

Universität Rostock



Traditio et Innovatio

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin

Leiter: Prof. Dr. med. Thomas Thiele

Betreuer: Prof. Dr. med. Volker Kiefel

Neonatale Alloimmunthrombozytopenie:

Immunologische Befunde und klinische Ausprägung

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von:

Nico Greger, geb. am 23.12.1980 in Rostock

aus Rostock

Rostock, 2023



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung - Nicht-kommerziell - Weitergabe unter
gleichen Bedingungen 4.0 International Lizenz.

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Volker Kiefel, Institut für Transfusionsmedizin,
Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Carl Friedrich Classen, Kinder- und Jugendklinik,
Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Marcus Böck, Institut für Klinische Transfusionsmedizin
und Hämotherapie, Universitätsklinikum Würzburg

Datum der Einreichung: 23.06.2022

Datum der Verteidigung: 01.02.2023

Für Omi

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	7
2 Stand der Forschung.....	10
2.1 Fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenien.....	10
2.1.1 Fetomaternale Inkompatibilität.....	10
2.1.2 Inzidenz.....	11
2.1.3 Pathomechanismus.....	11
2.1.4 Diagnostik.....	14
2.1.5 Postnatale Therapie.....	15
2.1.6 Pränatale Therapie und Prophylaxe.....	17
2.1.7 Primärprophylaxe.....	18
2.2 Die HPA-Nomenklatur.....	19
2.3 Membranproteine von Thrombozyten.....	21
2.3.1 Der Glykoproteinkomplex IIb/IIIa (Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$).....	22
Aufbau des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$	22
Aktivierung des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$	23
Bedeutung des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ in der Medizin.....	24
2.3.2 Der Glykoproteinkomplex Ib/IX/V.....	24
2.3.3 Der Glykoproteinkomplex Ia/IIa (Integrin $\alpha\text{2}/\beta\text{1}$).....	25
2.3.4 Das Glykoprotein CD109.....	26
2.3.5 Das Glykoprotein IV.....	26
2.4 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit.....	27
3 Methoden und Material.....	28
3.1 FNAIT-Studie.....	28
3.1.1 Untersuchungsmaterial.....	28
3.1.2 Einschluss- und Ausschlusskriterien.....	29
3.1.3 Statistische Auswertung.....	30

3.2 Anti-HPA-1a-Studie.....	30
3.2.1 Indirekter MAIPA-Test.....	30
3.2.2 Modifizierung des indirekten MAIPA-Tests.....	32
Geräte und Materialien.....	32
Reagenzien.....	33
Pufferlösungen.....	33
Serumproben.....	33
Referenzmaterial.....	34
Gewinnung von Testthrombozyten.....	34
Testdurchführung.....	34
3.2.3 Bestimmung der Antikörperkonzentration.....	36
3.2.4 Klinische Daten der Probanden.....	37
3.2.5 Statistische Auswertung.....	37
4 Ergebnisse.....	38
4.1 FNAIT-Studie.....	38
4.1.1 Allgemeine Beobachtungen.....	38
4.1.2 Spezielle Beobachtungen.....	40
4.1.3 Untersuchung auf fetale Alloimmunthrombozytopenie.....	43
4.1.4 NAIT durch Antikörper gegen niederfrequentes Antigen.....	44
4.2 Anti-HPA-1a-Studie.....	45
4.2.1 Allgemeine Beobachtungen.....	45
4.2.2 Antikörperkonzentrationen von maternalem Anti-HPA-1a.....	49
4.2.3 Antikörperkonzentration und Thrombozytopenie.....	49
4.2.4 Antikörperkonzentration und Blutungszeichen.....	50
4.2.5 Antikörperkonzentration und Therapie.....	50
4.2.6 NAIT mit initial nicht festgestelltem Anti-HPA-1a.....	52
5 Diskussion.....	54
5.1 Allgemeine Erkenntnisse der FNAIT-Studie.....	54
5.2 Vergleich mit historischen Daten.....	54

5.3 Intrakranielle Hämorrhagien.....	58
5.4 Fetomaternale Inkompatibilität.....	59
5.5 Einfluss von HLA-Klasse-I-Antikörpern.....	61
5.6 Einfluss von RhD auf NAIT-Fälle mit Anti-HPA-1a.....	62
5.7 Allgemeine Erkenntnisse der Anti-HPA-1a-Studie.....	64
5.8 Einfluss der Antikörperkonzentration von Anti-HPA-1a.....	64
5.9 Zukünftige Risikobewertung.....	66
6 Zusammenfassung.....	69
7 Abkürzungsverzeichnis.....	71
8 Tabellenverzeichnis.....	73
9 Abbildungsverzeichnis.....	74
10 Literaturverzeichnis.....	75
11 Thesen.....	83
12 Lebenslauf.....	85
13 Selbstständigkeitserklärung.....	87
14 Danksagung.....	88

1 Einleitung

Bei Früh- und Neugeborenen wird mit einer Wahrscheinlichkeit von 1% bis 5% eine Thrombozytopenie festgestellt, auf neonatalen Intensivstationen ist sogar mindestens jedes fünfte Kind davon betroffen.¹ Der Schweregrad ist jedoch sehr unterschiedlich ausgeprägt: Einerseits können verringerte Thrombozytenzahlen bereits bei geringgradigen Veränderungen der neonatalen Homöostase auftreten, andererseits sind sie oft auch Nebenwirkungen von schweren Erkrankungen. Während erstgenannte oft keines weiteren Vorgehens bedürfen, können letztgenannte sehr aufwendig bei der Diagnostik und Therapie sein.

Der bei Erwachsenen geltende Grenzwert von 150 Gpt/l für die Definition einer Thrombozytopenie wird auch oft für Früh- und Neugeborene angewendet, wobei es Studien gibt, die einen niedrigeren Schwellenwert (104 Gpt/l für Frühgeborene bzw. 123 Gpt/l für reife Neugeborene) empfehlen.² Als schwere Thrombozytopenien werden Verläufe mit Thrombozytenzahlen < 50 Gpt/l bezeichnet.³

Aufgrund der Vielzahl an Ursachen, die zur Verringerung der Blutplättchen führen können, ist eine Einteilung nach zeitlichem Verlauf in drei Gruppen sinnvoll: Abgesehen von der fetalen Thrombozytopenie unterscheidet man eine frühe (engl. = *early-onset neonatal thrombocytopenia*, EONT) von einer späten neonatalen Thrombozytopenie (engl. = *late-onset neonatal thrombocytopenia*, LONT).⁴ Ausschlaggebend ist dabei der Zeitpunkt der Diagnosestellung. Bei der fetalen Verlaufsform sind es meist Auffälligkeiten in der Ultraschalldiagnostik, die zur intrauterinen Diagnostik inklusive Blutentnahme beim Feten führen. Bei der EONT fällt die Thrombozytopenie innerhalb von 72 Stunden nach der Geburt auf, bei der LONT dementsprechend nach 72 Stunden. Für alle drei Verlaufsformen kommen verschiedene Gründe für den Thrombozytenabfall in Frage, welche in Anlehnung an die Arbeit von Chakravorty und Roberts schematisch in Tabelle 1 zusammengefasst werden.⁴ Auch für die Diagnose hilft diese Einteilung unter Berücksichtigung der Schwangerschaftsdauer. Frühgeborene, die innerhalb von 72 Stunden nach der Geburt eine Thrombozytopenie aufweisen, leiden häufiger an Komplikationen, die im Rahmen der Schwangerschaft oder Geburt aufgetreten sind. Bei zeitgerechten Neugeborenen hingegen, die erst nach dem dritten Lebenstag einen Abfall der Blutplättchen aufweisen, ist eine Spätsepsis oder nekrotisierende Enterokolitis eher der Auslöser. Einen besonderen Stellenwert in Zusammenhang mit dieser Arbeit haben vor allem reife, ansonsten gesunde Neugeborene, bei denen die verminderte Zahl von Thrombozyten als einziges Zeichen in Erscheinung tritt. Hier sind immunologische Prozesse die wahrscheinlichste Ursache, so dass zeitnah die Diagnostik bezüglich einer fetomaternalen Inkompatibilität oder maternaler plättchenspezifischer Autoantikörper eingeleitet werden soll.

Tabelle 1: Ursachen fetaler und neonataler Thrombozytopenien

Fetal	• Alloimmun (FNAIT) • Kongenitale Infektionen (z. B. Cytomegalievirus, Toxoplasma gondii, Masernvirus, Humanes Immundefizienzvirus, Zika-Virus) • Chromosomenaberrationen (z. B. Trisomie 18, 13, 21) • Autoimmun (z. B. maternale Autoimmunthrombozytopenie, systemischer Lupus erythematodes) • Schwerer MHN durch fetomaternale Rh- oder Kell-Inkompatibilität • Erbkrankheiten (v. a. Wiskott-Aldrich-Syndrom)
Früh-neonatal (<72 h postnatal)	• Plazentainsuffizienz (z. B. bei Präeklampsie, Gestationsdiabetes mellitus) • Asphyxia neonatorum • Perinatale Infektionen (v. a. Beta-hämolisierende Streptokokken der Gruppe B und E. coli) • Disseminierte intravasale Koagulopathie • Alloimmun (FNAIT) • Autoimmun (z. B. maternale Autoimmunthrombozytopenie, neonataler Lupus erythematodes) • Kongenitale Infektionen (wie bei fetaler Form) • Kasabach-Merritt-Syndrom • Stoffwechselerkrankungen (z. B. Propionazidämie, Methylmalonazidurie, Morbus Gaucher, subkutane Fettgewebsnekrose des Neugeborenen) • Erbkrankheiten (z. B. TAR-Syndrom, kongenitale amegakaryozytäre Thrombozytopenie)
Spät-neonatal (>72 h postnatal)	• Spätsepsis (v. a. als B-Streptokokken-Meningitis) • Nekrotisierende Enterokolitis • Kongenitale Infektionen (wie bei fetaler Form) • Autoimmun (durch maternale Antikörper) • Kasabach-Merritt-Syndrom • Stoffwechselkrankheiten • Erbkrankheiten (TAR-Syndrom, u. v. m.)

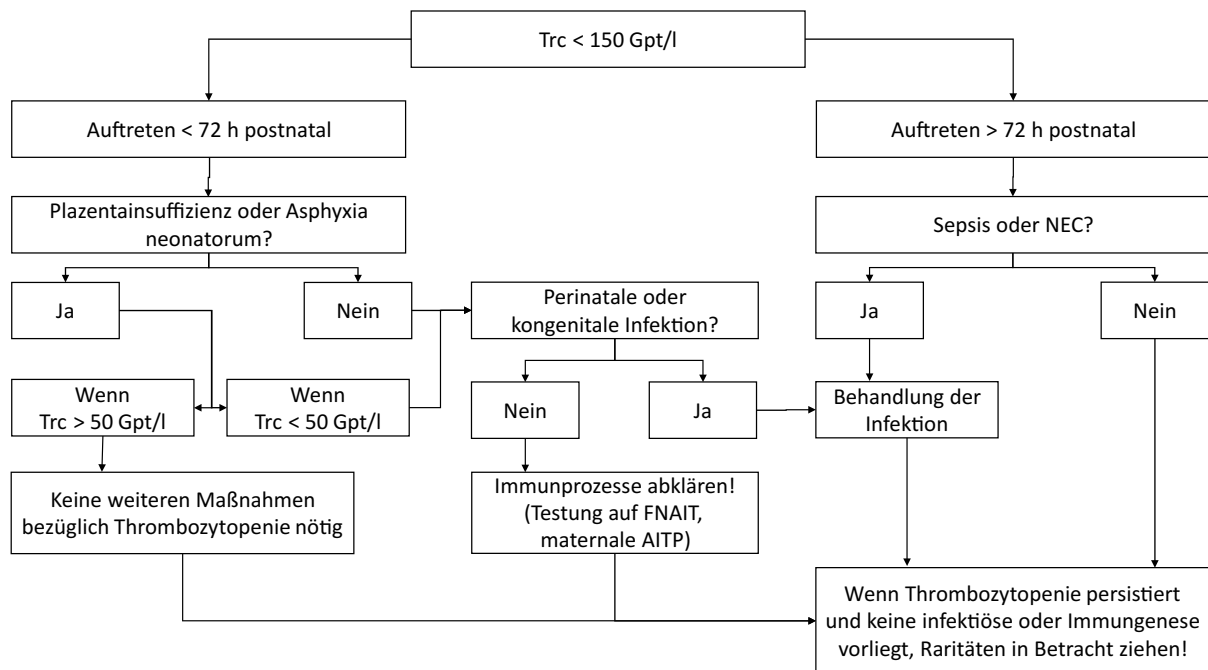
FNAIT = fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie, MHN = Morbus haemolyticus neonatorum, TAR-Syndrom = Thrombozytopenie-Radiussaplasie-Syndrom (engl. = *thrombocytopenia with absent radius*)

Wenn die Thrombozytopenie persistiert und keinerlei infektiologische oder immunologische Genese gefunden werden konnte, sollten seltene Ursachen abgeklärt werden. Hierzu zählen vor allem hereditäre Erkrankungen wie zum Beispiel das Wiskott-Aldrich-Syndrom oder das Bernard-Soulier-Syndrom.⁵ Ein pragmatischer Algorithmus für die Diagnostik neonataler Thrombozytopenien ist in Anlehnung an die Arbeit von Chakravorty und Roberts in Abbildung 1 zu sehen.⁴

Durch die verringerte Thrombozytenzahl kommt es zu einer erhöhten Blutungsneigung, wobei verschiedenste Organe betroffen sein können. Aufgrund der neurologischen Folgen und der hohen Mortalität sind intrakranielle Blutungen am gefürchtetsten.⁶ Allerdings wurden auch Todesfälle durch pulmonale oder gastrointestinale Blutungskomplikationen beschrieben.⁷

Die primäre Therapie der fetalen und neonatalen Thrombozytopenie liegt - wenn möglich - in der Beseitigung der ursprünglichen Ursache, wie zum Beispiel durch eine antimikrobielle Therapie bei perinatalen Infektionen. Unterstützend können Thrombozyten gegeben werden.⁴ Allerdings gibt es keinen internationalen Standard, der festlegt, ab welchen Werten eine Transfusion indiziert ist.⁸ Vielmehr zielen die nationalen Richtlinien darauf ab, schwerwiegende Blutungen zu vermeiden. In der aktuell größten randomisierten Studie zur Transfusion von Thrombozyten bei Neugeborenen konnte gezeigt werden, dass Frühgeborene eher davon profitieren, wenn sie erst bei einer niedrigeren Thrombozytenzahl (<25 Gpt/l statt <50 Gpt/l) transfundiert werden.⁹ Die Besonderheiten und vor allem die spezifische Therapie der fetalen und neonatalen Alloimmunthrombozytopenie wird im Kapitel 2.1 genauer beschrieben.

Abbildung 1: Algorithmus zur Abklärung neonataler Thrombozytopenien



Algorithmus in Anlehnung an die Arbeit von Chakravorty und Roberts⁴

AITP = Autoimmunthrombozytopenie, FNAIT = fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie; NEC = nekrotisierende Enterokolitis, Trc = Thrombozytenzahl

2 Stand der Forschung

Fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenien (FNAIT) stellen die häufigste Form immunologisch vermittelter Thrombozytopenien bei Neugeborenen dar. Die meisten plättchen-spezifischen Alloantigene wurden im Rahmen von FNAIT-Fällen entdeckt. Allerdings erfolgte die Erstbeschreibung des wohl wichtigsten Alloantikörpers Anti-HPA-1a, damals noch Anti-Zw(a) genannt, bei Patienten, die an einer posttransfusionellen Purpura (PTP) litten.¹⁰ FNAIT und PTP sind die beiden wichtigsten Vertreter von alloimmun verursachten Thrombozytopenien. Darüber hinaus gehören auch der Refraktärzustand bei Thrombozytentransfusionen, die passive alloimmune Thrombozytopenie und die transplantationsassoziierte alloimmune Thrombozytopenie zu den durch Alloantikörper bedingten Störungen der thrombozytären Hämostase. Alle Krankheitsentitäten weisen die Gemeinsamkeit auf, dass durch Immunisierungsereignisse wie Schwangerschaften, Transfusionen von Blutzubereitungen sowie Transplantationen solider Organe oder hämatopoetischer Progenitorzellen die Bildung von Antikörpern gegen körperfremde Merkmale von Thrombozyten induziert werden und diese aktiv oder passiv zu einer Thrombozytopenie führen. Diese Alloantikörper sind vor allem gegen Merkmale des Haupthistokompatibilitätskomplexes, vorwiegend HLA-A- und HLA-B-Antigene, oder plättchen-spezifische Glykoproteine gerichtet.¹¹

In den folgenden drei Unterkapiteln sollen die FNAIT, die HPA-Nomenklatur und darüber hinaus auch die für die Thrombozytenserologie wichtigsten Membranproteine von Plättchen dargestellt werden.

2.1 Fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenien

Dieses Krankheitsbild wurde bereits im Jahre 1953 von Harrington et al. teilweise beschrieben, wobei sie verschiedene immunologische Pathomechanismen als Ursache vermuteten.¹² In den folgenden Jahren wurden mehr und mehr Einzelheiten bekannt, wobei vor allem die Inkompatibilität zwischen Fetus und Mutter in den Mittelpunkt gestellt wurde.

2.1.1 Fetomaternale Inkompatibilität

Grundlage der fetomaternalen Inkompatibilitäten ist die Vererbung paternaler Merkmale auf den Fetus, welche vom Immunsystem der Mutter als fremd erkannt werden. Hierzu gehören :

- Hämolytische Erkrankung beim Feten und Neugeborenen (Morbus haemolyticus neonatorum = MHN)
- Fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie (= FNAIT)
- Neonatale Immunneutropenie (= NIN)

Die mütterliche Immunisierung wird durch den transplazentaren Übertritt entsprechender fetaler Antigene in den maternalen Kreislauf verursacht. Alle drei Entitäten besitzen gewisse Parallelen, allerdings gibt es auch entscheidende Unterschiede, wie Tabelle 2 zeigt.

Tabelle 2: Fetomaternale Inkompatibilitäten

Entität	Erste Gravidität betroffen?	Komplikationen während Gravidität?	Diagnostik während Gravidität	Therapie während Gravidität	Prophylaxe vorhanden?
MHN	Extrem selten	Ja: hämolytische Anämie, Hydrops fetalis	Doppler-Sonografie, fetales Blutbild	Erythrozyten-Gabe	Teilweise (für Anti-D)
FNAIT	Häufig	Ja: Hämorrhagien, intrakranielle Hämatome	Fetales Blutbild, wiederholte Ultraschall-Untersuchungen	Maternale IVIG-Therapie; Thrombozyten-transfusion	Nein
NIN	Häufig	Nein	Nicht notwendig	Nicht notwendig	Nein

FNAIT = fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie, IVIG = intravenöse Immunglobuline, MHN = Morbus haemolyticus neonatorum, NIN = neonatale Immunneutropenie

2.1.2 Inzidenz

Die Inzidenz der FNAIT bei Populationen europäischer Herkunft wurde aufgrund der in mehreren prospektiven Studien gewonnenen Daten auf 1:800 bis 1:2000 geschätzt³, wobei viele Fälle wegen fehlender Blutungszeichen in der Routine nicht auffallen würden. Außerdem muss erwähnt werden, dass bei den oben genannten Studien Fehlgeburten, vor allem in frühen Stadien, nicht gezählt wurden. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Wiederauftretenswahrscheinlichkeit einer FNAIT bei annähernd 100% liegt, wenn das Folgegeschwisterkind das betroffene Antigen geerbt hat.

