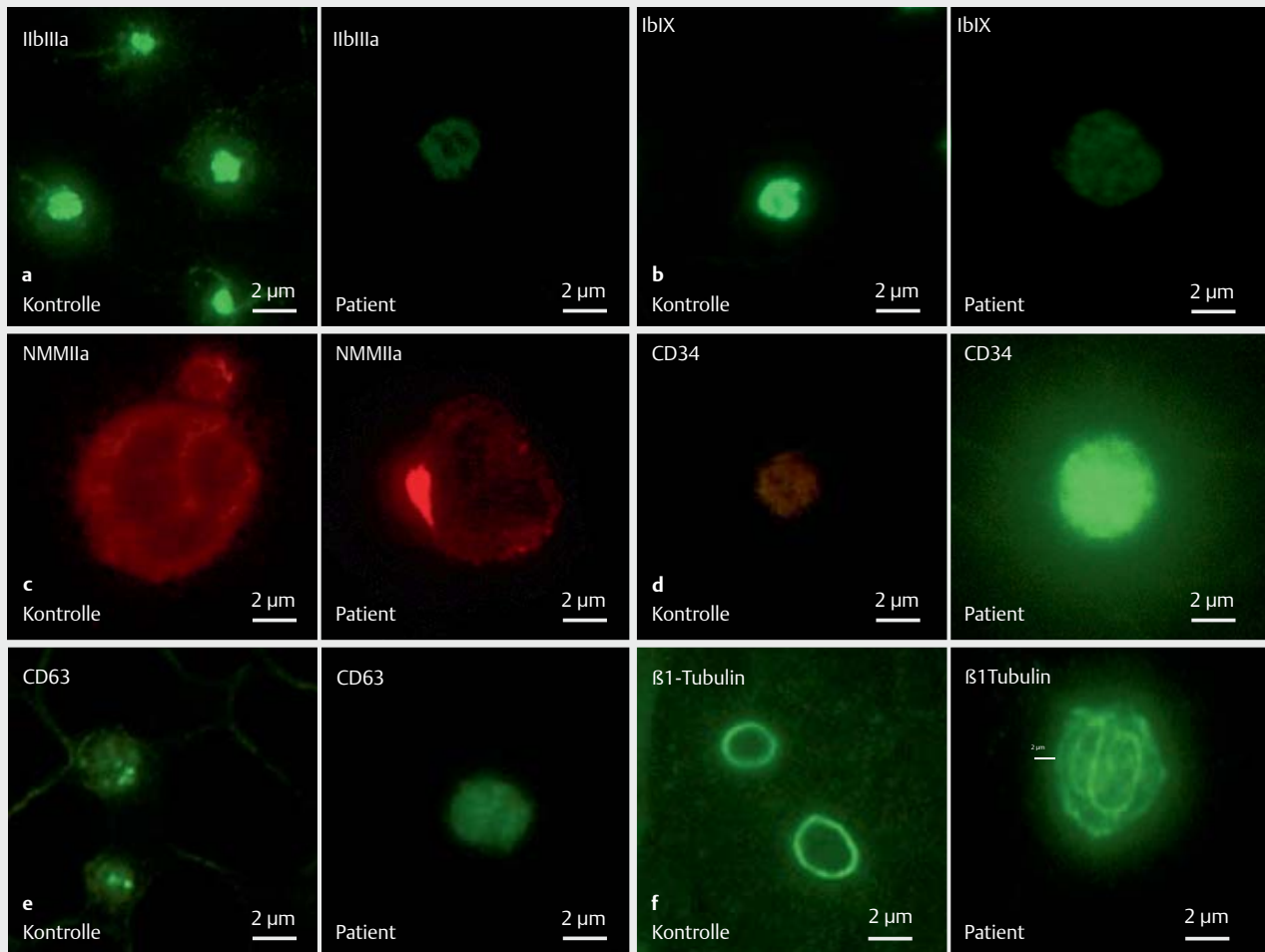
Bei der Vollblutaggregometrie wird die Veränderung der elektrischen Impedanz zwischen 2 Elektroden als Reaktion auf den Agonisten gemessen. Adhätierende Thrombozyten steigern die Impedanz. Diese wird anschließend in einer Kurve dargestellt. Die Vorteile der Methode sind der schnelle Einsatz und die direkte Messung der Probe ohne weitere Aufarbeitung. Durch diese fehlende Aufarbeitung werden kleinere Blutproben benötigt. Das Verfahren wird sowohl für die Überwachung der Arzneimittelaufnahme als auch für die Diagnostik von Thrombozytenfunktionsstörungen eingesetzt [45].

Luminoaggregometrie

Die Aggregometrie allein ist meist nicht sensitiv genug, um Patienten mit Sekretionsdefekten zu erkennen. Die Luminoaggregometrie kann hilfreich sein, diese Defekte zu erkennen, und sollte daher zusätzlich eingesetzt werden [53]. Die Luminoaggregometrie misst die Adenosintriphosphat-Freisetzung (ATP-Freisetzung) aus den Thrombozyten nach Zugabe eines Induktors, indem ein Luciferin-Luciferase-Reagens hinzugefügt wird. Dieses fluoresziert in Anwesenheit von ATP [54]. Eine niedrige ATP-Freisetzung kann entweder einen Speichergranuladefekt oder einen Freisetzungdefekt darstellen. Versetzt man die Thrombozyten mit Ionophore, so wird das gesamte ATP freigesetzt und eine Sekretionsstörung kann von einer Störung der Speichergranula unterschieden werden.

Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine weitere Methode, mit der thrombozytäre Erkrankungen diagnostiziert werden können. Um die Expression der Membranglykoproteine (GP Ib-IX-V und GP IIb/



► **Abb. 5** Typische Immunfluoreszenzbefunde von Patienten mit Glanzmann-Thrombasthenie (a), Bernard-Soulier-Syndrom (b), MYH9-assoziiierter Erkrankung (c), GFI1B-Defekt (d), Hermansky-Pudlak-Syndrom (e), β 1-Tubulin-Defekt (f).

IIla) zu quantifizieren, werden spezifische monoklonale Antikörper, die mit Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, verwendet. Die gemessene Fluoreszenzintensität ist proportional zur Dichte der Glykoproteinkomplexe und kann mit der von gesunden Spendern verglichen werden. Auch quantitative Veränderungen des Kollagen- (GP VI, Integrin $\alpha_2\beta_1$), Fibronektin- (Integrin $\alpha_5\beta_1$) oder Lamininrezeptors (Integrin $\alpha_6\beta_1$) können mitbestimmt werden.

Die Durchflusszytometrie bietet ebenso die Möglichkeit zur Funktionsuntersuchung der Thrombozyten. Die Thrombozytenaktivierung wird mit standardisierten Agonisten gemessen. Die meisten Leitlinien empfehlen ADP und TRAP in jeweils einer optimalen und einer suboptimalen Konzentration. Weitere Agonisten, wie das kollagenbindende Peptid oder Thromboxan-Analogon U46619 (einzeln oder in Kombination mit ADP), werden typischerweise verwendet, wenn das erste Screening nicht aussagekräftig war. Drei Marker können eingesetzt werden, um den Aktivierungsstatus bzw. die Aktivierbarkeit der Thrombozyten zu beurteilen:

- aktivierte Form des GP-IIb/IIIa-Komplexes (mittels PAC-1),
- P-Selektin (CD62P) (in α -Granula gespeichert) und
- CD63 (in lysosomalen und δ -Granula gespeichert).

Diese Marker sind auf der Oberfläche von ruhenden Thrombozyten nahezu abwesend. Die Zugabe von den oben genannten Agonisten bewirkt typischerweise eine Konformationsänderung des GP-IIb/IIIa-Komplexes und die Freisetzung der α - und δ -Granula. In der Durchflusszytometrie kann die Expression von PAC-1, P-Selektin bzw. CD63 durch die Bestimmung der Fluoreszenzintensität gemessen werden [55, 56].

Genetische Untersuchung

Die Sicherung der Diagnose erfolgt durch den Nachweis der zugrunde liegenden Mutation. In den letzten Jahren wurden die verursachenden Genveränderungen vieler hereditärer Thrombozytopenien identifiziert. Die oben ausgeführte Screeninguntersuchung mit der Immunfluoreszenz kann eine nähere Identifikation des Defekts erleichtern und ermöglicht eine gezielte genetische Untersuchung. Trotz Ausschöpfung aller derzeit vorhandenen diagnostischen Möglichkeiten lässt sich die Ursache der Thrombozytopenie nur bei ca. 60% aller Patienten sichern. Durch die Möglichkeiten der Sequenzierung des gesamten Genoms ist jedoch zu erwarten, dass sich diese Zahl schnell vergrößern wird.

► **Tab. 2** Mögliche Zielstrukturen in der Immunfluoreszenzmikroskopie (► **Abb. 5**).