2.1.3 Pathomechanismus

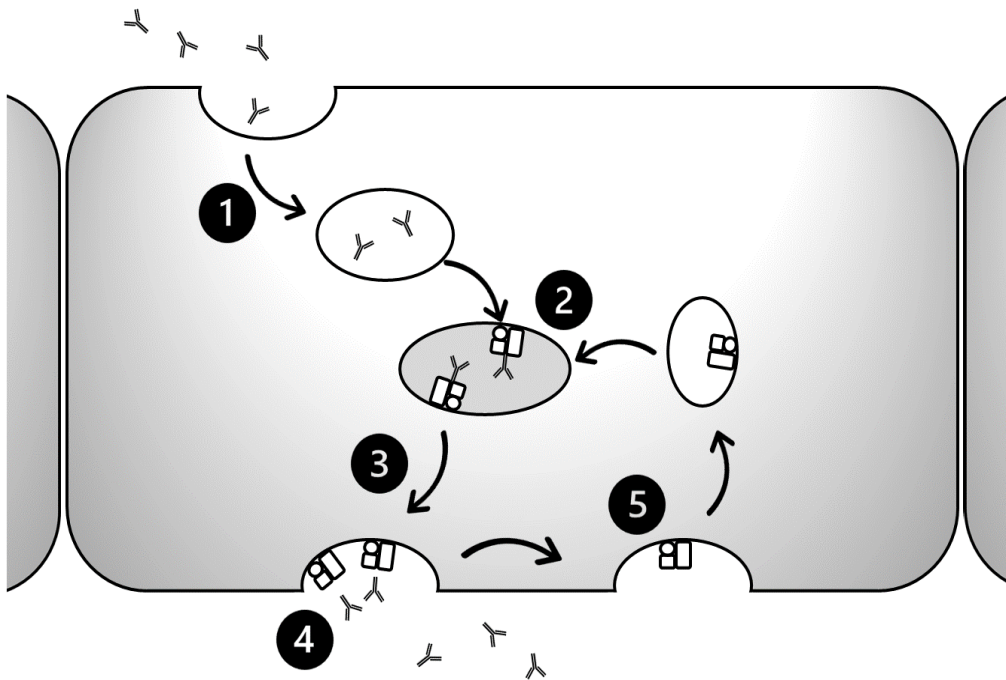
Warum im Gegensatz zum MHN bereits Erstschwangerschaften von einer FNAIT betroffen sein können, liegt am ehesten daran, dass vor allem beim HPA-1-System die entsprechenden Antigen-tragenden Glykoproteine nicht nur auf den fetalen Thrombozyten, sondern auch auf anderen Zellen exprimiert werden. Dieses betrifft vor allem die Mikrovilli am apikalen Pol der Synzytiotrophoblasten, die von maternalem Blut umspült werden.¹³ Da diese bereits im ersten Trimenon komplett ausgebildet sind, können bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Schwangerschaft Alloantigene in den maternalen Kreislauf gelangen, die mitunter Immunisierungsprozesse induzieren.

Die humorale Immunantwort auf fremde Antigene wird durch eine Vielzahl an Zellen und die von ihnen sezernierten Botenstoffe reguliert. Primär gebildete Antikörper der Immunglobulin-klasse M gelten im Allgemeinen als ungefährlich für den Feten, da bisher keine spezifischen Transporterproteine für IgM bekannt sind.¹⁴ Bei anhaltender Antigenpräsenz im maternalen

Kreislauf kann es jedoch zu weiteren Immunprozessen kommen. Durch eine Co-Stimulation mittels T-Helferzellen kann letztendlich ein Immunglobulinklassen-Switch induziert werden, der Plasmazellen Immunglobulin-G-Antikörper produzieren und sezernieren lässt.³

Zum Aufbau und Erhalt einer Leihimmunität beim Neugeborenen kommt es bereits pränatal zur transplazentaren Übertragung von Antikörpern der Klasse IgG.¹⁵ Hierfür ist ein Rezeptor besonders entscheidend: der neonatale Fc-Rezeptor (FcRn). Er unterscheidet sich sehr von anderen IgG-bindenden Fc-Rezeptoren (FcγR), vor allem in der Affinität. Der FcRn bindet IgG-Moleküle nicht bei physiologischen pH-Werten, sondern hat seine höchste Bindungskraft im sauren Milieu (pH etwa 4,5). Für den transplazentaren Übertritt von Immunglobulinen der Klasse G sind wiederum die Synzytiotrophoblasten von entscheidender Bedeutung, die Abbildung 2 zeigt den Ablauf in Anlehnung an die Arbeit von Roopenian und Akilesh.¹⁵

Abbildung 2: Perinataler Transfer von IgG durch den neonatalen Fc-Rezeptor



Darstellung in Anlehnung an die Arbeit von Roopenian und Akilesh¹⁵; weitere Erklärung siehe Text

Maternales Plasma mit den darin gelösten IgG-Molekülen wird durch Makropinozytose am apikalen Pol des Synzytiotrophoblasten aufgenommen und als Endosom in das Zellinnere transportiert (Abb. 2, Punkt 1). Dort erfolgt die Verschmelzung mit FcRn enthaltenden Endosomen (Abb. 2, Punkt 2). Durch Ansäuerung dieses fusionierten Zellkompartiments kann das IgG-Molekül an den FcRn gebunden werden. Anschließend erfolgt der Transport an die basale Zellmembran und die Verschmelzung mit dieser (Abb. 2, Punkt 3). Bei nun wieder physiologischem pH-Wert dissoziiert das IgG-Molekül vom neonatalen Fc-Rezeptor und tritt in den fetalen Kreislauf über (Abb. 2, Punkt 4). Der FcRn wiederum kann internalisiert und somit recycelt werden (Abb. 2, Punkt 5). Er steht anschließend für weitere Transporte zur Verfügung.

Handelt es sich bei den IgG-Molekülen um Antikörper, die gegen plättchenspezifische Glykoproteine gerichtet sind, und trägt der Fetus die korrespondierenden Alloantigene, kommt es zur Opsonierung fetaler Thrombozyten und zur Phagozytose durch Makrophagen mittels spezifischer Fcγ-Rezeptoren im retikuloendothelialen System (RES).¹⁶ Der daraus resultierende vermehrte Abbau von Plättchen scheint aber nur eine Komponente zu sein, die zur Thrombozytopenie bzw. zum klinischen Bild der FNAIT führt: In einer Studie von Liu et al. konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass in-vitro auch die Megakaryopoese von plättchenspezifischen Alloantikörpern betroffen ist.¹⁷ Dieser Effekt verstärkt sich, da die fetale Bildung von Thrombozyten ohnehin noch nicht komplett ausgereift ist. Folglich werden die Thrombozyten nicht nur schneller abgebaut, sondern auch zahlenmäßig weniger gebildet. Die am häufigsten gefundenen plättchenspezifischen Alloantikörper sind gerichtet gegen HPA-1a (auf der Integrin β3-Kette) und HPA-5b (auf Integrin α2). Auch Endothelzellen und Trophoblasten können Ziel von plättchenspezifischen Antikörpern sein, vor allem bei Alloantikörpern, die gegen β3-Integrine gerichtet sind, da diese in Kombination mit verschiedenen α-Ketten auf mehreren Zelltypen vorkommt. Die Tabelle 3 fasst zusammen, welche potentiellen pathophysiologischen Mechanismen bei der FNAIT eine Rolle spielen können.³

Tabelle 3: Vermutete Pathomechanismen der FNAIT

Betroffene Zellen	Mechanismus	Folgen
Thrombozyten	Antikörper führt zur Opsonierung und konsekutiven Phagozytose im RES	Thrombozytopenie → Blutungen
Megakaryozyten *	Antikörper führt zur Störung der Megakaryopoese	Thrombozytopenie → Blutungen
Endothelzellen *	Anti-Integrin-β3-Antikörper: Störung der Angiogenese	Intrakranielle Blutungen → intrauterine Wachstumsretardierung oder Fehlgeburt
Trophoblasten *	Anti-Glykoprotein-Ibα-Antikörper: Aktivierung von Thrombozyten, die zur Thrombusbildung führt; Anti-Integrin-β3-Antikörper: Induktion der Apoptose von Trophoblasten	Gestörte Plazentafunktion → Fehlgeburt

* = abgeleitet von in-vitro- oder Tier-Experimenten; RES = Retikuloendotheliales System

Blutplättchen tragen auch HLA-Klasse-I-Merkmale auf ihrer Membran. Ihr Einfluss bezüglich der Auslösung einer FNAIT wird jedoch kontrovers betrachtet: Dahl et al. zum Beispiel haben 2017 in einer Vergleichsstudie zeigen können, dass ein epitop- statt antigenspezifischer Ansatz eine Erklärung für HLA-Klasse-I-assoziierte FNAIT-Fälle sein könnte.¹⁸ Allerdings muss auch gesagt werden, dass die Kontrollgruppe nicht rein prospektiv war. Eine der wenigen prospektiven Studien von Sharon und Amar ließ erkennen, dass HLA-Klasse-I-Antikörper keinen Einfluss auf die Plättchenzahl von Neugeborenen hatten.¹⁹ Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch King et

al. in ihrer 1996 veröffentlichten prospektiven Studie.²⁰ Neben HPA- und HLA-Merkmalen können ebenfalls erythrozytäre Alloantigene auf Thrombozyten nachgewiesen werden.²¹ Dieses sind vor allem auf der Grundsubstanz 1 und 2 basierende kohlenhydratspezifische Antigene der Systeme H, Lewis und AB0. Auch hier gibt es kontroverse Ansichten darüber, ob die dagegen gerichteten Antikörper, vor allem Anti-A und Anti-B, das klinische Bild einer FNAIT verursachen können. Fallbeispiele wurden publiziert, allerdings konnten andere Störfaktoren nie sicher ausgeschlossen werden. Sicher ist aber, dass sowohl HLA-Klasse-I- als auch AB0-Antikörper die Diagnostik erschweren können. Der Einfluss von erstgenannten kann durch die Verwendung von glykoproteinspezifischen Testansätzen anstelle solcher, die nicht-lysierte Thrombozyten verwenden, größtenteils vermieden werden.²² Anti-A und seltener auch Anti-B können jedoch auch im MAIPA falsch positive Reaktionen verursachen, da die kohlenhydratspezifischen Antigene aus dem AB0-Blutgruppensystem auch auf den plättchenspezifischen Glykoproteinen exprimiert werden.²³ Dieses muss vor allem beim Kreuztest mit paternalen Plättchen berücksichtigt werden. Folglich werden für Screeningtests im indirekten MAIPA-Ansatz routinemäßig Testthrombozyten von Probanden mit der Blutgruppe 0 verwendet.

2.1.4 Diagnostik

Wie bereits in der Einleitung (Kapitel 1) beschrieben, können die Ursachen neonataler Thrombozytopenien bereits durch den Verlauf und andere klinische Zeichen eingegrenzt werden. Vor allem bei ansonsten gesunden Kindern mit niedrigen Plättchenzahlen (meist unter 50 Gpt/l) muss an eine immunologische Genese gedacht werden.³ Dabei ist die Diagnostik nicht nur für das Index-Kind, sondern auch für eventuelle Folgeschwangerschaften entscheidend. Bei dem Verdacht auf eine alloimmune Thrombozytopenie sollte bei hohem Blutungsrisiko jedoch nicht die Diagnostik abgewartet, sondern bereits eine entsprechende Therapie eingeleitet werden. Die thrombozytenimmunologische Arbeitsgruppe der *International Society of Thrombosis and Haemostasis* empfiehlt für die Diagnostik:

1. Bei Fehlen anderer Ursachen für eine Thrombozytopenie sollte bei einer Plättchenzahl unter 100 Gpt/l oder bei intrakraniellen Hämatomen die Diagnostik auf eine alloimmunogene Ursache begonnen werden.
2. Die Testung selbst sollte nicht nur die Detektion des maternalen Antikörpers, sondern auch die HPA-Typisierung von Mutter und Kind oder zumindest Mutter und Vater enthalten. Außerdem sollte stets ein Kreuztest maternalen Serums mit paternalen Thrombozyten erfolgen. Bei Folgeschwangerschaften sollte fetale DNA auf das implizierte Antigen getestet werden, wenn der Vater heterozygot dafür ist.
3. Die Allele folgender Plättchenantigene sollten bei der Typisierung berücksichtigt werden: HPA-1, -2, -3, -4, -5, -6, -9 und -15. Bei regionalen Besonderheiten sollten die

entsprechenden Allele ebenfalls getestet werden. Die Typisierung sollte routinemäßig molekulargenetisch erfolgen und bei Auffälligkeiten serologisch unterstützt werden.

4. Das maternale Serum sollte mit zwei voneinander verschiedenen Testsystemen auf Alloantikörper gegen HPA-1, -2, -3, -4, -5 und -15 untersucht werden, am besten als Kombination aus glykoproteinspezifischem Test und einem Verfahren, dass nicht lysierte Thrombozyten untersucht, wie zum Beispiel der Plättchen-Immunfluoreszenztest (PIFT). In entsprechenden Populationen sollte die Testung auch HPA-6bw und Nak(a) beinhalten.²²

Durch diesen Algorithmus soll eine genaue, aber auch zeitnahe Diagnostik der FNAIT erzielt werden. Es wurde auch herausgestellt, dass solche Untersuchungen ob der Komplexität in Referenzlaboren stattfinden soll. Dennoch haben alle aktuell zur Verfügung stehenden Tests für plättchenspezifische Alloantikörper keine 100-prozentige Sensitivität und Spezifität. Der PIFT zum Beispiel liefert eventuell falsch positive Ergebnisse, wenn das maternale Serum zusätzliche HLA-Antikörper enthält. Auch der MAIPA-Test, der im Kapitel 3.2.1 näher beschrieben wird und weiterhin als Gold-Standard gilt, kann eine diagnostische Lücke beinhalten: Durch viele Waschprozesse könnten zum Beispiel niedrig-afide Antikörper nicht erfasst werden. Und durch die Verwendung von monoklonalen Antikörpern, die die entsprechenden Glykoproteine immobilisieren sollen, kann eventuell die entsprechende Bindungsstelle des Alloantikörpers bereits belegt sein. Die oben genannte Arbeitsgruppe der ISBT empfiehlt daher auch die Verwendung von mehreren monoklonalen Antikörpern je Glykoprotein²², was in der Praxis für eine zeitnahe Diagnostik jedoch kaum umzusetzen ist. Angemerkt sei noch, dass einige Antikörper auch erst verzögert nachgewiesen und somit bei der initialen Testung übersehen werden können. Daher wird eine erneute Testung nach zwei bis acht Wochen empfohlen.²² In einzelnen Fällen kann es auch mehrere Monate dauern, bis der Antikörper nachgewiesen werden kann, wie unser Fallbeispiel - beschrieben in Kapitel 4.2.6 - zeigt. Wichtig ist aber, dass die Diagnose der FNAIT vor der nächsten Schwangerschaft feststeht, da sie großen Einfluss auf die pränatale Therapie zur Minderung des Blutungsrisikos - vor allem bezogen auf intrakranielle Hämatome - hat. Beim betroffenen Kind selbst sollten zum Ausschluss von intrakraniellen Hämatomen Ultraschall- oder alternativ MRT-Untersuchungen des Schädels durchgeführt werden.³

2.1.5 Postnatale Therapie

Steht die Diagnose der FNAIT fest oder besteht der begründete Verdacht darauf, sollte das Neugeborene engmaschig überwacht werden, was vor allem eine regelmäßige Kontrolle der Plättchenzahl und die Detektion von klinischen Blutungszeichen beinhaltet. Intrakranielle Hämatome als gefürchtetste Komplikation sind vor allem bei Kindern mit Thrombozytenwerten

unterhalb von 30 Gpt/l berichtet worden.^{3,24} Es fehlen jedoch größere Untersuchungen zu einem exakten Transfusionstrigger. Interessanterweise ergab eine große randomisiert-kontrollierte Studie von Curley et al., dass zumindest bei Frühgeborenen ein höherer Transfusions-Schwellenwert (50 Gpt/l) statistisch signifikant mit einem schlechteren Ausgang (schwere Blutung oder Tod) als ein Wert von 25 Gpt/l assoziiert ist ($p=0,02$).⁹ Die Autoren geben als mögliche Erklärung die Imbalance zwischen einerseits adulten Plättchen mit potentiell immunologischen und inflammatorischen Effekten und andererseits der noch fragilen Thrombozytopoese und Hämostase im Frühgeborenen an. Ob dieses auch auf reife, ansonsten gesunde Neugeborene mit einer neonatalen Alloimmunthrombozytopenie übertragen werden kann, ist unklar, da entsprechende prospektive Analysen für dieses Patientenkollektiv fehlen. Sollte eine Substitution durch Thrombozytenkonzentrate in Frage kommen, sind mehrere Optionen möglich: maternale Thrombozyten, ausgewählte frische oder kryokonservierte Präparate von Spendern mit dem Phänotyp HPA-1a-neg., -5b-neg. oder unausgewählte Präparate.^{3,25,26} In der Tabelle 4 werden die wichtigsten Vor- und Nachteile aufgezeigt.

Tabelle 4: Vor- und Nachteile verschiedener Thrombozytenquellen

Donor	Vorteile	Nachteile
Mutter	• Immer antigennegativ bezogen auf verursachenden Alloantikörper • Keine Fremdspenderbelastung	• Weiterverarbeitung nötig (Waschen zur Elimination des HPA-Antikörpers und möglicher Isoagglutinine, Bestrahlung zur Vermeidung einer GvHD) • Hohe Belastung für die Mutter postpartal • Verzögerte Bereitstellung durch Spender-Infektionsdiagnostik
Negativ für HPA-1a und -5b	• Relativ schnelle Verfügbarkeit • Die wichtigsten Allospezifitäten werden abgedeckt	• Hohe Kosten für Aufbau und Erhaltung entsprechender Datenbanken • Ggf. geringere Wirksamkeit bei anderen Antikörperspezifitäten
Unausgewählt	• Sofort verfügbar • Keine Weiterverarbeitung nötig	• Wirksamkeit ggf. eingeschränkt, damit erhöhter Verbrauch und ggf. hohe Fremdspenderbelastung

GvHD = Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (*graft versus host disease*), HPA = Humanes Plättchenantigen

Warum unausgewählte Präparate effektiv sein können, ist aktuell noch nicht vollständig geklärt, aber Kiefel et al. vermuteten in ihrer Studie, dass die hohe Antigendosis zur Adsorption der passiv übertragenen Alloantikörper führt. Nebenwirkungen wurden dabei nicht festgestellt.²⁶ Als unterstützende Therapie kommen auch intravenöse Immunglobuline (IVIG) in Frage. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Wirkung um bis zu 18 bis 24 Stunden verzögert eintreten kann.²⁷

2.1.6 Pränatale Therapie und Prophylaxe

Plättchenzahlen können bisher nicht non-invasiv abgeschätzt werden. Das heißt, nur über eine fetale Blutprobe mittels Kordozentese kann der Thrombozytenwert bestimmt werden.²⁸ Bei thrombozytopenischen Feten ist dieser Eingriff jedoch mit einem erhöhten Blutungsrisiko verbunden, Komplikationsraten bis zu 10% sind beschrieben worden. Allerdings können über diesen Weg kompatible Thrombozyten transfundiert werden. Eine weitere Therapie stellt die Gabe von intravenösen Immunglobulinen dar. Diese können sowohl fetal als auch maternal appliziert werden, wobei letzteres weniger invasiv und damit weniger riskant und möglicherweise auch effektiver ist.³ Der genaue Wirkmechanismus von IVIG ist nicht vollständig geklärt. Crow und Lazarus haben in ihrer Arbeit folgende potentielle Angriffspunkte von IVIG zusammengefasst:²⁹

1. Blockade von Fcγ-Rezeptoren im retikuloendothelialen System
2. Eliminierung der verursachenden Antikörper durch enthaltende antiidiotypische Antikörper
3. Induktion der Expression des inhibitorisch wirkenden Fcγ-Rezeptors IIB auf Makrophagen der Milz
4. Modulation immunologisch wichtiger Zytokine und Zellen, vor allem dendritischer Zellen
5. Sättigung des neonatalen Fc-Rezeptors mit einerseits vermehrtem Abbau und andererseits verringerter transplazentarer Übertragung der verursachenden Antikörper

Außerdem konnte gezeigt werden, dass IVIG den Einfluss auf die antikörpervermittelte Apoptose von Trophoblasten verbessert, wahrscheinlich durch Beeinflussung von uterinen Natürlichen Killerzellen (uNK-Zellen).³⁰ Diese Beobachtungen könnten somit auch erklären, warum die maternale Gabe von IVIG eine höhere Effektivität als die fetale Gabe hat.

Winkelhorst et al. haben 2017 in einer systematischen Übersicht Empfehlungen zur pränatalen Behandlung der FNAIT veröffentlicht.³¹ Dabei haben sie mehrere Publikationen unterschiedlicher Datenqualität, darunter auch mehrere randomisiert-kontrollierte und prospektive Studien, miteinander verglichen. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass das non-invasive Management der Kombination aus fetalen Blutproben und intrauterinen Thrombozytengaben überlegen ist; unter anderem auch, weil es weniger Komplikationen verursacht. Sie bevorzugten die maternale Infusion von IVIG, jedoch ohne fallgenaue Angabe von Dosis und Start bezogen auf die Gestationsdauer. Dafür fehlten geeignete Biomarker, die die Schwere der FNAIT vorhersagen können. Hierfür bräuchte es weitere prospektive Untersuchungen. Langzeitstudien, die die Wirkung von IVIG auf Kinder untersuchten, konnten bisher keinen negativen Effekt auf die neurologische Entwicklung oder Ausbildung von Immunkrankheiten feststellen.³ In vielen

westlichen Ländern wird seitdem bei Müttern mit Anti-HPA-1a und bekannten schweren Thrombozytopenien (<50 Gpt/l) bei vorherigen Kindern eine entsprechende Gabe von IVIG durchgeführt. Ein weiterer wichtiger Aspekt scheint der Geburtsmodus zu sein. Es gibt aktuell zwar keine großen kontrollierten Studien, allerdings konnte gezeigt werden, dass die Sectio caesarea komplikationsloser als die vaginale Geburt zu sein scheint.²⁴ Bei Spontangeburt sollten invasivere Maßnahmen wie Zangengeburt oder Vakuumextraktion vermieden werden.³

In Norwegen wird seit 2014 ein sehr differenzierter Algorithmus für die pränatale Prophylaxe beim Auftreten einer FNAIT in einer vorherigen Schwangerschaften verfolgt: Anti-HPA-1a-alloimmunisierte Mütter erhalten nicht generell intravenöse Immunglobuline, sondern nur, wenn beim vorherigen Kind eine intrakranielle Blutung aufgetreten ist.³² In diesen Fällen wird bereits ab der 20. Schwangerschaftswoche eine Dosis von 1 g je Kilogramm Körpermasse pro Woche empfohlen. Außerdem soll die Entbindung per Sectio caesarea vorzeitig (37. SSW) erfolgen, und es sollen HPA-1a-negative Thrombozytenkonzentrate zur Geburt bereitstehen. Dieser Geburtsmodus, jedoch in der 38. bis 39. SSW, und die Bereithaltung von kompatiblen Plättchenpräparaten wird darüber hinaus auch für die Mütter empfohlen, bei denen während des Schwangerschaftsverlaufs eine Anti-HPA-1a-Antikörperkonzentration von 3 IU/ml oder darüber bestimmt werden konnte. Bei Werten darunter wird kein spezieller Ablauf empfohlen, außer der Kontrolle des neonatalen Plättchenwertes und eine Schädelsonografie bei schweren Thrombozytopenien (< 50 Gpt/l). Die Autoren äußerten aber auch, dass zukünftige Erkenntnisse bezüglich Anti-HPA-1a und eventuelle Einflüsse auf den Schweregrad von FNAIT-Fällen gut beobachtet werden und in den Algorithmus einfließen sollen.³²

Für die pränatale Therapie könnten in Zukunft sicherlich auch FcRn-Inhibitoren eine Therapieoption darstellen. Im Mausmodell und in Ex-vivo-Perfusionsexperimenten mit humanem Plazentagewebe konnten bereits vielversprechende Ergebnisse erzielt werden.³³ Für einzelne Inhibitoren und Krankheitsbilder laufen bereits Phase-II- und teilweise sogar Phase-III-Studien. Gut vorstellen könnte man sich in Zukunft auch den Einsatz von sogenannten Seldegs. Bei diesen Fusionsproteinen aus IgG-Fc-Fragment und gewähltem Antigen (z. B. Glykoprotein) kann eine gezielte Bindung pathologischer Antikörper und ein vermehrter lysosomaler Abbau nach Bindung an FcRn erzielt werden.³⁴ Nutzt man hierfür HPA-1a exprimierendes GP IIb/IIIa, könnte gezielt maternales Anti-HPA-1a schneller degradiert werden.

2.1.7 Primärprophylaxe

In Deutschland sehen die Richtlinien des Gemeinsamen Bundesausschusses über die ärztliche Betreuung während der Schwangerschaft und nach der Entbindung („Mutterschafts-Richtlinien“) in der aktuellen Fassung von 2020 eine umfangreiche Abklärung bezüglich erythrozytärer Alloantigene und -antikörper vor.³⁵ Vor allem die Diagnostik zur Vermeidung der

Immunisierung der Mutter gegenüber des Alloantigens RhD wird explizit erwähnt, ebenso die empfohlene Prophylaxe durch Anti-D-Immunglobuline. Eine entsprechende Richt- oder Leitlinie zur Vermeidung von FNAIT-Fällen im Sinne einer Primärprophylaxe gibt es hingegen aktuell nicht. Dabei kamen internationale Studien zu dem Ergebnis, dass ein pränatales Screening auf FNAIT nicht teurer ist als vergleichbare Neugeborenen-Untersuchungen.³ Aufgrund des großen Erfolges der Anti-D-Prophylaxe waren und sind die Bestrebungen groß, eine analoge Therapieoption auch für Anti-HPA-1a-bedingte FNAIT-Fälle zu etablieren.³⁶ In Mausmodellen konnte bereits gezeigt werden, dass die Gabe von Anti-HPA-1a-IgG eine antikörpervermittelte Immunsuppression auslösen kann und die entsprechenden Schwangerschaften der Versuchstiere komplikationsärmer verliefen, was die Rate an Totgeburten und intrakranieller Hämatome betraf.³⁷ Dieses Modell sollte anschließend auch auf den Menschen übertragen werden: Im Jahr 2012 wurde ein von der EU mitfinanziertes Konsortium mit dem Namen „PROFNAIT“ gegründet, an welchem sich elf europäische Projektpartner beteiligten.³⁸ Sechs Jahre später wurde das Projekt abgeschlossen, da zu diesem Zeitpunkt genügend Plasma von entsprechenden Probanden gesammelt worden war, um weitere Studien vorzubereiten. Im Jahre 2019 wurde bekannt, dass die Fa. Rallybio die Rechte zur Entwicklung und späteren Lizenzierung des zwischenzeitlich umbenannten Medikamentes (NAITgam) erhalten hat.³⁹ Die Untersuchung der Sicherheit für Mutter und Kind, die Findung einer angemessenen Dosis und schließlich der Wirksamkeitsnachweis von Anti-HPA-1a beim Menschen werden umfangreiche Studien erfordern. Wann das Präparat auf den Markt kommt, ist aktuell nicht bekannt. Außerdem muss beachtet werden, dass die Anzahl der für diese Prophylaxe infrage kommenden Schwangeren sehr klein ist. Während etwa jede sechste Mutter RhD-negativ ist und somit zumindest initial eine Indikation für eine Anti-D-Prophylaxe aufweist, werden es wohl weniger als 1% aller Schwangeren sein, für die eine Behandlung mit Anti-HPA-1a-IgG infrage käme, wie Kjeldsen-Kragh und Bengtsson in ihrer Übersichtsarbeit berechnet haben.⁴⁰

2.2 Die HPA-Nomenklatur

Die in der Transfusionsmedizin und Transplantationsimmunologie beschriebenen Antigene werden durch das Vorhandensein von humanen Seren mit darin enthaltenden Antikörpern, die gegen diese Antigene gerichtet sind, definiert. Man spricht dabei von Alloantigenen bzw. Alloantikörpern.

Im Jahre 1990 wurde von einer Arbeitsgruppe, zusammengestellt von Experten des Internationalen Komitees für Standardisierungen in der Hämatologie (ICSH) und der Internationalen Gesellschaft für Bluttransfusionen (ISBT), eine Vereinheitlichung der plättchenspezifischen Alloantigene proklamiert. Ursächlich dafür war eine bisher gefundene Vielzahl an Antigenen, die teilweise auch doppelt bezeichnet wurden. In der 1990 erschienenen

Übersicht von von dem Borne und Décary wurden die ersten Regeln für die Umsetzung und auch für die Aufnahme von neuen Antigenen festgelegt:⁴¹

1. Plättchenspezifische Antigensysteme werden HPA genannt: HPA für humane Plättchen-Antigene.
2. Die Systeme werden chronologisch nach dem Datum der Publikation nummeriert.
3. Die zu einem System gehörenden Antigene werden alphabetisch nach ihrer Häufigkeit in der Bevölkerung gekennzeichnet; beginnend mit der höchsten Frequenz.
4. Die Aufnahme von neuen HPA-Systemen bedarf der Zustimmung der Arbeitsgruppe.

Damals wurden fünf HPA-Systeme (HPA-1 bis HPA-5) mit jeweils zwei zueinander antithetischen Antigenen gelistet.

Im Jahre 2003 wurde die Nomenklatur verfeinert, nun unter der Schirmherrschaft des Plättchen-Nomenklatur-Komitees (PNC), das sich aus Mitgliedern der ISBT-Plättchenarbeitsgruppe und dem Wissenschafts-Subkomitee zur Thrombozyten-Immunologie der Internationalen Gesellschaft für Thrombose und Hämostase (ISTH) zusammensetzt.⁴² Zu diesem Zeitpunkt waren bereits 24 verschiedene plättchenspezifische Antigene beschrieben. Eine der wichtigen Neuerungen war die Bestimmung des genetischen Hintergrundes als Voraussetzung für die Aufnahme weiterer Antigene. Außerdem muss seitdem in proteinspezifischen immunologischen Verfahren die Reaktivität des Alloantikörpers zu den Allelformen des Genproduktes gezeigt werden. Die genannten Untersuchungen müssen dabei von zwei Referenzlaboren durchgeführt werden. Von Vorteil ist auch eine Populationsanalyse, am besten ergänzt um einen Stammbaum der Indexfamilie. Für die Errichtung einer lymphoblastoiden Zelllinie sollte ebenfalls Material asserviert werden. Das PNC hat sich zusätzlich dazu verpflichtet, die plättchenspezifischen Antigene, den molekulargenetischen Hintergrund und die bekannten Allele mit zugehörigen Epitopen tabellarisch zu protokollieren und diese Zusammenstellungen zu pflegen.

Bis zum heutigen Tage wurden mittlerweile 41 verschiedene Alloantigene in 35 HPA-Systemen klassifiziert, wobei der Glykoproteinkomplex IIb/IIIa insgesamt die meisten Allele aufweist.⁴³ Fast alle Unterschiede beruhen auf einem einzelnen Nukleotid-Polymorphismus (englisch: *single nucleotide polymorphism*, SNP). Die Systeme HPA-1, -2, -3, -4, -5 und -15 enthalten biallelische Antigene und sind die klinisch relevantesten. Die wichtigsten Merkmale dieser sechs Systeme sind in der Tabelle 5 zusammengefasst.⁴⁴⁻⁵⁰ Weitere Details können der Datenbank der ISBT entnommen werden.⁴³

Tabelle 5: Die sechs wichtigsten HPA-Systeme

HPA	Assoziiertes Genprodukt; CD-Nomenklatur	Polymorphismus (Proteinebene)	Geschätzte Anzahl pro Thrombozyt	Funktion des assoziierten Genproduktes
1	Integrin α Ib β 3 (GP IIb/IIIa): β 3-Kette; CD61	Leu33Pro	80.000 – 100.000	Plättchenadhäsion und - aggregation: v. a. Bindung von Fibrinogen; teilweise Immunabwehr
2	Glykoproteinkomplex Ib/IX/V: α -Untereinheit des GP Ib; CD42b	Thr145Met	25.000 – 35.000	Plättchenadhäsion: v. a. Bindung von von-Willebrand-Faktor
3	Integrin α Ib β 3 (GP IIb/IIIa): α Ib-Kette; CD41	Ile843Ser	80.000 – 100.000	Plättchenadhäsion und - aggregation: v. a. Bindung von Fibrinogen; teilweise Immunabwehr
4	Integrin α Ib β 3 (GP IIb/IIIa): β 3-Kette; CD61	Arg143Gln	80.000 – 100.000	Plättchenadhäsion und - aggregation: v. a. Bindung von Fibrinogen; teilweise Immunabwehr
5	Integrin α 2 β 1 (GP Ia/IIa): α 2-Kette; CD49b	Glu505Lys	ca. 4.000	Plättchenadhäsion: v. a. Bindung von Kollagenfibrillen
15	Glykoprotein CD109; CD109	Ser703Tyr	ca. 2.000*	Unklar: wohl Regulation von TGF- β

* = nach Aktivierung durch Thrombin⁵⁰

2.3 Membranproteine von Thrombozyten

Abgeleitet von Proteosom-Analysen schätzt man, dass etwa 5.000 verschiedene Proteine in bzw. auf Thrombozyten vorkommen.⁵¹ Ein Großteil davon wird bereits von Megakaryozyten synthetisiert oder von ihnen mittels Endozytose aufgenommen. Da Plättchen keinen Zellkern enthalten, findet in ihnen keine Transkription statt. Eine Ausnahme dazu stellt nur die mitochondriale DNA dar. Plättchen können aber die in ihnen enthaltene mRNA zu Proteinen translatieren und ebenfalls Eiweiße aus dem Plasma aufnehmen. Auch ist der Abbau von Proteinen ein entscheidender Aspekt für die Dynamik des Plättchen-Proteosoms. Für die Funktionen von Blutplättchen ist aber nicht nur die Anzahl an Proteinen, sondern vor allem deren posttranslationale Modifikationen entscheidend. Neben Glykosylierungen und Palmitoylierungen sind vor allem Phosphorylierungen von Thyrosin-, Serin- und Threoninresten ein wichtiger Aspekt für Aktivierungsprozesse von Thrombozyten. Die Proteine befinden sich in den verschiedensten Zellkompartimenten, vor allem im Zytosol, in den α - und Dense-Granula sowie in der Zellmembran verankert. Letztgenannte dienen hauptsächlich als Rezeptoren, die durch die Bindung von Liganden an unterschiedlichen Prozessen beteiligt sind. Dabei konnte man Vertreter aus vielen Rezeptorfamilien auf der Thrombozytenmembran nachweisen. In den

letzten Jahren hat man durch Untersuchungen herausgefunden, dass Thrombozyten nicht nur für die primäre Hämostase wichtig sind, sondern auch eine entscheidende Rolle bei der Atherothrombose, bei der Angiogenese, bei Entzündungsprozessen, beim Wachstum und bei der Metastasierung von Tumoren und auch bei der Immunabwehr spielen.⁴⁶ In den folgenden Unterkapiteln sollen die Glykoproteine genauer beleuchtet werden, die in der Transfusionsmedizin und vor allem in der Thrombozytenserologie relevant sind.

2.3.1 Der Glykoproteinkomplex IIb/IIIa (Integrin α IIb β 3)

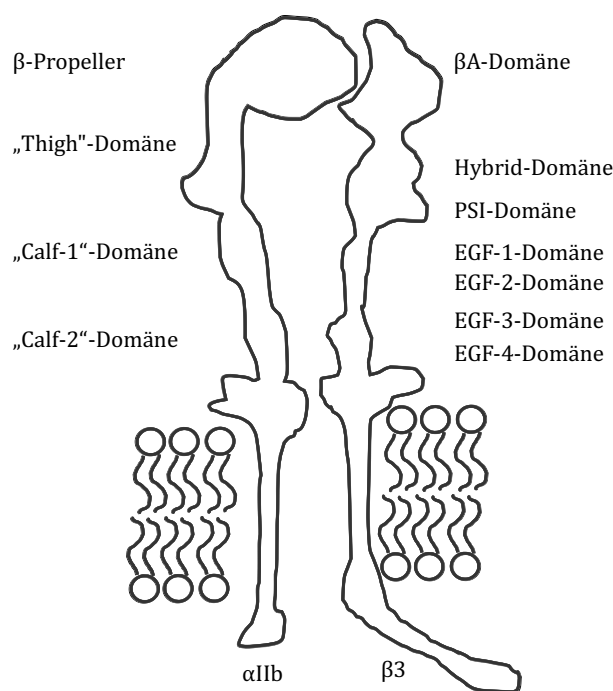
Durch Bindung an Liganden bewirken Integrine Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte. Sie bestehen immer aus zwei Einheiten: einer Alpha- und einer Beta-Kette, die nicht-kovalent miteinander verbunden sind. Dabei gibt es eine Vielzahl an verschiedenen Kombinationen, wobei es beim Menschen nur zwei β 3-Integrine zu geben scheint, nämlich im Zusammenspiel mit entweder einer α IIb- oder einer α v-Kette. Während das Integrin α IIb β 3 physiologisch nur auf Thrombozyten, Megakaryozyten, Mastzellen und basophilen Granulozyten exprimiert wird, kommt α v β 3 auf vielen Zellen vor, vor allem auf Endothelzellen. Im Folgenden soll das Integrin α IIb β 3 in Anlehnung an die Übersichtsarbeiten von Bledzka, Qin und Plow sowie von Clemetson und Clemetson näher beschrieben werden,^{44,46} wobei auch die Bezeichnung Glykoproteinkomplex IIb/IIIa verwendet werden kann. Die Klassifizierung der Glykoproteine mittels römischer Ziffern und Kleinbuchstaben leitet sich vom Bandenverlauf in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ab. Mit etwa 80.000 bis 100.000 Kopien pro Thrombozyt ist α IIb β 3 das quantitativ vorherrschende Zellmembran-Glykoprotein und repräsentiert etwa 3% der Gesamtproteinmasse.⁴⁴

Aufbau des Integrins α IIb β 3

Sowohl die α - als auch die β - Kette können in einen zytoplasmatischen, einen transmembranösen und einen extrazellulären Abschnitt unterteilt werden. Letztgenannte besteht aus mehreren Domänen, welche in Anlehnung an die Übersichtsarbeit von Bledzka, Qin und Plow in Abbildung 3 dargestellt sind.⁴⁴ Vereinfacht kann man sich den extrazellulären Part von α IIb β 3 auch als zwei aus der Zellmembran ragende Stiele - jeweils einer pro Kette - vorstellen, auf welchen sich am distalen Ende ein kugelförmiger Kopf befindet. Dieser setzt sich zusammen aus der β -Propeller-Domäne der α IIb-Kette sowie der β A- und Hybrid-Domäne der β 3-Kette. Beide Stiele sind faltbar, was für die Aktivitätszustände des Integrins wichtig ist. Im Ruhezustand liegen die beiden Stiele dicht beieinander, der Kopf ist abgesenkt, zur Membran gerichtet. Durch ein von innen nach außen übertragenes Signal (englisch: *inside-out-signaling*) kommt es zur Aktivierung des Integrins mit Aufstellung des Kopfes, verursacht durch das „Voneinander-Wegdriften“ der beiden Stiele. Da sich im Kopfteil die Bindungsstelle befindet, wird diese vermehrt freigelegt und das Integrin kann seine Liganden, vornehmlich Fibrinogen und vWF, mit einer deutlich höheren

Affinität binden. Für die Wechselwirkung zwischen Ligand und Integrin sind zusätzlich Metallionen (Mg^{2+} und Ca^{2+}) wichtig, welche in der βA -Domäne der $\beta 3$ -Kette an drei Stellen eingebettet sind. Die Struktur der transmembranösen Domänen der beiden Ketten ist nicht vollständig aufgeklärt. Man nimmt an, dass sie jeweils als helikale Form vorliegen und sich im Winkel von etwa $25-30^\circ$ kreuzen. Beide Ketten interagieren über verschiedene Aminosäuren miteinander, eine Interaktion mit weiteren $\alpha IIb\beta 3$ -Dimeren wird ebenfalls vermutet. Die zytosolischen Domänen beider Ketten sind mit 20 Aminosäuren für αIIb bzw. 47 für $\beta 3$ recht kurz und weisen im Gegensatz zu anderen Membranrezeptoren keine intrinsische katalytische Aktivität auf. Mehrere Aminosäurereste bewirken durch elektrostatische und Wasserstoffbrückenbindungen eine räumliche Nähe beider Ketten im Zytosol, wodurch der Ruhezustand des Integrins aufrechterhalten wird. Man spricht dabei auch von einer Umklammerung der beiden zytosolischen Domänen (englisch: *clasp*ing). Bestimmte Aminosäure-Motive sind für die Bindung von Stabilisatoren wie Filamin oder Aktivatoren wie Talin-1 oder Kindlin-3 verantwortlich.