Zielstruktur	Erkrankung
Rezeptordefekte	
GP Ib/IX*	Bernard-Soulier-Syndrom
GP IIb/IIIa*	Glanzmann-Thrombasthenie
Zytoskelettproteine	
nicht muskuläres Myosin IIA	MYH9-Erkrankung
nicht muskuläres Myosin IIB	FLI1, RUNX1
Filamin	filaminassoziierte Makrothrombozytopenie
β1-Tubulin	tubulinassoziierte Makrothrombozytopenie, aber auch bei vielen anderen Makrothrombozytopenien vorkommend
Granuladefekte	
P-Selektin, vWF, Thrombospondin	Grey-Platelet-Syndrom, GFI1B-Defekt, kombinierte α-δ-Storage-Pool-Defekte
CD63, LAMP 1, LAMP 2	δ-Granula-Erkrankungen wie z. B. Hermansky-Pudlak-Syndrom oder Defekte in den Lysosomen

* Die Untersuchung dieser Strukturen ist auch in vielen anderen Laboren in der Durchflusszytometrie etabliert.

Blutungsrisiko bei Patienten mit Thrombozytenerkrankung

Zur Einschätzung und Beurteilung des Blutungsrisikos bei Patienten mit Thrombozytenfunktionsstörungen kommen mehrere Scores zur Anwendung. Standardisierte Fragebögen können aussagekräftig sein, setzen aber eine gute Compliance von Arzt und Patient voraus. Detaillierte Fragen erlauben eine bessere Differenzialdiagnose, beanspruchen aber andererseits viel Zeit im Klinikalltag. In Deutschland sind die Blutungsrisikoscores angelehnt an die Fragebögen zur Diagnose eines Von-Willebrand-Syndroms.

Die Human-Phenotype-Ontology-Codierung (HPO-Codierung) wird neuerdings benutzt, um hämatologische und nicht hämatologische Merkmale zu standardisieren [57]. Dieser Score hilft dabei, Patienten, die ähnliche klinische Manifestationen und Laborergebnisse besitzen, in Erkrankungsgruppen einzuordnen. Allerdings ist eine vollständige HPO-Codierung zeitaufwendig und darüber hinaus stark abhängig von den berichtenden Ärzten und Wissenschaftlern. Nichtsdestotrotz werden in Zukunft standardisierte Blutungsscores für die Identifizierung von Gemeinsamkeiten in Datenbanken und Registern innerhalb der Länder oder auch in internationalen Datenbanken wie das des BRIDGE-BPD-Konsortiums wesentlich sein.

Zusammenfassung

Hereditäre Thrombozytenfunktionsstörungen können für klinisch relevante perioperative, aber auch spontane Blutungen verantwortlich sein. Die Diagnostik einer thrombozytären Erkrankung ist kom-

► **Tab. 3** Empfehlungen für Induktoren gemäß den ISTH-Empfehlungen [48].

Agonist	Ausgangskonzentration	höhere Konzentration bei abnormen Ergebnissen
ADP	2 µM	ja
Epinephrin	5 µM	ja
Kollagen	2 µg · ml ⁻¹	ja
Thrombin	10 µM	ja
Thromboxan-Analogen U46619	1 µM	ja
Arachidonsäure	1 mM	ja
Ristocetin	1,2 mg · ml ⁻¹ , 0,5–0,7 mg · ml ⁻¹	2 mg · ml ⁻¹

plex und arbeitsintensiv. Für die optimale Differenzialdiagnose sind die Einschätzung der Blutungsneigung sowie die Auswertung der Thrombozytenzahl und die Überprüfung der peripheren Blutzellmorphologie notwendig. Bei auffälligen Befunden werden die Thrombozytenaggregometrie, Sekretionstests und die Immunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt, an die sich weitere spezialisierte Tests einschließlich der Durchflusszytometrie, Elektronenmikroskopie und genetischen Diagnostik anschließen. Für die Optimierung der Labordiagnose und die Sicherung der Testqualität ist die Standardisierung der Thrombozytenfunktionstestung unabdingbar.