Abbildung 3: Aufbau des Integrins $\alpha IIb\beta 3$



Schematische Darstellung nach Bledzka, Qin und Plow (aus Platelets, 4. Auflage, Kapitel 12 – Integrin $\alpha IIb\beta 3$)⁴⁴

Aktivierung des Integrins $\alpha IIb\beta 3$

Eine Vielzahl von Mediatoren (wie ADP, vWF, Kollagen, Thrombin) können über Bindung oder Modifikation von spezifischen Rezeptoren Plättchen aktivieren, wobei die dadurch entstehenden Signale mit Hilfe von sekundären Botenstoffen ins Zellinnere transduziert werden. Dadurch kommt es unter anderem zur Formveränderung der Thrombozyten, zur Steigerung der Sekretion der enthaltenen Granula und auch zur Aktivierung des Integrins $\alpha IIb\beta 3$: Durch eine

räumliche Änderung der beiden Untereinheiten wird die Affinität des Fibrinogen-Rezeptors gegenüber seinen Liganden verändert. Im daraus resultierenden hoch-affinen Zustand kann $\alpha\text{IIb}\beta 3$ vor allem divalentes Fibrinogen und auch multivalentes vWF binden, was zur Quervernetzung von Thrombozyten führt und somit die Bildung von Aggregaten fördert.⁴⁴

Bedeutung des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta 3$ in der Medizin

Störungen in dem hochkomplexen Ablauf der Plättchenaktivierung können einerseits zu einer erhöhten Thromboseneigung führen oder umgekehrt auch eine hämorrhagische Diathese begünstigen, wie zum Beispiel bei der Glanzmann-Thrombasthenie. Hierbei führen Mutationen in den Genen für die αIIb - oder $\beta 3$ -Kette zu qualitativen oder quantitativen Defekten des Integrins.⁵² Die Patienten leiden oft an Schleimhautblutungen, wobei das Krankheitsbild im Vergleich zum Bernard-Soulier-Syndrom weniger stark ausgeprägt ist.

In der Thrombozytenserologie nimmt das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ eine übergeordnete Rolle ein: 27 der aktuell bekannten 35 HPA-Systeme sind durch Polymorphismen in den beiden zugehörigen Genen bedingt.⁴³ Vor allem das HPA-1-System auf der $\beta 3$ -Kette ist bei Europäern für einen Großteil der alloimmun verursachten Thrombozytopenien verantwortlich. Darüber hinaus ist der Glykoproteinkomplex IIb/IIIa auch Zielort von Autoantikörpern beim Krankheitsbild der autoimmunen Thrombozytopenie (AITP).

2.3.2 Der Glykoproteinkomplex Ib/IX/V

Dieser Komplex kommt mit einer Anzahl von etwa 30.000 Kopien je Plättchen am zweithäufigsten auf der Thrombozytenmembran vor.⁴⁵ Dabei ist er im weitesten Sinne als Heteropentamer zu verstehen, bestehend aus den Untereinheiten GP Ib α , GP Ib β , GP IX und GP V, wobei eine GP-Ib α -Untereinheit mittels Disulfidbrücken mit zwei GP-Ib β -Untereinheiten verbunden ist. Außerdem besteht eine nicht kovalente Verbindung des Glykoproteins Ib mit dem GP IX und - wenn auch deutlich weniger stark - mit dem GP V. Jede Untereinheit wird jeweils von einem eigenen Gen kodiert und stellt ein eigenes transmembranöses Protein vom Typ I dar.

Der Glykoproteinkomplex Ib/IX/V scheint eine Vielzahl an Funktionen wahrzunehmen: Bezüglich der Hämostase ist vor allem die Bindung von vWF und die damit einhergehende Plättchenadhäsion, -aktivierung und -aggregation hervorzuheben. Auch Thrombin kann über den GP-Komplex Ib/IX eine Signaltransduktion auslösen. Diese wird durch die thrombin-abhängige Spaltung des Glykoproteins V sogar noch verstärkt. Im Zusammenspiel mit weiteren ligandenbindenden Rezeptoren auf der Thrombozytenmembran bewirkt der GP-Komplex Ib/IX/V unter anderem die Aktivierung des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta 3$. Zusätzlich scheinen diese Glykoproteine auch beim Thrombozytenabbau und bei der Thrombozytopoese eine wichtige Rolle zu spielen: Dunois-Lardé et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass die in-vitro-Bildung von

Thrombozyten deutlich erhöht ist, wenn Megakaryozyten einer erhöhten Scherkraft ausgesetzt sind.⁵³ Dabei wird angenommen, dass über die Interaktion von vWF und dem GP-Komplex Ib/IX/V auf Megakaryozyten diese mechanischen Kräfte ins Zellinnere transduziert und somit Prozesse für die Proplättchenbildung und Abschnürung dieser ausgelöst werden. Dieses Szenario scheint auch in vivo realistisch zu sein, da im Knochenmark die zytoplasmatischen Ausläufer von Megakaryozyten in Gefäße der Mikrozirkulation reichen können und die Proplättchenbildung in den hämatopoetischen Nischen normalerweise nicht gesehen wird. Auch beim Abbau von Plättchen im retikuloendothelialen System scheint der GP-Komplex Ib/IX/V beteiligt zu sein.

Der Ib-IX-Komplex kann außerdem Angriffspunkt von Autoantikörpern beim Krankheitsbild der AITP sein. Auch gegen GP V gerichtete Autoantikörper wurden beschrieben.⁵⁴ Darüber hinaus sind SNPs in den für die Glykoproteine Ib α , Ib β und IX kodierenden Genen für die Ausprägung von aktuell vier verschiedenen Alloantigenen verantwortlich: HPA-2a und -2b auf dem GP Ib α , sowie die niedrigfrequenten Antigene HPA-12bw auf dem GP Ib β bzw. HPA-31bw auf dem GP IX.⁴³

2.3.3 Der Glykoproteinkomplex Ia/IIa (Integrin $\alpha 2/\beta 1$)

Dieser Glykoproteinkomplex gehört zur Familie der $\beta 1$ -Integrine und ist nach $\alpha \text{IIb}\beta 3$ das zweitwichtigste auf der Thrombozytenmembran. Es weist mit etwa 4.000 Kopien je Plättchen eine deutlich geringere Dichte als die GP-Komplexe IIb/IIIa und Ib/IX/V auf.⁴⁶

Wie andere Integrine auch besteht der Glykoproteinkomplex Ia/IIa aus einer α - und einer β -Kette, nämlich $\alpha 2$ und $\beta 1$. Im Unterschied zu αIIb besitzt $\alpha 2$ eine zusätzliche, eingefügte I-Domäne (englisch: *inserted domain*) im N-terminalen Bereich, die über den β -Propeller hinausragt und für die Kollagenanlagerung verantwortlich ist. Auch beim Integrin $\alpha 2\beta 1$ nimmt man an, dass es in mehreren Konformationszuständen vorkommt, die unterschiedliche Affinitäten zu den Liganden aufweisen.⁵⁵

Die Hauptfunktion des Glykoproteinkomplex Ia/IIa liegt in der Bindung von Kollagen. Da auch das Glykoprotein VI ein wichtiger Ligand für dieses Strukturprotein ist, erscheint es schwierig, die beiden Reaktionswege klar voneinander zu trennen. Auch der zeitliche Ablauf der Kollagenbindung durch diese beiden Rezeptoren kann bisher nicht sicher definiert werden.

Autoantikörper gegen den Glykoproteinkomplex Ia/IIa sind im Rahmen von Autoimmunthrombozytopenien bisher nicht beschrieben worden. Allerdings sind SNPs im Gen für die $\alpha 2$ -Kette für die Ausprägung von fünf Alloantigenen verantwortlich: HPA-5a, -5b, -13bw, -18bw und -25bw,⁴³ wobei Antikörper aus dem HPA-5-System am häufigsten vorkommen.

2.3.4 Das Glykoprotein CD109

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Membranrezeptoren ist vom Glykoprotein CD109 weniger viel bekannt. Es ist ein Vertreter der α 2-Makroglobulin/C3/C4/C5-Familie und wird vorwiegend auf durch Phytohämagglutinine aktivierten T-Lymphozyten, durch Thrombin aktivierten Thrombozyten, Endothelzellen, einigen hämatopoetischen Progenitorzellen inklusive Megakaryozytenvorläuferzellen, einer Untergruppe von myoepithelialen Zellen und vor allem auf malignen Tumorzellen exprimiert.⁴⁹ Das translatierte Vorläuferprotein wird im endoplasmatischen Retikulum mit einem Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) verknüpft, anschließend O-glykolisiert und letztendlich durch Furin in zwei Fragmente gespalten, die sowohl einzeln als auch als Komplex auf der Zellmembran exprimiert und teilweise sogar sezerniert werden. CD109 kann sowohl als gebundene als auch als lösliche Form den TGF- β -Rezeptor, TGF- β selbst und auch weitere Proteine binden und beeinflusst auf diesem Wege den TGF- β -Signalweg und scheint darüber hinaus an der Tumorbildung und -progression sowie an der Metastasierung von malignen Zellen beteiligt zu sein.⁴⁹ Ob CD109 in Thrombozyten eine weitere Funktion besitzt, ist aktuell noch unklar.

Aufgrund der GPI-Verankerung ist das Glykoprotein CD109 wie andere so mit der Zellmembran verknüpfte Proteine (zum Beispiel DAF und CD59) bei der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie betroffen. Autoantikörper im Rahmen autoimmuner Thrombozytopenien sind bisher nicht beschrieben worden. Für die Thrombozytenserologie spielt CD109 dennoch eine große Rolle, da durch Basenaustausch verursachte Polymorphismen im zugehörigen Gen für die Ausprägung der beiden Alloantigene Gov(a) und Gov(b) verantwortlich sind. In der HPA-Nomenklatur entsprechen diese HPA-15b bzw. -15a. Antikörper gegen beide Alloantigene sind verantwortlich für alloimmun verursachte Thrombozytenstörungen, vor allem für Refraktärzustände nach Transfusion von Thrombozyten und für fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenien. Es wurde darüber hinaus ein Fall einer posttransfusionellen Purpura beschrieben, der wahrscheinlich durch einen Antikörper mit der Allospezifität Anti-HPA-15a verursacht wurde.⁵⁶ Die Detektion von Antikörpern gegen HPA-15a und -15b kann sehr herausfordernd sein, da die Kopienzahl vom GP CD109 sehr stark vom Aktivierungszustand des Thrombozyten abhängig ist, es starke interindividuelle Unterschiede bezüglich der Expression gibt und das Glykoprotein im Laufe der Zeit instabil wird.⁵⁷

2.3.5 Das Glykoprotein IV

Das Glykoprotein IV (CD36) spielt wie die zuvor beschriebenen Glykoproteinkomplexe IIb/IIIa, Ia/IIa und Ib/IX/V eine Rolle bei der Plättchenadhäsion und -aktivierung, wobei es die Bindung der Thrombozyten vor allem an Kollagenfibrillen steuert. Für das Glykoprotein IV sind bisher keine Alloantigene aus den bekannten HPA-Systemen beschrieben worden, allerdings spielt es in

einzelnen Fällen eine Rolle in der Thrombozytenimmunhämатologie: Vor allem Personen mit asiatischer oder afrikanischer Abstammung weisen mit einer Wahrscheinlichkeit von bis zu 10% eine Defizienz bezüglich GP IV auf⁵⁸, wobei es auch zur Immunisierung kommen kann. In der Literatur wurde dieses Antigen als Nak(a) bezeichnet und die zugehörigen Isoantikörper können für Refraktärzustände nach Thrombozytentransfusion verantwortlich sein. Auch im Rahmen von Fällen mit posttransfusioneller Purpura und als Ursache für fetale und neonatale isoimmune Thrombozytopenien sind Anti-Nak(a)-Antikörper publiziert worden.^{59,60}

2.4 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

Auch wenn bereits viele Teilaspekte der fetalen und neonatalen Alloimmunthrombozytopenie aufgeklärt werden konnten, gibt es weiterhin noch offene Fragen. Ein wichtiger Aspekt für zukünftige Untersuchungen wird das frühzeitige Erkennen gefährdeter Kinder und ihrer Mütter sein. Eine adäquate Risikostratifikation wäre aus mehreren Gründen, u. a. aus ökonomischer Sicht, ebenfalls sinnvoll; v. a. dann, wenn eine Immunprophylaxe mit NAITgam zur Verfügung stehen sollte (siehe Abschnitt 2.1.7).

Diese Arbeit mit ihren zwei separaten Studien soll zur Abschätzung des fetalen Blutungsrisikos beitragen. Dabei wird betrachtet, ob es in den letzten zwölf Jahren (von 2007 bis 2018) Veränderungen gab, die serologische und klinische Befunde betreffen. Vor allem das Verhältnis von HPA-Antikörperspezifitäten und die Assoziation mit intrakraniellen Blutungen sollen dabei im Mittelpunkt stehen. Diese Befunde sollen anschließend mit aus vorherigen Studien erhobenen Daten verglichen werden.

Außerdem sollen die durch ein Anti-HPA-1a ausgelösten NAIT-Fälle genauer analysiert werden: Anhand der experimentell ermittelten Antikörperkonzentration sollen eventuelle Assoziationen zu wichtigen klinischen Symptomen - v. a. Blutungszeichen - und darüber hinaus zur neonatalen Thrombozytenzahl untersucht werden. So soll geklärt werden, ob die Messung der Antikörperkonzentration von maternalem Anti-HPA-1a zur Beurteilung des Blutungsrisikos beim Neugeborenen geeignet ist.

3 Methoden und Material

In dieser Arbeit wurden zwei Fragestellungen bearbeitet: Einerseits wurden die vollständig vorhandenen Unterlagen zur FNAIT-Diagnostik dahingehend analysiert, welche Spezifitäten die maternalen Antikörper in den eingesandten Proben mit der Fragestellung einer fetalen oder neonatalen Thrombozytopenie im Zeitraum von 2007 bis 2018 hatten (Kapitel 3.1). Bei der Anti-HPA-1a-Studie wurde andererseits untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der experimentell bestimmten Konzentration des maternalen HPA-1a-Antikörpers und der Ausprägung der Thrombozytopenie beim Kind gab (Kapitel 3.2).

3.1 FNAIT-Studie

Diese Studie ist eine retrospektive Auswertung von Einsendungen und Laborresultaten zu Patientenproben, die mit dem klinischen Verdacht oder zum Ausschluss einer fetalen oder neonatalen Alloimmunthrombozytopenie ins thrombozytenserologische Labor des Instituts für Transfusionsmedizin an der Universitätsmedizin Rostock geschickt worden sind. Dabei wurde der Zeitraum vom 01.01.2007 bis zum 31.12.2018 berücksichtigt.

3.1.1 Untersuchungsmaterial

Am Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Rostock wird bereits seit mehreren Jahren die thrombozytenimmunologische Diagnostik bei Neugeborenen mit Thrombozytopenien durchgeführt. Bei der Fragestellung einer FNAIT wurde routinemäßig immer das maternale Serum im indirekten MAIPA-Ansatz sowohl auf Antikörper gegen die Glykoproteinkomplexe IIb/IIIa, Ib/IX/V und Ia/IIa als auch gegen HLA-Klasse-I-Merkmale getestet. Für Letztgenanntes wurden im MAIPA-Test ein monoklonaler Antikörper gegen das β 2-Mikroglobulin und ein Poolansatz von Thrombozyten verwendet, welcher aus acht Spendern mit den häufigsten HLA-A- und HLA-B-Antigenen bestand. Zusätzlich wurden stets mittels kommerzieller SSP-PCR die HPA-Merkmale für HPA-1, -2, -3, -4, -5 und -15 bestimmt. Bei Vorhandensein einer kindlichen Blutprobe wurde diese Analyse auch für das Neugeborene durchgeführt. Sollte darüber hinaus auch eine paternale Blutprobe eingegangen sein, wurde neben der molekulargenetischen HPA-Typisierung des Vaters auch ein Kreuztest zwischen maternalem Serum und paternalen Thrombozyten angesetzt. Auf diese Weise können auch Antikörper gegen niederfrequente Antigene aufgedeckt werden.²²

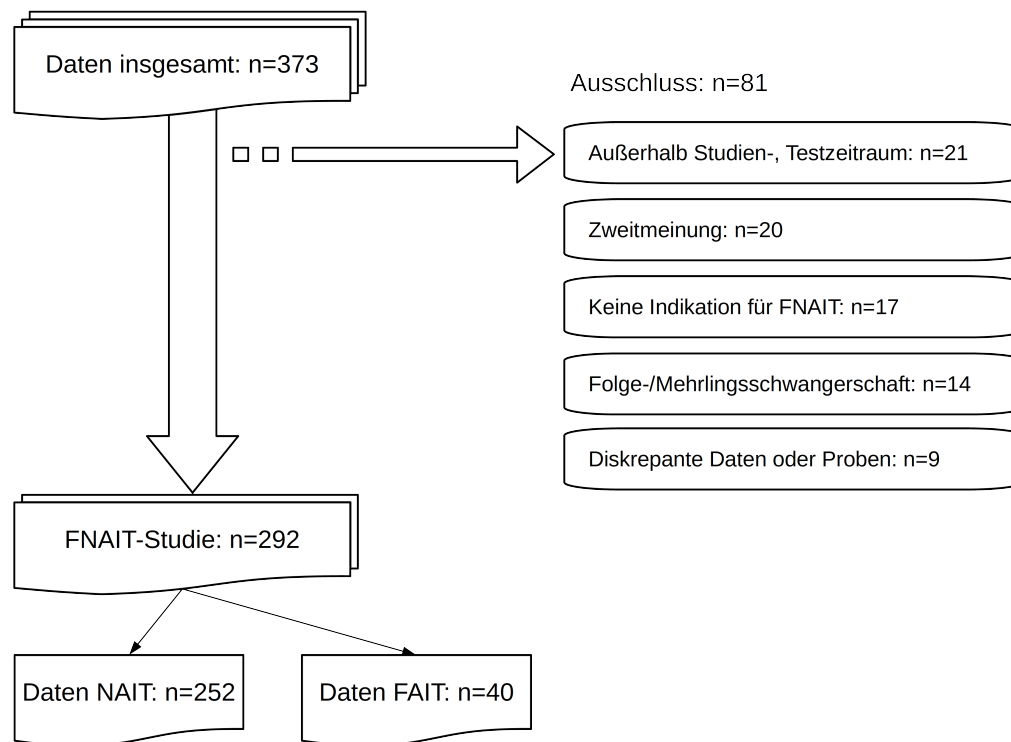
Bei entsprechenden Befundkonstellationen wurden weitere Untersuchungen nachgesetzt: Bei Inkompatibilitäten im HPA-3-System wurde das maternale Serum im PIFT-Test untersucht, bei Inkompatibilitäten im HPA-15-System der MAIPA-Test um die Detektion von Antikörpern gegen

das Glykoprotein CD109 ergänzt. Teilweise erfolgte auch eine Spezifizierung der maternalen HLA-Antikörper. Wenn genügend Material vorhanden war, wurden darüber hinaus die maternalen Thrombozyten auf eine vermehrte IgG-Beladung mittels direktem MAIPA-Test untersucht. Außerdem erfolgte zusätzlich zur ABD-Kurzbestimmung jeder eingesandten Probe eine Bestimmung des Blutbildes und eine grob orientierende Durchsicht des Blutausstriches der jeweiligen Familienmitglieder, wobei besonders auf morphologische Auffälligkeiten der Thrombozyten geachtet wurde, wie sie bei Patienten mit hereditären Thrombozytopenien vorkommen können.

3.1.2 Einschluss- und Ausschlusskriterien

In der Abbildung 4 ist der Ablauf der initialen Bewertung der Daten als Flussdiagramm dargestellt.

Abbildung 4: Flussdiagramm zur Datenakquirierung der FNAIT-Studie



FAIT = fetale Alloimmunthrombozytopenie, FNAIT = fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie, NAIT = neonatale Alloimmunthrombozytopenie

Von den ursprünglichen 373 Datensätzen mussten insgesamt 81 ausgeschlossen werden. Sehr häufig betraf es Einsendungen, bei denen bereits in externen Laboren die Diagnose oder Verdachtsdiagnose einer FNAIT erhoben worden ist und bei denen nur eine ergänzende Labordiagnostik vor Ort vorgenommen werden sollte (n=20). Auch befanden sich Datensätze darunter, bei denen letztendlich keine Indikation zur Abklärung einer aktuellen FNAIT bestand (n=17) oder die außerhalb des gewählten Zeitraums von Anfang 2007 bis Ende 2018 lagen

(n=21). Ebenfalls wurden die Fälle ausgeschlossen, die im Rahmen einer Folge- oder Mehrlingsschwangerschaft bei bereits bekanntem Alloantikörper untersucht worden sind (n=14). Bei neun Fällen waren entweder die zugehörigen Patientendaten nicht eindeutig zuzuordnen oder aber das zu untersuchende Material nicht geeignet wie zum Beispiel aufgrund hämolytischer Proben. Auch diese Fälle wurden nicht für die Studie gewertet (n=9). Insgesamt konnten somit 292 Datensätze in die FNAIT-Studie eingeschlossen werden. Bei 40 Fällen wurde die Diagnostik bereits während der Schwangerschaft eingeleitet, da bei der sonografischen Vorsorgeuntersuchung intrakranielle Auffälligkeiten beim Feten festgestellt wurden. Diese Teilgruppe („FAIT-Abklärung“) wurde separat betrachtet (siehe auch Kapitel 4.1.3 und 5.4).

3.1.3 Statistische Auswertung

Die initiale Zusammenstellung der einzelnen Daten in anonymisierter Form erfolgte mit Excel von der Fa. Microsoft. Mit dem Programm R, Version 4.0.4 (Ihaka und Gentleman, 1996), wurden die Daten anschließend statistisch ausgewertet und entsprechende Grafiken erstellt.⁶¹

Zum Vergleich von Häufigkeiten einer dichotomen Variablen in einer Stichprobe wurde der Binomialtest verwendet.⁶² Mit diesem statistischen Test wurde vor allem geprüft, ob in entsprechenden Stichproben RhD-negative (Kapitel 4.1.1) oder HPA-1a-negative Mütter (Kapitel 4.1.2) überzufällig selten bzw. häufig vertreten waren. Beim Vergleich von ermittelten Häufigkeiten entsprechender Antikörperspezifitäten mit Daten aus historischen Studien (Kapitel 5.2) kam der exakte Test nach Fisher zur Anwendung.⁶³ Zugehörige 95%-Konfidenzintervalle wurden jeweils mithilfe der Agresti-Coull-Methode berechnet.⁶⁴

3.2 Anti-HPA-1a-Studie

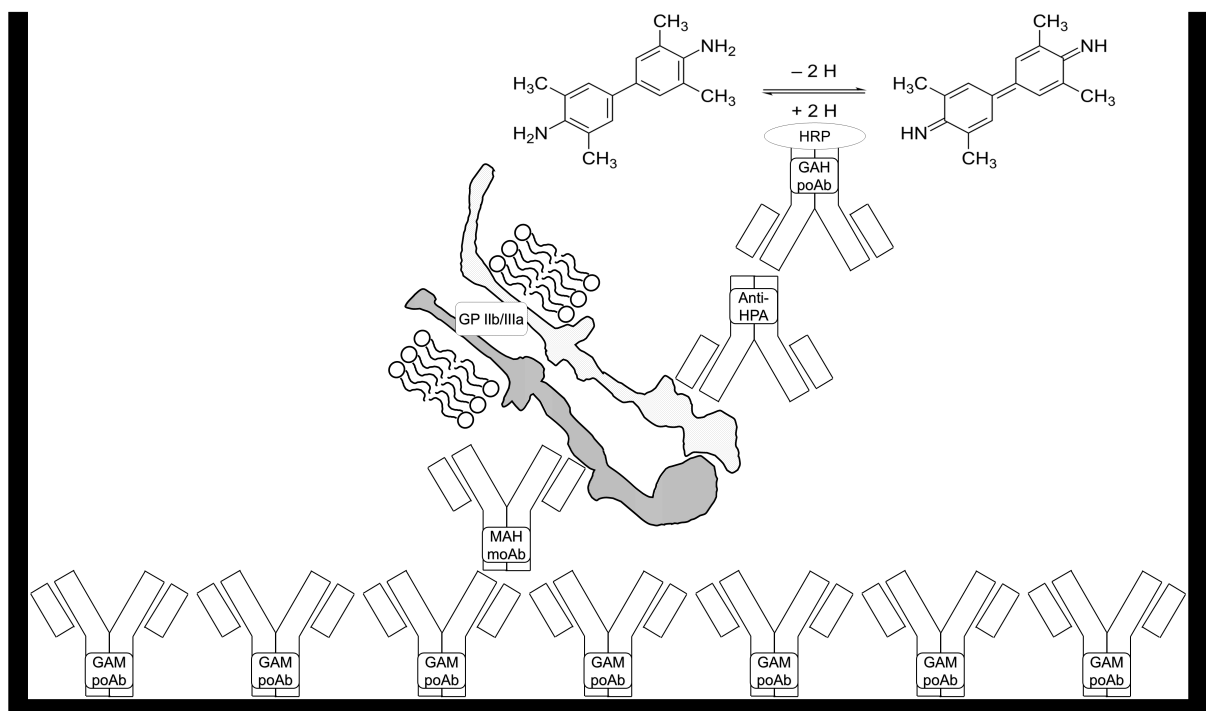
Bei dieser Studie wurden von bekannten NAIT-Fällen - verursacht durch ein Anti-HPA-1a - entsprechende, asservierte Serumproben getestet. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte im indirekten MAIPA-Ansatz unter Vergleich der Extinktionswerte mit einem Anti-HPA-1a-Standard. Klinische Daten der Neugeborenen wurden zusammen mit den experimentell gewonnenen Konzentrationsangaben statistisch ausgewertet.

3.2.1 Indirekter MAIPA-Test

Der indirekte MAIPA-Test (MAIPA = monoklonale antikörperspezifische Immobilisierung von Plättchen-Antigenen) ist ein glykoproteinspezifischer ELISA unter Verwendung von spezifischen monoklonalen Antikörpern, die gegen Epitope von entsprechenden Antigenen gerichtet sind.⁶⁵ Im Gegensatz zu anderen plättchenspezifischen Testverfahren kann mit dem MAIPA-Test eine gezielte Immunglobulinbeladung der relevanten Glykoproteine untersucht werden, unspezifische Anlagerungen werden somit weitestgehend vermieden.⁶⁶ Im indirekten Ansatz

kann unter Verwendung von bekannten Testthrombozyten das Serum des Patienten auf das Vorhandensein von Auto-, Iso- oder Alloantikörpern untersucht werden. Zur Bestimmung einer Alloantikörper-Spezifität verwendet man Testthrombozyten mit verschiedenen Alloantigenen. Da nicht nur Thrombozyten von Spendern, sondern auch von Vätern bei der Abklärung von fetalen und neonatalen Alloimmunthrombozytopenien verwendet werden können, eignet sich der MAIPA auch zur Detektion von Antikörpern gegen niedrigfrequente oder gar unbekannte Alloantigene.⁶⁶ Das Prinzip des indirekten MAIPA-Testes wird in der Abbildung 5 schematisch dargestellt.

Abbildung 5: Prinzip des indirekten MAIPA-Tests



Schematische Darstellung der antikörperbedingten Immobilisation von plättchenspezifischen Antigenen und der enzymatischen Reaktion mithilfe eines sekundären Antikörperkonjugats beim indirekten MAIPA-Test

Das Glykoprotein IIb/IIIa wurde in Anlehnung an die Arbeit von Bledzka, Qin und Plow (aus Platelets, 4. Auflage, Kapitel 12 - Integrin α IIb β 3)⁴⁴ dargestellt;

GAH = *goat-anti-human*, GAM = *goat-anti-mouse*, GP = Glykoprotein, HPA= Humanes Plättchen-Antigen, HRP = Meerrettichperoxidase, MAH = *mouse-anti-human*, moAb = monoklonaler Antikörper, poAb = polyklonaler Antikörper

Dabei wird das zu untersuchende Serum des Patienten in mehreren Ansätzen mit verschiedenen Testthrombozyten von Spendern mit bekannten Alloantigenen inkubiert. Außerdem wird für jeden Ansatz ein spezifischer monoklonaler IgG-Antikörper murinen Ursprungs hinzugegeben. Dieser Maus-Anti-Mensch-Antikörper (englisch: *mouse-anti-human monoclonal antibody* = MAH-moAb) ist gegen ein festgelegtes Epitop humaner Glykoproteine gerichtet und bindet an dieses auf der Zellmembran der Thrombozyten. Durch Hinzugabe eines Solubilisationspuffers wird die Zellmembran der Thrombozyten zersprengt. Sollte das Serum des Patienten einen plättchenspezifischen Antikörper enthalten, befindet sich nach Zentrifugation ein Heterotrimer bestehend

aus Patientenantikörper, Glykoprotein und Maus-Anti-Human-Antikörper im Überstand. Dieser Komplex kann durch einen weiteren Antikörper immobilisiert werden. Dafür wird ein polyklonaler Ziege-gegen-Maus-Antikörper (englisch: *goat-anti-mouse polyclonal antibody* = GAM-poAb) verwendet, der gegen das Fc-Fragment muriner IgG-Antikörper gerichtet ist und zuvor auf einer Mikrotiterplatte mit hoher Bindungskapazität fixiert wurde. Dieses somit gebundene - nun - Heterotetramer kann wie für Immunoassays typisch anschließend mittels Konjugat-Substrat-Reaktion nachgewiesen werden. Hierfür wird ein weiterer Antikörper, nämlich ein Ziege-gegen-Mensch-Antikörper (englisch: *goat-anti-human polyclonal antibody* = GAH-poAb), hinzugegeben, an welchem ein Reporterenzym gekoppelt ist. In den meisten Fällen handelt es sich bei diesem Immunkonjugat um eine Meerrettichperoxidase (englisch: *horseradish peroxidase* = HRP), die zum Beispiel das Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin oxidieren kann. Um die Reaktion abzustoppen, wird in der Regel Schwefelsäure verwendet. Der Farbumschlag des chromogenen Substrates kann im Photometer quantifiziert werden.

3.2.2 Modifizierung des indirekten MAIPA-Tests

Da nur Seren mit bekannten Anti-HPA-1a-Antikörpern untersucht wurden, wurde der von Kiefel beschriebene MAIPA-Test^{65,66} wie folgt modifiziert: Statt verschiedener Testthrombozyten wurden stets nur Thrombozyten eines Donors mit dem Phänotyp HPA-1(a+b-) verwendet. Aufgrund der Bindung von Anti-HPA-1a an die β 3-Kette des Glykoproteinkomplexes IIa/IIIa wurde nur ein monoklonaler Maus-Anti-Mensch-Antikörper namens „P2“ benötigt. Von den Seren der Probandinnen wurde mittels geometrischer Reihe jeweils eine Verdünnungsreihe angelegt. Zur Bestimmung der Konzentration des Antikörpers lief bei jedem Versuch zusätzlich die Testung einer Verdünnungsreihe von einem Anti-HPA-1a-Standard mit.

Geräte und Materialien

- Zentrifuge Rotina 48R (Fa. Hettich)
- Zellzählgerät KX-21 (Fa. Sysmex)
- Mikrotiterplatten-Schüttler (Fa. Heidolph)
- Mikrotiterzentrifuge Universal 320 (Fa. Hettich)
- Wärmeinkubator (37 °C)
- Mikrotiterplattenphotometer HT III (Fa. Anthos Labtec Instruments)
- Multipette E3 und Multipette Plus (Fa. Eppendorf)
- Mehrkanalpipette Research Plus (Fa. Eppendorf)
- Pipettenspitzen in verschiedenen Größen (Fa. Eppendorf)
- Achtkanal-Dispenser (Fa. Brand)
- Transferpipetten (Fa. Sarstedt)
- Mikrotitertestplatte, 96 Kavitäten, runder Boden (Fa. Sarstedt)
- Mikrotitertestplatte, 96 Kavitäten, F-Form mit hoher Bindungskapazität (Fa. Greiner)
- EDTA-Monovetten (Fa. Sarstedt)
- Polystyrolröhrchen mit Schraubverschluss 12 ml (Fa. Greiner) = PS-Greiner
- Sarstedt-Röhrchen 1,5 ml (Fa. Sarstedt)

Reagenzien

- Natriumazidlösung 0,1%
- EDTA-Natriumchloridlösung 0,5%
- Rinderalbumin 30% (Fa. Biotest) = BSA
- Natriumchloridlösung 0,9% (Fa. Braun)
- Ziege IgG anti-Maus IgG (Fc)-unkonj. (Art.-Nr.: 115-005-071; Fa. Dianova) = GAM
- Ziege IgG anti-Human IgG (Fc)-HRPO (Art.-Nr.: 109-035-098; Fa. Dianova) = GAH-HRP
- CD41-UNLB, P2, 0.2 mg, RUO (Art.-Nr.: IM0145; Fa. Beckman-Coulter) = P2
- WHO International Standard Anti-HPA-1a 100IU (Nr.: 03/152; NIBSC) = REF
- Positives Kontrollserum mit bekanntem Anti-HPA-1a-Antikörper
- 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin = TMB One (Fa. Kementec)
- Aqua dest.
- Schwefelsäure (1,8 mol/l)

Pufferlösungen

- Coating-Puffer (pH=9,6)
 - Natriumcarbonat, wasserfrei: 1,59 g
 - Natriumhydrogencarbonat: 4,20 g
 - Natriumazid: 0,20 g
 - mit Aqua dest. zu 1000 ml
- PBS-Puffer nach Dulbecco (pH=7,2)
 - Natriumchlorid: 8,67 g,
 - Kaliumchlorid: 0,20 g,
 - Dinatriumhydrogenphosphat · 2 H₂O: 1,15 g,
 - Kaliumdihydrogenphosphat: 0,20 g,
 - mit Aqua dest. zu 1000 ml
- PBS-BSA 2%
 - Rinderalbumin 30%: 1 ml
 - PBS-Puffer nach Dulbecco pH=7,2: 14 ml
- Solubilisationspuffer (pH = 7,4)
 - Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid: 1,21 g,
 - Triton X-100: 5 ml
 - mit isotonischer Natriumchlorid-Lösung zu 1000 ml
- TBS-Puffer
 - Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid: 1,21 g
 - Triton X-100: 5,0 ml,
 - Polysorbat 20 („Tween 20“): 0,5 ml
 - Calciumchloridlösung (25 mmol/l): 20 ml
 - mit isotonischer Natriumchlorid-Lösung zu 1000 ml

Serumproben

Es wurden nur Proben von Müttern berücksichtigt, die bereits routinemäßig zur Abklärung von FNAIT-Fällen im Labor im Zeitraum von 2007 bis 2018 untersucht worden sind und von denen entsprechende Rückstellmuster vorlagen. Für die Testung im Rahmen dieser Studie wurde ein Ethikantrag gestellt, welcher von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Rostock bewilligt wurde (Registriernummer: A 2019-0139).

Referenzmaterial

Zur Konzentrationsbestimmung des Anti-HPA-1a-Antikörpers in den maternalen Seren wurde ein internationaler Anti-HPA-1a-Standard der WHO mit dem Code „NIBSC 03/152“ verwendet. Dabei handelt es sich um eine gepoolte Probe gefriergetrockneter Plasmen von sechs gegen HPA-1a immunisierten Spendern aus dem Vereinigten Königreich, die keine weiteren Antikörper gegen HPA- oder HLA-Klasse-I-Antigene aufgewiesen haben.⁶⁷ Der Ampulleninhalt wurde nach Anleitung mit 1 ml Aqua dest. unter vorsichtigem Schwenken rekonstituiert, so dass eine Konzentration von 100 IU/ml erzielt wurde. Zur mehrfachen Herstellung von Verdünnungsreihen wurde die Antikörpersuspension zu Proben à 70 µl aliquotiert und bei -30 °C gelagert.

Gewinnung von Testthrombozyten

Vor der eigentlichen Testung müssen Testthrombozyten mittels Differentialzentrifugation so hergestellt werden, dass sie auch über einen längeren Zeitraum gelagert werden können. Dafür wird zunächst eine mit EDTA antikoagulierte Blutprobe eines Spenders (Phänotyp HPA-1(a+b-)) mit Natriumchlorid-Lösung im Verhältnis 1:1 verdünnt, um anschließend dieses Gemisch mit geringer Zentrifugalkraft zu zentrifugieren (~ 150 g, 20 min, ungebremst). Der Überstand, das plättchenreiche Plasma, wird mit einer Transferpipette vorsichtig in ein PS-Greiner überführt und mit 0,5%iger EDTA-Natriumchlorid-Lösung aufgefüllt. Anschließend erfolgt eine erneute Zentrifugation (~ 2000 g, 10 min). Der Überstand wird verworfen und das Pellet zwei Mal mit Natriumchlorid-Lösung gewaschen, dabei werden die gleichen Zentrifugationsdaten wie zuvor verwendet. Zum Schluss werden die Thrombozyten in 0,1%iger Natriumazidlösung resuspendiert. Die Plättchenzahl wird mittels Zellzählgerät ermittelt und dokumentiert. Die so gewonnenen Testthrombozyten sollten für mindestens zwölf Stunden bei 4 °C gelagert und können insgesamt bis zu sechs Monate verwendet werden.

Testdurchführung

Zur Beschichtung der Mikrotiterplatte mit hoher Bindungskapazität mit dem Ziege-gegen-Maus-IgG-Antikörper (GAM) wird zunächst eine Lösung aus 11 ml Coating-Puffer und 23 µl GAM hergestellt. Hiervon werden anschließend jeweils 100 µl in die einzelnen Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert. Die abgedeckte Platte wird über Nacht bei 4 °C oder mindestens drei Stunden bei Raumtemperatur gelagert, um eine ausreichend hohe Bindung zu ermöglichen.

Von den zu untersuchenden Seren der Probandinnen und vom WHO-Standard Anti-HPA-1a (REF) werden jeweils Verdünnungsreihen angelegt. Dafür werden jeweils 70 µl PBS-BSA in beschriftete Sarstedt-Röhrchen vorgelegt. 70 µl der unverdünnten Probe werden in das erste Röhrchen unter mehrmaligem Mischen pipettiert. Mit einer neuen Pipettenspitze werden aus

diesem Gefäß erneut 70 µl in das nächste Röhrchen überführt. Dieses Vorgehen wird bis zur letzten Verdünnungsstufe fortgesetzt.