Interessenkonflikt

Die Autoren geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

- [1] Orsini S, Noris P, Bury L et al. Bleeding risk of surgery and its prevention in patients with inherited platelet disorders. *Haematologica* 2017; 102: 1192–1203
- [2] Nurden AT, Pillois X, Wilcox DA. Glanzmann thrombasthenia: state of the art and future directions. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39: 642–655
- [3] Nurden AT, Pillois X. ITGA2B and ITGB3 gene mutations associated with Glanzmann thrombasthenia. *Platelets* 2018; 29: 98–101
- [4] Poon MC, Di Minno G, d'Oiron R et al. New Insights into the Treatment of Glanzmann Thrombasthenia. *Transfus Med Rev* 2016; 30: 92–99
- [5] Nurden AT, Pillois X, Fiore M et al. Expanding the Mutation Spectrum Affecting αIIbβ3 Integrin in Glanzmann Thrombasthenia: Screening of the ITGA2B and ITGB3 Genes in a Large International Cohort. *Hum Mutat* 2015; 36: 548–561
- [6] Kanaji T, Ware J, Okamura T et al. GPIIb/IIIa regulates platelet size by controlling the subcellular localization of filamin. *Blood* 2012; 119: 2906–2913
- [7] Savoia A, Kunishima S, De Rocco D et al. Spectrum of the mutations in Bernard-Soulier syndrome. *Hum Mutat* 2014; 35: 1033–1045
- [8] Nava T, Rivard GE, Bonnefoy A. Challenges on the diagnostic approach of inherited platelet function disorders: Is a paradigm change necessary? *Platelets* 2018; 29: 148–155
- [9] Afrasiabi A, Artoni A, Karimi M et al. Glanzmann thrombasthenia and Bernard-Soulier syndrome in south Iran. *Clin Lab Haematol* 2005; 27: 324–327