Pro Testansatz werden 20×10^6 Thrombozyten in die Kavitäten der Mikrotiterplatte mit rundem Boden vorgelegt und einmal mit der isotonischen Natriumchloridlösung gewaschen (Zentrifugation: ~ 1.300 g, 2 min). Die Überstände werden kräftig ausgekippt und die Platten kurz umgekehrt auf ein Papierhandtuch gedrückt, um Flüssigkeitsreste aus den Vertiefungen der Mikrotiterplatte weitgehend zu entfernen. Die Thrombozyten werden anschließend umgehend in 30 µl PBS-BSA resuspendiert. Von den Seren und vom REF bzw. deren Verdünnungsstufen werden jeweils 50 µl in die einzelnen Kavitäten hinzupipettiert und mittels Mikrotiterplatten-Schüttlers vermischt (~ 900 rpm, 2 min). Eine Kontrollzelle mit dem positiven Anti-HPA-1a-Serum wird als Positivkontrolle mitgeführt. Die Ansätze werden anschließend bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit 50 µl Natriumchlorid-Lösung werden die Thrombozyten erneut in 30 µl PBS-BSA resuspendiert und mit 10 µl des monoklonalen Maus-Anti-Human-Antikörpers (P2) versetzt. Es erfolgt eine weitere Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten. Vor der Solubilisierung werden die Thrombozyten drei Mal mit der Natriumchlorid-Lösung gewaschen und jeweils in 30 µl PBS-BSA resuspendiert. Für die Lyse der Plättchen werden 100 µl Solubilisationspuffer in die Kavitäten hinzupipettiert und die Ansätze für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Das Solubilisat wird anschließend bei 4 °C zentrifugiert (15.000 g, 30 min).

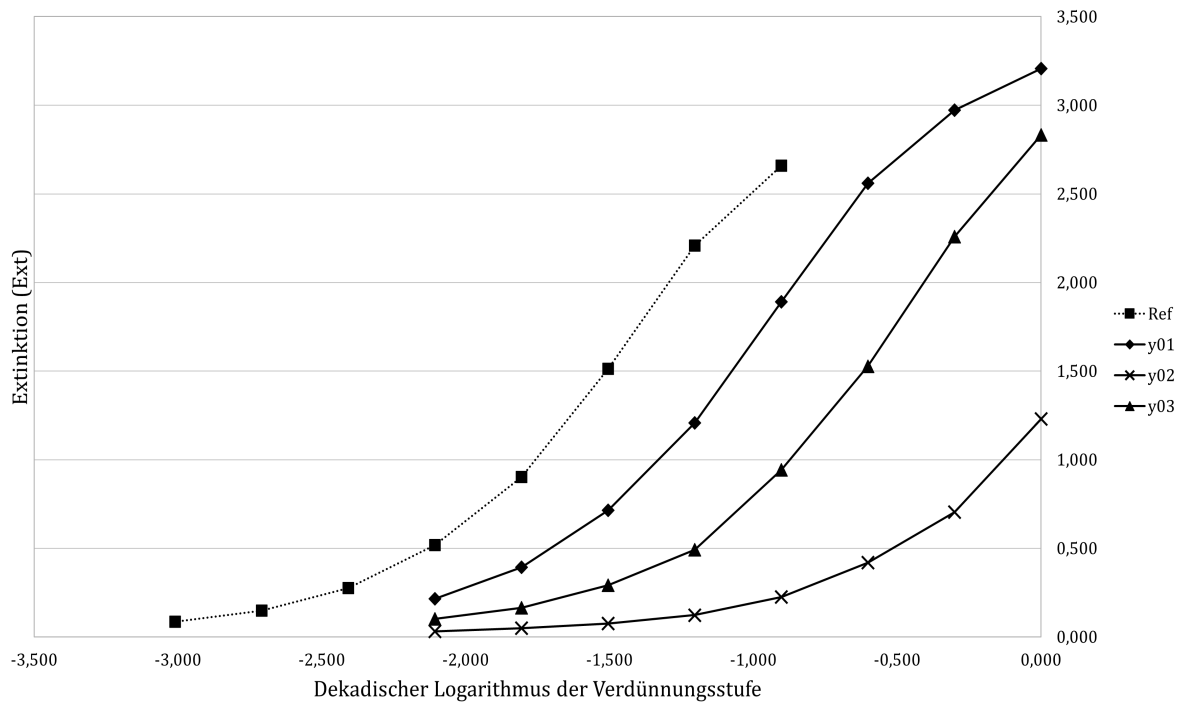
Die mit GAM-beschichtete Mikrotiterplatte wird vor der weiteren Verwendung fünf Mal mit TBS-Puffer gewaschen. Von jedem zentrifugierten Ansatz werden 50 µl des Überstandes in 200 µl TBS-Puffer überführt. Von dieser Verdünnung werden je 100 µl als Doppelansatz in Kavitäten der mit GAM-beschichteten Mikrotiterplatte pipettiert und für 90 Minuten bei 4 °C inkubiert. Sechs bis acht Kavitäten ohne Plättchenlysat werden als Leerwerte mitgeführt. Nach fünfmaligem Waschen mit TBS-Puffer wird in jede Kavität der mit Meerrettichperoxidase konjugierte Ziege-gegen-Mensch-IgG-Antikörper (GAH) hinzugegeben und für 120 Minuten bei 4 °C inkubiert.

Nach sechsmaligem Waschen mit TBS-Puffer wird in jede Kavität 100 µl des Substrats TMB One pipettiert und bei Raumtemperatur im Dunkeln für 10 Minuten inkubiert. Die Farbreaktion wird durch Hinzugabe von 100 µl 1,8 M Schwefelsäure in jede Kavität gestoppt und anschließend sofort im Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen. Die Ergebnisse werden als Extinktionsdifferenzen aus Mittelwert der Doppelbestimmungen und Leerwert (d. h. Kavitäten ohne Plättchenlysat) dargestellt und protokolliert.

3.2.3 Bestimmung der Antikörperkonzentration

Mit dem modifizierten MAIPA-Test wurden Extinktionen der durch Verdünnungsreihen hergestellten Konzentrationen jedes zu analysierenden Serums im Doppelansatz bestimmt. Bei jedem Ansatz wurde zum Vergleich eine Verdünnungsreihe des Referenzmaterials mitgeführt. Abbildung 6 zeigt schematisch den sigmoidalen Kurvenverlauf von drei maternalen Seren (y01, y02 und y03) und vom Referenzmaterial (REF).

Abbildung 6: Kurvenverläufe von drei Seren im Vergleich zum Referenzmaterial



Dabei werden die Extinktionen als Funktion der Verdünnung grafisch dargestellt. Analog zu den Arbeiten von Bertrand sowie Ghevaert et al. werden die Kurvenverläufe miteinander verglichen.^{68,69} Durch lineare Interpolation zwischen jeweils zwei Punkten werden sowohl für das zu untersuchende Serum als auch für das Referenzmaterial die interpolierten Verdünnungswerte für drei zuvor festgelegte Extinktionswerte bestimmt, nämlich für 0,5; 1 und 1,5. Diese drei Werte wurden gewählt, da in diesem Bereich die Kurven annähernd linear verlaufen und der Anstieg in jedem Punkt relativ konstant bleibt. Aufgrund der festgelegten Konzentration des unverdünnten Referenzmaterials mit 100 IU/ml kann mithilfe des Mittelwertes der drei Differenzen die Konzentration des zu analysierenden Serums berechnet werden. Sollte die Extinktion der unverdünnten Probe unter 1,5 liegen, erfolgte eine entsprechende Anpassung der Mittelung. Bei Werten $<0,5$ wurde nur der entsprechende Verdünnungsgrad des Referenzmaterials mit dem am höchsten gemessenen Extinktionswert der zu analysierenden Probe ermittelt. Für die beschriebenen Berechnungen der für die lineare Interpolation notwendigen Werte wurde Excel der Fa. Microsoft verwendet.

3.2.4 Klinische Daten der Probanden

Bei einem Teil der untersuchten Proben standen bereits klinische Daten zur Verfügung, da der Anforderungsbogen für die thrombozytenserologische Diagnostik entsprechende Felder enthielt, um das Laborergebnis besser interpretieren zu können. Zusätzlich wurden von einzelnen Einsendern auch Arztbriefe mitgeschickt, die Einblick in die perinatalen und peripartalen Umstände erlaubten. Fehlende Daten wurden mit Hilfe von Fragebögen eingeholt. Alle Daten wurden in anonymisierter Form in Excel der Fa. Microsoft zusammengetragen. Angemerkt sei, dass nur solche Fälle in diese Studie aufgenommen worden sind, bei denen zum Zeitpunkt der Geburt ein Anti-HPA-1a im maternalen Serum nachgewiesen werden konnte. Fälle HPA-1a-negativer Mütter, bei denen zunächst kein Antikörper nachzuweisen war (siehe Kapitel 4.2.6), konnten wegen der fehlenden Konzentrationsbestimmung nicht berücksichtigt werden.

3.2.5 Statistische Auswertung

Die initiale Zusammenstellung der einzelnen Daten in anonymisierter Form und die Berechnung der Antikörperkonzentration des maternalen Anti-HPA-1a (siehe Kapitel 3.2.3) erfolgte mit Excel von der Fa. Microsoft. Die statistische Auswertung einschließlich der Erstellung zugehöriger Grafiken wurde anschließend mit dem Programm R, Version 4.0.4 (Ihaka und Gentleman, 1996) durchgeführt.⁶¹

Unterschiede zwischen medianen Werten jeweils zweier unabhängiger Gruppen wurden mit dem U-Test (Wilcoxon-Rangsummentest) untersucht.⁷⁰ Mit ihm wurde zum Beispiel geprüft, ob es einen statistisch signifikanten Unterschied der maternalen Antikörperkonzentration bei der unterschiedlichen Ausprägung von neonatalen Blutungszeichen (siehe Kapitel 4.2.4) und bei der Therapie mit IVIG (siehe Kapitel 4.2.5) gab. Bei einem Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde der H-Test (Kruskal-Wallis) verwendet.⁷¹ Konnte die Nullhypothese mit diesem Test abgelehnt werden ($p < 0,05$), wurden anschließend paarweise Gruppenvergleiche nach dem Verfahren nach Conover (1999) untersucht.⁷² Mit diesem Algorithmus wurde geprüft, ob es einen Zusammenhang zwischen der maternalen Antikörperkonzentration und der Gabe von keinem, einem oder mehreren Thrombozytenkonzentraten beim Neugeborenen gab (siehe Kapitel 4.2.5). Außerdem sollte mit der Anti-HPA-1a-Studie untersucht werden, ob es eine statistisch signifikante Korrelation zwischen maternaler Antikörperkonzentration und neonataler Plättchenzahl gab. Zur Untersuchung des Zusammenhangs dieser beiden Variablen (siehe Kapitel 4.2.3) wurde der Rangkorrelationskoeffizient von Kendall (Kendalls Tau) verwendet.⁷³

4 Ergebnisse

4.1 FNAIT-Studie

Von den insgesamt 292 Einsendungen waren es - wie in Abbildung 4 (Kapitel 3.1.2) zu sehen - 252 Fälle, bei denen aufgrund der postnatal beobachteten Thrombozytopenie eine Abklärung auf NAIT veranlasst wurde. Die übrigen 40 Fälle waren Einsendungen, die zur Abklärung einer fetalen Alloimmunthrombozytopenie eingeschickt worden sind. Aufgrund der dort genannten Besonderheiten wird diese Teilgruppe im Unterkapitel 4.1.3 Untersuchung auf fetale Alloimmunthrombozytopenie separat betrachtet.

4.1.1 Allgemeine Beobachtungen

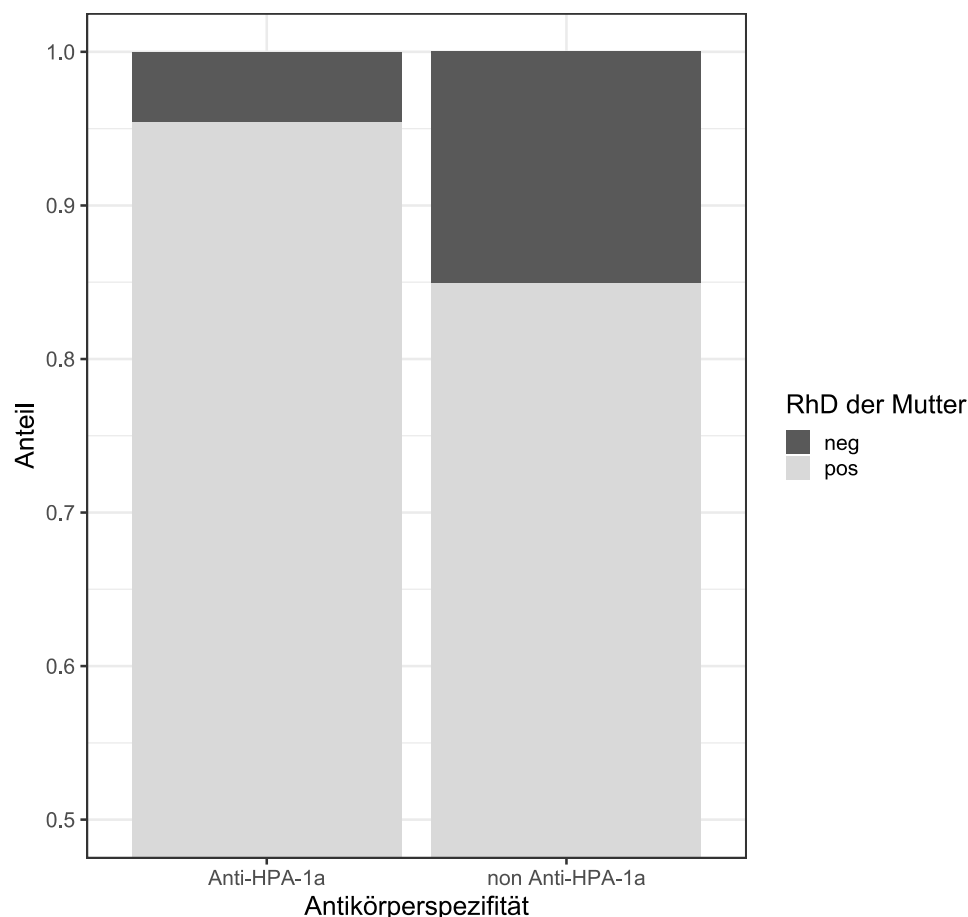
Das thrombozytenserologische Labor des Instituts für Transfusionsmedizin an der Universitätsmedizin Rostock hatte in dem für die Studie festgelegten Zeitraum den Stellenwert eines Referenzlabores. Es war für viele klinische Einrichtungen der Region Mecklenburg und Teile Vorpommerns die primäre Anlaufstelle bei der Abklärung von immunologisch bedingten Thrombozytopenien. Hinzu kamen weitere Einsender aus Kliniken in Hamburg, Köln, Dortmund und Itzehoe, wobei nicht alle klinischen Einrichtungen dieser Städte ihre Verdachtsfälle nach Rostock schickten. Aufgrund dieses räumlich nicht zusammenhängenden Einzugsbereichs war eine Bestimmung der Inzidenz für die NAIT nicht möglich. Für eine Subpopulation mit insgesamt 61 Einsendungen kann jedoch eine gute Schätzung vorgenommen werden, da aus dem entsprechenden Einzugsbereich alle Proben an der Universitätsmedizin Rostock untersucht worden sind: Für den Zeitraum von 2007 bis 2018 gab es laut Geburtenstatistik der Universitätsfrauenklinik in Rostock insgesamt 34.944 Geburten (persönliche Kommunikation mit PD Dr. med. D.M. Olbertz). Bei den 61 Einsendungen mit der Fragestellung einer NAIT wurde in elf Fällen ein plättchenspezifischer Alloantikörper nachgewiesen und somit eine serologisch gesicherte alloimmune Thrombozytopenie des Kindes diagnostiziert. In genau einem Fall wurde eine intrakranielle Blutung (ICH) festgestellt. Das entspricht einer Inzidenz von etwa 31,5 NAIT-Fällen bzw. etwa 2,9 ICH-Fällen auf 100.000 Geburten.

In der gesamten FNAIT-Studie wurden 147 Proben von Müttern mit einem männlichen Neugeborenen eingesandt, in 95 Fällen von einem weiblichen. Bei zehn Fällen war eine Angabe zum Geschlecht aus den erhobenen Daten nicht möglich. Das Geschlechterverhältnis lag somit bei 1,55 (männlich zu weiblich). Das mediane Alter aller Mütter zum Zeitpunkt der Untersuchung lag bei 30,5 Jahren (Minimum: 18,5 a; 25-Perzentil 26 a; 75-Perzentil 34,5 a; Maximum: 42,4 a). Das Alter der zugehörigen Partner war diesbezüglich etwas höher (Median: 32,7 a; Minimum:

18,9 a; 25-Perzentil: 28,8 a; 75-Perzentil: 37,5 a; Maximum: 52,6 a). Nur bei 63 der 252 Fälle lagen Informationen zu vorherigen Schwangerschaften der Mutter vor, so dass die folgenden Angaben nur eingeschränkt beurteilt werden können: In 40 Fällen (63,5%) galten die Mütter als Nullipara. Bei neun Müttern (14,3%) wurde mehr als eine Schwangerschaft (inkl. Aborte) angegeben.

Aus jeder eingesandten Blutprobe wurde stets eine ABD-Kurzbestimmung der Erythrozyten vorgenommen. Die Verhältnisse der AB0-Merkmale sowohl bei maternalen als auch bei paternalen Proben stimmen in etwa mit den aus Deutschland bekannten Frequenzen überein: Im Einzelnen waren es bei den maternalen Proben für BG 0 37,2%, für BG A 41,2%, für BG B 15,2% und für BG AB 6,4%. Bei den paternalen Proben waren es für BG 0 und BG A jeweils 40,1%, für BG B 12% und für BG AB 7,8%. Für die Häufigkeit des RhD-Merkmals konnte - wie in Abbildung 7 zu sehen ist - in einer ausgewählten Untergruppe ein Unterschied zur Gesamtpopulation gefunden werden.

Abbildung 7: Zusammenhang zwischen RhD-Status der Mutter und Anti-HPA-1a



Anteil von RhD-positiven (heller Bereich) und RhD-negativen (dunkler Bereich) Müttern
 Linker Balken: Maternale Proben, in denen ein Anti-HPA-1a nachgewiesen worden ist.
 Rechter Balken: Maternale Proben ohne nachgewiesenes Anti-HPA-1a.

Mütter, bei denen im Serum ein Antikörper gegen HPA-1a detektiert werden konnte, waren seltener RhD-negativ, nämlich in nur zwei von 44 Fällen (4,5%). Wenn andererseits kein Anti-HPA-1a im maternalen Serum gefunden wurde, konnte das RhD-Merkmal bei 31 von 208 Probandinnen (14,9%) nicht nachgewiesen werden. Dieser Unterschied ist auch statistisch betrachtet signifikant, denn das 95%-Konfidenzintervall für das Verhältnis 2 von 44 Mütter, die RhD-negativ sind, liegt zwischen 0,42% und 15,97%. Bei angenommener Häufigkeit von 17% in der Normalbevölkerung⁷⁴ ergäbe sich dabei ein p-Wert von 0,025 (Binomialtest). Aktuellere Zahlen gehen für den mitteldeutschen Raum eher davon aus, dass etwas weniger, nämlich 16,5% aller Personen, RhD-negativ sind (persönliche Kommunikation mit PD Dr. med. F.F. Wagner). Für diese angenommene Phänotypfrequenz wäre der gefundene Unterschied weiterhin statistisch signifikant (p=0,039).

4.1.2 Spezielle Beobachtungen

Zur besseren Beurteilung wurden die im indirekten MAIPA gefundenen Antikörperspezifitäten in zwei Gruppen aufgeteilt, nämlich abhängig vom HPA-1a-Status der Mutter. Die Ergebnisse hierzu sind in der Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Antikörperspezifitäten bei HPA-1a-negativen und HPA-1a-positiven Müttern

HPA-1a-Status der Mutter	Antikörperspezifitäten	n	%
HPA-1a-negativ (n=53)	Anti-HPA-1a	29	54,7
	Anti-HPA-1a + Anti-HPA-5b + Anti-HLA-Klasse-I	1	1,9
	Anti-HPA-1a + Anti-HLA-Klasse-I	14	26,4
	Anti-HPA-5b + Anti-HPA-15b + Anti-HLA-Klasse-I	1	1,9
	Anti-HLA-Klasse-I	1	1,9
	Keine	7	13,2
HPA-1a-positiv (n=199)	Anti-HPA-1b	1	0,5
	Anti-HPA-3a	1	0,5
	Anti-HPA-5b	1	0,5
	Anti-HPA-5b + Anti-HPA-15b + Anti-HLA-Klasse-I	1	0,5
	Anti-HPA-5b + Anti-HLA-Klasse-I	2	1
	Anti-HPA-15a	2	1
	Anti-GPIa/IIa*	1	0,5
	Anti-HLA-Klasse-I	62	31,2
	Auto-GPIIb/IIIa + Auto-GPIb/IX	1	0,5
	Keine	127	63,8

* Diese Antikörperspezifität wurde nur im Crossmatch unter Verwendung paternaler Thrombozyten gefunden
GP = Glykoprotein

Angemerkt sei, dass ein Antikörper gegen ein niederfrequentes Antigen vom Glykoprotein-komplex Ia/IIa der Übersicht wegen ebenfalls in diese Tabelle aufgenommen wurde, obwohl er im Gegensatz zu den anderen dargestellten Antikörpern nur im Crossmatch aus paternalen Thrombozyten und maternalem Serum zu finden war. Dieser besondere Fall wird im Kapitel 4.1.4 genauer beschrieben. In einem weiteren Fall wurden im indirekten MAIPA-Test freie Autoantikörper nachgewiesen. Dazu passend waren auch die maternalen autologen Thrombozyten vermehrt mit IgG beladen (direkter MAIPA-Test positiv für GP IIb/IIIa und Ib/IX). Zwischen Mutter und Kind bestanden keine Inkompatibilitäten für HPA-1, -2, -3, -4, -5 und -15. Darüber hinaus lag der gemessene Plättchenwert der Mutter bei 20 Gpt/l. Es ist sehr gut vorstellbar, dass in diesem Fall die beim Kind beobachtete Thrombozytopenie (24 Gpt/l) durch maternale Autoantikörper verursacht wurde.

In 135 von 252 Fällen konnte kein entsprechender Antikörper im indirekten MAIPA-Ansatz nachgewiesen werden (53,6%). HPA-1a-negative Mütter waren dabei mit sieben Fällen (5,2%) überdurchschnittlich häufig vertreten. Das daraus berechnete 95%-Konfidenzintervall liegt zwischen 2,34% und 10,5%. Bei einer angenommenen Phänotypfrequenz von 2,3% für den Status HPA-1a-negativ⁷⁵ wäre die gefundene Überrepräsentation statistisch signifikant ($p=0,037$; Binomialtest). Das in diesen sieben Fällen durchgeführte Crossmatch war in allen Fällen unauffällig. Hierzu zählt auch der im Kapitel 4.2.6 genauer beschriebene Fall. Für 115 der 135 im indirekten MAIPA unauffälligen Ansätze (85,1%) stand eine paternale Probe zur Verfügung, so dass ein entsprechendes Crossmatch für die GP IIb/IIIa, Ib/IX, Ia/IIa und für HLA-Klasse-I-Merkmale durchgeführt wurde. In elf Fällen (9,6%) war dabei der HLA-Klasse-I-Ansatz positiv, wobei es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Antikörperspezifitäten handelt, die nicht im Poolansatz des indirekten MAIPA vertreten waren. In acht weiteren Fällen (7%) waren mehrere Glykoproteinansätze der jeweiligen Crossmatch-Untersuchungen auffällig, wobei der GP IIb/IIIa-Ansatz immer mitbeteiligt war. Durch Folgeuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass es sich dabei um isoagglutininbedingte Reaktionen handelte; vor allem durch Anti-A verursacht. Wie zuvor bereits erwähnt, war bei einem Fall das Crossmatch-Resultat nur mit dem Glykoprotein-komplex Ia/IIa positiv, der auf das Vorhandensein eines Antikörpers gegen ein niederfrequentes Antigen hinweist.

Zusammengefasst konnten in 54 Fällen rein plättchenspezifische Alloantikörper in den maternalen Proben nachgewiesen werden. In drei Seren (5,6%) wurde ein Gemisch mehrerer Spezifitäten gefunden, wobei diese immer ein Anti-HPA-5b enthielten. Mit insgesamt 44 Fällen (81,5%) war Anti-HPA-1a die am häufigsten gefundene Spezifität, gefolgt von Anti-HPA-5b in insgesamt sechs Fällen (11,1%). Die Kombination von Anti-HPA-15a und Anti-HPA-15b kam mit jeweils zwei Fällen (3,7%) am dritthäufigsten vor. Anti-HPA-1a allein konnte in 43 Fällen (79,6%) und Anti-HPA-5b in drei Fällen (5,6%) nachgewiesen werden. Weitere Antikörper-

spezifitäten waren - wie in der Tabelle 7 zu sehen - selten. Die Quote für serologisch bestätigte NAIT-Fälle betrug 21,4%. In 16 NAIT-Fällen mit nachgewiesenem Anti-HPA-1a lagen Informationen zur Schwangerschaftsanamnese vor. Davon abgeleitet waren 56,3% dieser Mütter Erstgebärende.

Tabelle 7: Plättchenspezifische Alloantikörper in vermuteten NAIT-Fällen

Spezifität	n	%	Trc [Gpt/II] [†]	ICH
Anti-HPA-1a	43	79,6	Median: 24, IQA: 13-43, Min.: 2, Max.: 70	Ja, 2 Fälle
Anti-HPA-1a + Anti-HPA-5b	1	1,9	16	Nein
Anti-HPA-5b	3	5,6	14, 20, 79	Nein
Anti-HPA-5b + Anti-HPA-15b	2	3,7	21, 79	Nein
Anti-HPA-15a	2	3,7	23 [‡]	Nein
Anti-HPA-1b	1	1,9	7	Ja, 1 Fall
Anti-HPA-3a	1	1,9	20	Nein
Anti-GPIa/IIa*	1	1,9	52	Nein
Total	54	100	Median: 23, IQA: 14-46, Min.: 2, Max.: 79	3 (5.6%)

* Diese Antikörperspezifität wurde nur im Crossmatch unter Verwendung paternalen Thrombozyten gefunden;

† Angabe der minimalen postnatalen Thrombozytenzahlen bis maximal Tag 14 nach Geburt, bei mehr als drei Fällen erfolgt dieses als Median mit Interquartilsabstand (IQA), Minimum (Min.) und Maximum (Max.); ‡ Keine Angabe in einem Fall; GP = Glykoprotein, Gpt = Gigapartikel, ICH = intrakranielle Blutungen, Trc = Thrombozytenzahl

Die Häufigkeiten der molekulargenetisch bestimmten maternalen HPA-Antigene werden in der Tabelle 8 aufgelistet. Angemerkt sei, dass sowohl für das HPA-4- als auch für das HPA-15-System jeweils eine Untersuchung nicht eindeutig war. Die Allelfrequenzen wurden unter der Annahme, dass keine weiteren Allele je HPA-System existieren, durch Auszählen bestimmt. Auffällig dabei ist die gefundene Überrepräsentation für das das Antigen HPA-1b kodierende Allel mit 30,8%. Das mithilfe des Binomialtests ermittelte 95%-Konfidenzintervall liegt hierbei zwischen 26,9% und 34,9%; für eine angenommene Frequenz von 16,6% ist der p-Wert < 0,0001.⁷⁵

Tabelle 8: Maternale HPA-Merkmale bei 252 Fällen mit vermuteter NAIT

	a+b- (%)	a+b+ (%)	a-b+ (%)	Allelfrequenzen [†]
HPA-1	150 (59,5)	49 (19,4)	53 (21)	0,692; 0,308
HPA-2	212 (84,1)	39 (15,5)	1 (0,4)	0,919; 0,081
HPA-3	92 (36,5)	122 (48,4)	38 (15,1)	0,607; 0,393
HPA-4	251 (100)	0 (0)	0 (0)	1; 0
HPA-5	211 (83,7)	37 (14,7)	4 (1,6)	0,911; 0,089
HPA-15	61 (24,3)	135 (53,8)	55 (21,9)	0,51; 0,49

† Die Allelfrequenzen des entsprechenden HPA-Systems wurden unter der Annahme, dass keine weiteren Allele vorhanden sind, für diese spezielle Stichprobe durch Auszählen bestimmt.

4.1.3 Untersuchung auf fetale Alloimmunthrombozytopenie

In 40 Fällen wurden Proben von schwangeren Frauen untersucht, bei denen im Rahmen der Vorsorgeuntersuchung intrakranielle Auffälligkeiten des Feten beobachtet worden sind („FAIT-Abklärung“, siehe auch Abbildung 4 im Kapitel 3.1.2 Einschluss- und Ausschlusskriterien der FNAIT-Studie). Bei keiner dieser Schwangeren waren plättchenspezifische oder HLA-Klasse-I-Antikörper vorbeschrieben und bei keinem Feten wurde eine intrauterine Blutentnahme durchgeführt. Folglich gab es keinen spezifischen Hinweis auf eine Thrombozytopenie oder auf eine immunologisch bedingte Blutung. Bei all diesen Fällen wurde, um keine Zeit zu verlieren, im Rahmen einer umfassenden Diagnostik auch eine thrombozytenimmunologische Untersuchung vorgenommen.

Bei 17 Fällen lagen keine genaueren Angaben zur Schwangerschaft vor. Von den anderen 23 Fällen galten nur fünf der untersuchten Schwangeren als Nullipara (21,7%), bei 18 Frauen waren bereits Schwangerschaften und Aborte vorbeschrieben (78,3%). Das mediane Lebensalter aller 40 untersuchten Frauen lag bei 30 Jahren mit einem Interquartilsabstand von 25 Jahren bis 34 Jahren. Bei der ebenfalls durchgeführten Bestimmung der Leukozytenzahl, der Hämoglobinkonzentration und der Thrombozytenzahl wurden keine Auffälligkeiten bei den Schwangeren und den zugehörigen Partnern gefunden. Die grob orientierende Beurteilung der Blutausstriche ergab in keinem Fall den Anhalt für lichtmikroskopisch erkennbare morphologische Auffälligkeiten.

Die molekulargenetisch nachgewiesenen Alloantigene der 40 untersuchten Frauen werden in der Tabelle 9 zusammengefasst. Nur eine der 40 untersuchten Frauen war für das Merkmal HPA-1a negativ. Ob hierbei eine fetomaternale Inkompatibilität vorlag, ist nicht sicher, da die Thrombozyten des zugehörigen Partners für HPA-1 heterozygot, d. h. HPA-1(a+b+), bestimmt worden sind.

Tabelle 9: Maternale HPA-Merkmale bei 40 Fällen zur „FAIT-Abklärung“

	a+b- (%)	a+b+ (%)	a-b+ (%)	Allelfrequenzen [†]
HPA-1	28 (70)	11 (27,5)	1 (2,5)	0,8375; 0,1625
HPA-2	35 (87,5)	5 (12,5)	0 (0)	0,9375; 0,0625
HPA-3	12 (30)	23 (57,5)	5 (12,5)	0,5875; 0,4125
HPA-4	40 (100)	0 (0)	0 (0)	1; 0
HPA-5	32 (80)	7 (17,5)	1 (2,5)	0,8875; 0,1125
HPA-15	11 (27,5)	19 (47,5)	10 (25)	0,5125; 0,4875

Bei diesen 40 Fällen mit intrakraniellen Auffälligkeiten handelt es sich um eine Untergruppe der FNAIT-Studie, bei denen eine mögliche fetale Alloimmunthrombozytopenie abgeklärt werden sollte.

† Die Allelfrequenzen des entsprechenden HPA-Systems wurden unter der Annahme, dass keine weiteren Allele vorhanden sind, für diese spezielle Stichprobe durch Auszählen bestimmt.

In neun Fällen (22,5%) war das Resultat des indirekten MAIPA-Tests auffällig, wobei bei acht Frauen HLA-Klasse-I-Antikörper nachgewiesen worden sind (20%). In einem einzigen Fall (2,5%) gelang der Nachweis eines plättchenspezifischen Antikörpers, nämlich Anti-HPA-5b. Für die 31 Fälle mit negativem indirekten MAIPA war das Crossmatch aus maternalem Serum und paternalen Thrombozyten in drei Fällen auffällig: Bei zwei Partnerschaften lag eine AB0-Majorinkompatibilität vor, so dass das Isoagglutinin Anti-A höchstwahrscheinlich für den jeweiligen positiven Ansatz im MAIPA-Ansatz verantwortlich war. Im dritten Fall war das Crossmatch im MAIPA-Ansatz unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen β 2-Mikroglobulin positiv. Im Serum der zugehörigen Schwangeren konnte unter Verwendung weiterer Testverfahren ein Anti-HLA-A23 nachgewiesen werden. Insgesamt konnten folglich bei neun von 40 Fällen (22,5%) HLA-Klasse-I-Antikörper nachgewiesen werden. Bei 39 Frauen konnte auch der direkte MAIPA-Test durchgeführt werden, der in allen Fällen unauffällig ausfiel.

4.1.4 NAIT durch Antikörper gegen niederfrequentes Antigen

Bei diesem Fall handelt es sich um ein im Jahr 2018 geborenes Mädchen, welches das zweite Kind einer 34-jährigen Drittgravida war. Komplikationen während der Schwangerschaft traten keine auf, bei der Mutter wurde aber wegen des Verdachts auf eine Faktor-V-Leiden-Mutation eine prophylaktische ASS-Therapie während der Schwangerschaft verordnet. Aufgrund der Frühgeburtlichkeit (35. SSW + 5) erfolgte die stationäre Aufnahme. Im initialen Blutbild am Tage der Geburt fiel bei dem Mädchen eine Thrombozytopenie (84 Gpt/l) und eine Hypoglykämie auf. Außerdem litt die kleine Patientin an einem Frühgeborenenikterus und an einer passageren Temperaturregulationsstörung, die mit Fototherapie bzw. neuntägiger Lagerung im Wärmebett erfolgreich behandelt werden konnten. Eine kurzzeitige CPAP-Atemunterstützung war wegen einer Apnoephase nötig. Klinisch fielen während des gesamten stationären Aufenthaltes keine Blutungszeichen auf, zudem gab es laborchemisch keinen Anhalt für einen Infekt.

Aufgrund der weiterhin bestehenden Thrombozytopenie mit einem Nadir von 52 Gpt/l wurde eine erweiterte Diagnostik eingeleitet. Innere Blutungen und eine CMV-Infektion konnten dabei ausgeschlossen werden. In der sonografischen Bildgebung des Schädels wurde ein altersentsprechender Befund ohne Anhalt für intrakranielle Blutungen erhoben.

Zum Ausschluss einer NAIT wurden kindliche, mütterliche und väterliche Proben eingeschickt. In der molekulargenetischen Untersuchung der plättchenspezifischen Alloantigene ergab sich eine neonatomaternale Inkompatibilität nur für HPA-1b und HPA-3b. Plättchenspezifische Antikörper konnten im indirekten MAIPA-Test unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern gerichtet gegen die Glykoproteine IIb/IIIa, Ia/IIa, Ib/IX und V mit dem für das Antikörperscreening verwendete Thrombozytenpanel jedoch nicht detektiert werden. Im Screeningansatz unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen β 2-Mikroglobulin

wurden HLA-Klasse-I-Antikörper nachgewiesen. Im Crossmatch mit paternalen Plättchen und maternalem Serum war der Ansatz für den Glykoproteinkomplex Ia/IIa (indirekter MAIPA-Test) stark positiv. Die ABD-Kurzbestimmung ergab für die Mutter die Blutgruppe 0 RhD-pos. und für den Vater A RhD-pos. Ein Einfluss durch maternales Anti-A konnte durch Ansätze mit entsprechenden Testthrombozyten ausgeschlossen werden. Die Mutter wurde molekular-genetisch HPA-5(a+b+), der Vater HPA-5(a+b-) typisiert, für das Antigen HPA-13bw waren beide Elternteile negativ. Eine Testung bezüglich HPA-18bw und HPA-25bw und eine Sequenzierung der für die beiden Integrinketten kodierenden Gene war zu jenem Zeitpunkt nicht möglich. Die Diagnose der neonatalen Alloimmunthrombozytopenie bedingt durch einen Antikörper gegen ein niedrigfrequentes Antigen auf dem Glykoproteinkomplex Ia/IIa wurde gestellt.

4.2 Anti-HPA-1a-Studie

4.2.1 Allgemeine Beobachtungen

Tabelle 10 zeigt die wichtigsten klinischen Daten der 35 untersuchten NAIT-Fälle inklusive der jeweils bestimmten Konzentration des maternalen Anti-HPA-1a-Antikörpers. Männliche Neugeborene waren insgesamt etwas häufiger betroffen (n=19), das Geschlechterverhältnis männlich zu weiblich lag bei 1,19. In 37% der Fälle war das Kind im Rahmen einer Erstschwangerschaft von einer NAIT betroffen (n=13). In etwa einem Drittel kamen die Kinder durch Sectio caesarea zur Welt (n=11), mehr als zwei Drittel wurden auf natürlichem Wege geboren (n=24). Bei vier Fällen kam dabei unterstützend die Vakuumextraktion im Sinne einer assistierten vaginalen Geburt zum Einsatz.

Das Gestationsalter aller Neugeborenen schwankte zwischen 238 und 292 Tagen mit einer mittleren Schwangerschaftsdauer von 270 ± 14 Tagen. Die Körpermasse direkt nach Geburt lag zwischen 1.770 g und 5.020 g mit einem Mittelwert von 3.115 g (Standardabweichung = 718 g), die Körperlänge lag zwischen 44 cm und 58 cm mit einem Mittelwert von 49 cm (Standardabweichung = 3 cm). Die APGAR-Scores von 33 Neugeborenen nach einer Minute waren sehr variabel mit Werten zwischen 2 und 10, der Median lag jedoch bei 9 (Interquartilsabstand: 8-9). Nach zehn Minuten waren alle APGAR-Scores – mit Ausnahme von zwei Neugeborenen, für die keine Werte vorlagen – größer oder gleich 9 (Median 10, Werte werden nicht in der Tabelle 10 gezeigt). Dass es sich fast ausschließlich um ansonsten gesunde Kinder handelt, zeigt auch die Auswertung der pH-Werte aus der Nabelschnurarterie: In 96,9% der Fälle war der pH-Wert normwertig oder leicht azidotisch (n=31), in nur einem Fall lag eine mittelgradige Azidose vor (pH=7,18). Fortgeschrittene oder gar schwere Azidosen wurden nicht beschrieben, bei drei Fällen konnten keine pH-Werte mitgeteilt werden.