- [10] Bury L, Malara A, Momi S et al. Mechanisms of thrombocytopenia in platelet-type Von Willebrand Disease. *Haematologica* 2019; doi:10.3324/haematol.2018.200378
- [11] Giannini S, Cecchetti L, Mezzasoma AM et al. Diagnosis of platelet-type von Willebrand disease by flow cytometry. *Haematologica* 2010; 95: 1021–1024
- [12] Arthur JF, Dunkley S, Andrews RK. Platelet glycoprotein VI-related clinical defects. *Br J Haematol* 2007; 139: 363–372
- [13] Sharda A, Flaumenhaft R. The life cycle of platelet granules. *F1000Res* 2018; 7: 236
- [14] Gremmel T, Frelinger AL3rd, Michelson AD. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost* 2016; 42: 191–204
- [15] Albers CA, Cvejic A, Favier R et al. Exome sequencing identifies NBEAL2 as the causative gene for gray platelet syndrome. *Nat Genet* 2011; 43: 735–737
- [16] Nurden AT, Nurden P. The gray platelet syndrome: clinical spectrum of the disease. *Blood Rev* 2007; 21: 21–36
- [17] Stevenson WS, Morel-Kopp MC, Chen Q et al. GFI1B mutation causes a bleeding disorder with abnormal platelet function. *J Thromb Haemost* 2013; 11: 2039–2047
- [18] Schulze H, Schlagenhaut A, Manukjan G et al. Recessive grey platelet-like syndrome with unaffected erythropoiesis in the absence of the splice isoform GFI1B-p37. *Haematologica* 2017; 102: e375–e378
- [19] Stevenson WS, Rabbolini DJ, Beutler L et al. Paris-Trousseau thrombocytopenia is phenocopied by the autosomal recessive inheritance of a DNA-binding domain mutation in FLI1. *Blood* 2015; 126: 2027–2030
- [20] Nurden AT, Nurden P. Should any genetic defect affecting alpha-granules in platelets be classified as gray platelet syndrome? *Am J Hematol* 2016; 91: 714–718
- [21] Salles II, Feys HB, Iserbyt BF et al. Inherited traits affecting platelet function. *Blood Rev* 2008; 22: 155–172
- [22] Nurden AT, Freson K, Seligsohn U. Inherited platelet disorders. *Haemophilia* 2012; 18 (Suppl. 4): 154–160
- [23] Fletcher SJ, Johnson B, Lowe GC et al. SLFN14 mutations underlie thrombocytopenia with excessive bleeding and platelet secretion defects. *J Clin Invest* 2015; 125: 3600–3605
- [24] Gresele P, Falcinelli E, Bury L. Laboratory diagnosis of clinically relevant platelet function disorders. *Int J Lab Hematol* 2018; 40 (Suppl. 1): 34–45
- [25] Lordier L, Bluteau D, Jalil A et al. RUNX1-induced silencing of non-muscle myosin heavy chain IIB contributes to megakaryocyte polyploidization. *Nat Commun* 2012; 3: 717
- [26] Daly ME. Transcription factor defects causing platelet disorders. *Blood Rev* 2017; 31: 1–10
- [27] Nichols KE, Crispino JD, Poncz M et al. Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nat Genet* 2000; 24: 266–270
- [28] Vo KK, Jarochoa DJ, Lyde RB et al. FLI1 level during megakaryopoiesis affects thrombopoiesis and platelet biology. *Blood* 2017; 129: 3486–3494
- [29] Saultier P, Vidal L, Canault M et al. Macrothrombocytopenia and dense granule deficiency associated with FLI1 variants: ultrastructural and pathogenic features. *Haematologica* 2017; 102: 1006–1016
- [30] Melazzini F, Palombo F, Balduini A et al. Clinical and pathogenic features of ETV6-related thrombocytopenia with predisposition to acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2016; 101: 1333–1342
- [31] Kamato D, Thach L, Bernard R et al. Structure, Function, Pharmacology, and Therapeutic Potential of the G Protein, α/q , 11. *Front Cardiovasc Med* 2015; 2: 14
- [32] Scharf RE. Platelet Signaling in Primary Haemostasis and Arterial Thrombus Formation: Part 2. *Hamostaseologie*. 2018; 38: 211–222
- [33] Rao AK, Jalagadugula G, Sun L. Inherited defects in platelet signaling mechanisms. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30: 525–535
- [34] Dragani A, Brancati F, Pascale S et al. Clinical and laboratory phenotype associated with the aspirin-like defect. *Br J Haematol* 2010; 148: 661–663; author reply 663–664
- [35] Massaad MJ, Ramesh N, Geha RS. Wiskott-Aldrich syndrome: a comprehensive review. *Ann N Y Acad Sci* 2013; 1285: 26–43
- [36] de Witt SM, Swieringa F, Cavill R et al. Identification of platelet function defects by multi-parameter assessment of thrombus formation. *Nat Commun* 2014; 5: 4257
- [37] Nurden AT, Nurden P. Inherited disorders of platelet function: selected updates. *J Thromb Haemost* 2015; 13 (Suppl. 1): S2–S9
- [38] Lhermusier T, Chap H, Payrastra B. Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 1883–1891
- [39] Misceo D, Holmgren A, Louch WE et al. A dominant STIM1 mutation causes Stormorken syndrome. *Hum Mutat* 2014; 35: 556–564
- [40] Bidlingmaier C, Grote V, Budde U et al. Prospective evaluation of a pediatric bleeding questionnaire and the ISTH bleeding assessment tool in children and parents in routine clinical practice. *J Thromb Haemost* 2012; 10: 1335–1341
- [41] Lowe GC, Lordkipanidze M, Watson SP; UK GAPP study group. Utility of the ISTH bleeding assessment tool in predicting platelet defects in participants with suspected inherited platelet function disorders. *J Thromb Haemost* 2013; 11: 1663–1668
- [42] Hvas AM, Favaloro EJ. Platelet Function Analyzed by Light Transmission Aggregometry. *Methods Mol Biol* 2017; 1646: 321–331
- [43] Scharf RE. Drugs that affect platelet function. *Semin Thromb Hemost* 2012; 38: 865–883
- [44] Nagler M, Keller P, Siegrist D et al. A case of EDTA-dependent pseudo-thrombocytopenia: simple recognition of an underdiagnosed and misleading phenomenon. *BMC Clin Pathol* 2014; 14: 19
- [45] Hvas AM, Grove EL. Platelet Function Tests: Preanalytical Variables, Clinical Utility, Advantages, and Disadvantages. *Methods Mol Biol* 2017; 1646: 305–320
- [46] Noris P, Biino G, Pecci A et al. Platelet diameters in inherited thrombocytopenias: analysis of 376 patients with all known disorders. *Blood* 2014; 124: e4–e10
- [47] Fixter K, Rabbolini DJ, Valecha B et al. Mean platelet diameter measurements to classify inherited thrombocytopenias. *Int J Lab Hematol* 2018; 40: 187–195
- [48] Greinacher A, Pecci A, Kunishima S et al. Diagnosis of inherited platelet disorders on a blood smear: a tool to facilitate worldwide diagnosis of platelet disorders. *J Thromb Haemost* 2017; 15: 1511–1521
- [49] Knofler R, Streif W. Strategies in Clinical and Laboratory Diagnosis of Inherited Platelet Function Disorders in Children. *Transfus Med Hemother* 2010; 37: 231–235
- [50] Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P et al. Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost* 2013. doi:10.1111/jth.12231
- [51] Paniccio R, Priora R, Liotta AA et al. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag* 2015; 11: 133–148
- [52] Podda GM, Bucciarelli P, Lussana F et al. Usefulness of PFA-100 testing in the diagnostic screening of patients with suspected abnormalities of hemostasis: comparison with the bleeding time. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 2393–2398
- [53] Badin MS, Graf L, Iyer JK et al. Variability in platelet dense granule adenosine triphosphate release findings amongst patients tested multiple times as part of an assessment for a bleeding disorder. *Int J Lab Hematol* 2016; 38: 648–657