Tabelle 10: Übersicht zu den 35 durch Anti-HPA-1a verursachten NAIT-Fällen

Geschl.	Ak-Konz.	Trc (Erstb.)	Trc (Min.)	Petechien	Hämatome	ICH	Grav.	Geb.weg	Gestationsalter	Apgar 1	pH NSA	KM	Länge	n(THK)	IVIG
w	37,21	18	18	ja	nein	unsicher	NV	SVG	280	NV	NV	NV	NV	1	ja
w	2,4	60	60	nein	nein	nein	1	SC	256	9	7,36	2240	46	0	nein
m	12,49	40	40	ja	nein	nein	3	SC	279	9	7,35	5020	58	1	ja
m	11,45	34	34	ja	nein	nein	1	SVG	268	9	7,25	3450	52	0	nein
w	0,45	11	5	nein	nein	nein	1	SVG	273	2	7,27	3040	48	3	nein
m	0,25	19	19	ja	nein	nein	1	SVG	272	9	7,33	3500	48	1	ja
w	8,94	22	22	ja	nein	nein	1	AVG	287	8	7,18	3655	51	1	nein
w	44,23	44	44	ja	nein	nein	3	SC	271	9	7,33	4250	52	1	nein
m	1,65	76	54	nein	ja	nein	1	SVG	274	9	NV	2290	47	0	nein
m	64,58	32	32	ja	nein	nein	1	SVG	292	7	7,2	3485	53	0	nein
w	142,56	2	2	ja	ja	nein	2	SVG	275	9	7,28	2730	48	2	ja
m	67,05	12	12	nein	ja	ja	2	SC	253	9	7,35	2220	45	NV*	nein
w	163,35	11	8	ja	ja	nein	4	SVG	270	9	7,3	3360	48	1	nein
w	13,85	8	8	ja	ja	nein	3	SC	267	8	7,27	3200	52	3	ja
m	62,12	16	16	ja	nein	nein	4	SVG	265	8	7,3	3480	48	0	nein
w	77,5	83	83	ja	ja	unsicher	2	AVG	289	NV	NV	3250	51	0	nein
m	25,44	60	50	nein	nein	nein	2	SVG	282	9	7,23	4060	52	0	nein
w	21,12	24	24	ja	nein	nein	2	SVG	238	9	7,32	2070	49	1	nein
m	12,08	20	20	ja	nein	nein	1	SC	240	8	7,35	2010	45	1	nein

Fortsetzung nächste Seite

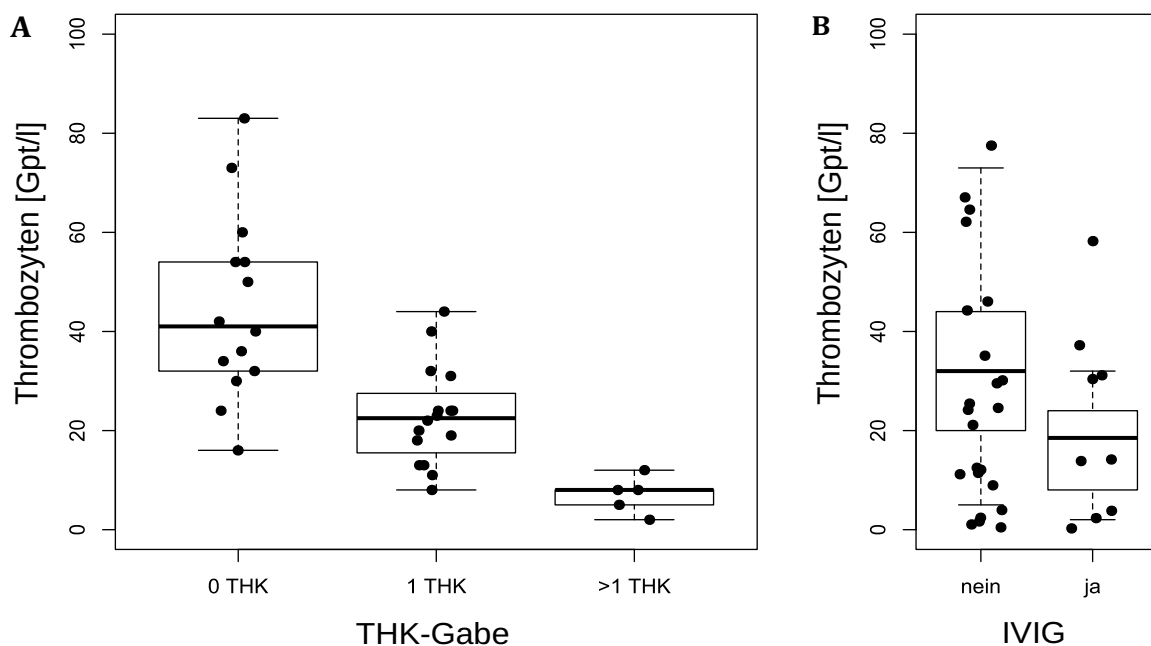
Geschl.	Ak-Konz.	Trc (Erstb.)	Trc (Min.)	Petechien	Hämatome	ICH	Grav.	Geb.weg	Gestationsalter	Apgar 1	pH NSA	KM	Länge	n(THK)	IVIG
m	30,39	8	8	ja	ja	ja	1	SVG	278	9	7,22	2490	48	5	ja
m	3,8	32	32	ja	nein	nein	3	SVG	272	8	7,3	2700	48	1	ja
w	1,05	16	13	nein	nein	nein	2	AVG	279	9	7,32	3560	53	1	nein
w	11,18	77	73	nein	nein	nein	1	SVG	279	9	7,32	3710	NA	0	nein
w	24,56	13	13	ja	nein	nein	2	SC	246	8	7,29	2630	48	1	nein
m	35,1	42	42	nein	nein	nein	2	SVG	262	9	7,37	3230	50	0	nein
m	3,95	39	36	nein	nein	nein	1	SVG	277	9	7,29	3380	48	0	nein
m	46,04	56	54	nein	nein	nein	4	SVG	252	9	7,44	3330	49	0	nein
w	58,22	35	24	ja	nein	nein	4	SC	260	9	7,34	2730	49	1	ja
m	108,22	23	23	ja	ja	nein	2	SVG	282	9	7,39	3470	51	1	nein
m	30,13	40	40	ja	nein	nein	2	SVG	268	10	7,48	2530	49	0	nein
m	24,17	49	31	nein	nein	nein	1	SC	259	10	7,34	1770	44	1	nein
w	2,33	24	24	nein	nein	nein	4	SC	243	6	7,28	2550	45	0	ja
m	14,16	34	30	nein	nein	nein	2	SC	278	7	7,21	3100	52	0	ja
w	29,52	24	24	ja	ja	nein	2	AVG	285	9	7,26	3150	50	1	nein
m	31,15	13	11	ja	ja	nein	1	SVG	282	7	7,31	4280	52	1	ja

Geschl. = zur Geburt bestimmtes Geschlecht, Ak-Konz. = Konzentration des Anti-HPA-1a-Antikörpers [IU/ml], Trc (Erstb.) = erste gemessene Thrombozytenzahl [Gpt/l], Trc (Min.) = Minimum der Thrombozytenzahl [Gpt/l], Petechien = Vorhandensein von Petechien [ja/nein], Hämatome = Vorhandensein von Hämatomen außer intrakraniellen Hämatomen [ja/nein], ICH = Vorhandensein von intrakraniellen Hämatomen [ja/nein], Grav. = Anzahl der Schwangerschaften inkl. Indexschwangerschaft, Geb.weg = Geburtsweg, Gestationsalter = Schwangerschaftsdauer [d], Apgar 1 = Apgarwert nach einer Lebensminute, pH NSA = pH-Wert aus Nabelschnurarterie, KM = Körpermasse zur Geburt [g], Länge = Körperlänge zur Geburt [cm], n(THK) = Anzahl transfundierter Thrombozytenkonzentrate, IVIG = Gabe von intravenösen Immunglobulinen [ja/nein]

* = Massivtransfusion, genaue Angabe von Thrombozytenkonzentraten nicht möglich; AVG = assistierte vaginale Geburt, Gpt = Gigapartikel, IU = internationale Einheiten, NV = nicht verfügbar, SC = Sectio caesarea, SVG = spontane vaginale Geburt

Alle 35 Neugeborenen wiesen zum ersten Zeitpunkt einer Blutbildanalyse eine Thrombozytopenie (< 150 Gpt/l) auf, in 57,1% der Fälle ($n=20$) war diese sogar als kritisch für intrakranielle Hämatoome zu betrachten (≤ 30 Gpt/l). Bei zwölf Kindern wurde der Nadir der Thrombozytenzahlen erst im weiteren Verlauf gesehen: Bei fast allen Kindern war das innerhalb der ersten vier Lebenstage, nur in einem Fall war das Minimum erst am neunten Tag postnatal zu verzeichnen. In 11,4% aller beschriebenen NAIT-Fälle ($n=4$) lag der Plättchenwert sogar unterhalb von 10 Gpt/l. In 22 Fällen konnten postnatal vereinzelte oder multiple Petechien beobachtet werden (62,8%), in zehn Fällen traten Hämatoome auf (28,6%), in zwei Fällen sogar intrakranielle Blutungen (5,7%). Bei zwei weiteren Fällen konnten intrakranielle Hämatoome nicht sicher ausgeschlossen werden. Zwölf der Kinder erhielten bezüglich der NAIT keine weitere Therapie, d. h. keine Transfusion von Thrombozytenkonzentraten (THK) und keine Gabe von intravenösen Immunglobulinen (IVIG). In 40% der Fälle wurde keine Transfusion von Thrombozytenkonzentraten (THK) veranlasst ($n=14$), in 45,7% der Fälle wurde genau ein THK ($n=16$) und in 14,3% der Fälle mehr als ein THK ($n=5$) transfundiert. Die Abbildung 8A zeigt den Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Thrombozytopenie (erkennbar an der minimal bestimmten Thrombozytenzahl) und der Zahl der transfundierten Thrombozytenkonzentrate.

Abbildung 8: Zusammenhang zwischen neonataler Thrombozytenzahl und Therapie



Zusammenhang zwischen neonataler Thrombozytenzahl und Transfusionsstrategie (A) und zwischen neonataler Thrombozytenzahl und Gabe von intravenösem Immunglobulin (B)

Gpt = Gigapartikel, IVIG = intravenöse Immunglobuline, THK = Thrombozytenkonzentrate

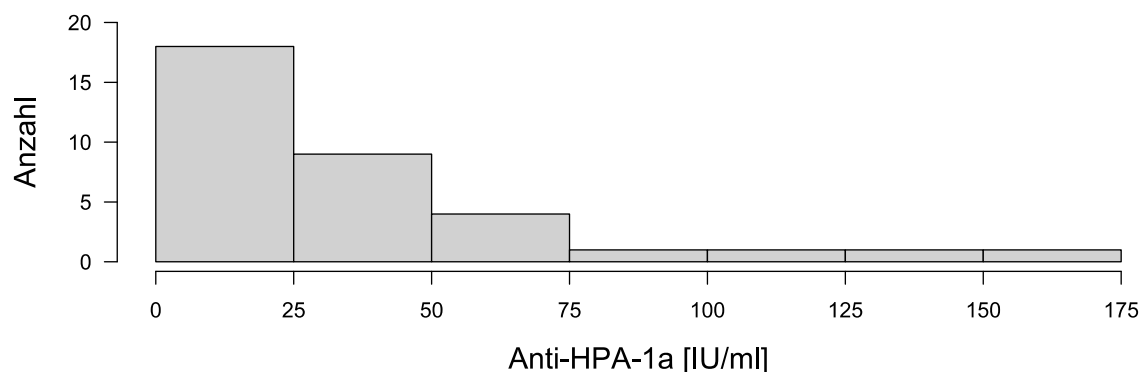
Diese drei Teilgruppen haben zueinander signifikant unterschiedliche Antikörperkonzentrationen: für „0 THK“ zu „1 THK“ ist $p=0,00015$; für „0 THK“ zu „>1 THK“ ist $p<0,00001$ und für „1 THK“ zu „>1 THK“ ist $p=0,00187$ (Verfahren nach Conover). Die Thrombozyten-

konzentrate waren in allen 21 Fällen unausgewählt. Aufgrund der Häufigkeit des Antigens HPA-1a ist davon auszugehen, dass die verabreichten Präparate alle oder fast alle HPA-1a positiv waren. Transfusionsreaktionen wurden keine berichtet. In 28,6% aller NAIT-Fälle wurden intravenös Immunglobuline (IVIG) appliziert (n=10). Der Zusammenhang zwischen neonataler Thrombozytenzahl und IVIG-Gabe wird in der Abbildung 8B dargestellt. Auch hier besteht ein signifikanter Unterschied des Plättchenwertes bezüglich stattgefundener und fehlender intravenöser Applikation der Immunglobuline ($p=0,019$; Wilcoxon-Rangsummentest). In acht Fällen erfolgte die Gabe unterstützend zur Transfusion von Thrombozyten, bei zwei Kindern war es die alleinige Therapieform der NAIT.

4.2.2 Antikörperkonzentrationen von maternalem Anti-HPA-1a

Die im modifizierten MAIPA-Ansatz ermittelten Konzentrationen für maternales Anti-HPA-1a sind in Tabelle 10 aufgeführt. Es wurden Werte zwischen 0,25 IU/ml und 163,35 IU/ml bestimmt, mit einem Median von 24,56 IU/ml (Interquartilsabstand: 10,06 IU/ml - 45,13 IU/ml). In drei Fällen lag die Anti-HPA-1a-Antikörperkonzentration über 100 IU/ml. Die Abbildung 9 zeigt die Häufigkeitsverteilung.

Abbildung 9: Häufigkeitsverteilung der ermittelten Antikörperkonzentrationen

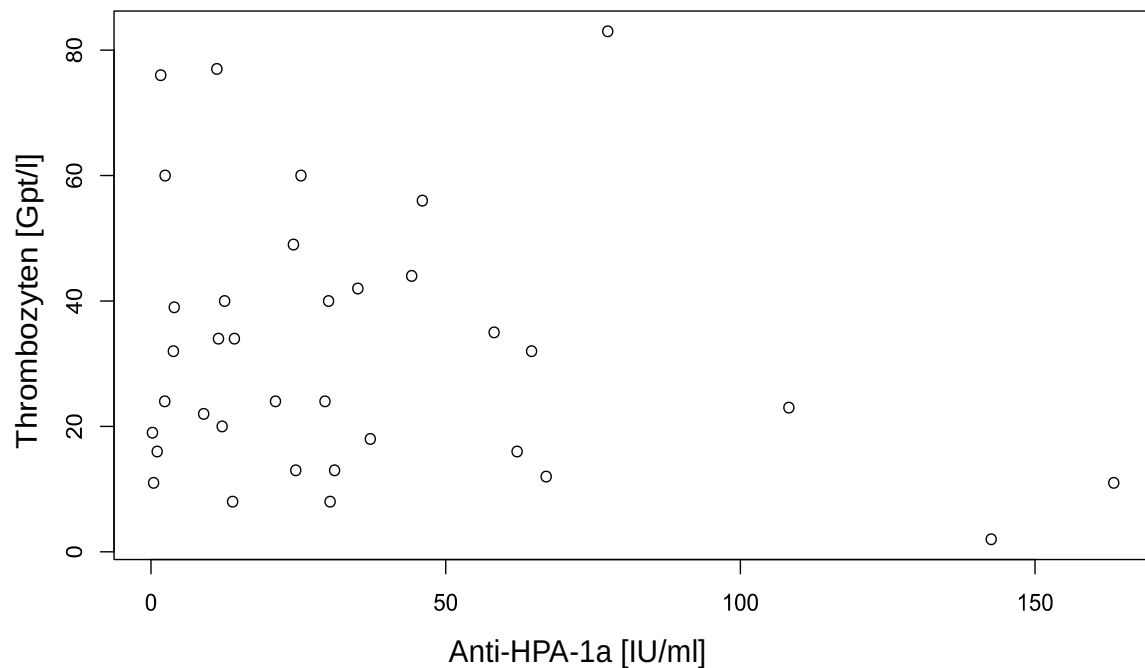


IU= internationale Einheiten

4.2.3 Antikörperkonzentration und Thrombozytopenie

In der Abbildung 10 wird der Zusammenhang zwischen maternaler Antikörperkonzentration und neonataler Thrombozytenzahl dargestellt, wobei nur die zuerst gemessenen Plättchenwerte (zwischen dem ersten und vierten Lebenstag) berücksichtigt worden sind. Man kann erkennen, dass es keinen engen Zusammenhang zwischen der Anti-HPA-1a-Konzentration bei der Mutter und den fetalen Thrombozytenzahlen gibt (Kendalls Tau -0,081, $p=0,495$). Auch unter Berücksichtigung des Minimums für den Plättchenwert besteht keine Korrelation zwischen Thrombozytopenie und Anti-HPA-1a-Konzentration ($\tau=-0,078$, $p=0,513$).

Abbildung 10: Neonatale Thrombozytenzahl und maternale Anti-HPA-1a-Konzentration



Gpt = Gigapartikel, IU = internationale Einheiten

4.2.4 Antikörperkonzentration und Blutungszeichen

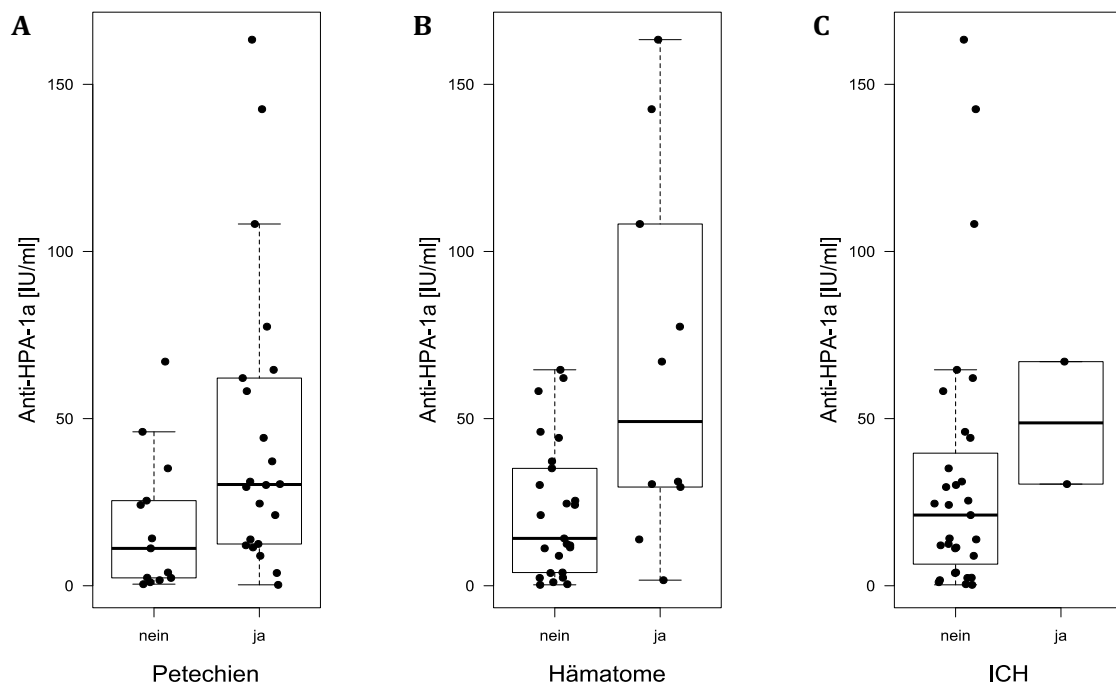
Die Abbildung 11 zeigt den Zusammenhang zwischen der im maternalen Serum bestimmten Konzentration des Anti-HPA-1a-Antikörpers und den verschiedenen Ausprägungen von Blutungszeichen, d. h. Petechien, Hämatome (exkl. intrakranielle Hämatome) und intrakranielle Blutungen (ICH). Bei Neugeborenen mit Petechien waren (verglichen mit Neugeborenen ohne Petechien) die entsprechenden mütterlichen Anti-HPA-1a-Konzentrationen überzufällig höher ($p=0,031$; Wilcoxon-Rangsummentest), dies gilt auch für Neugeborene mit Hämatomen ($p=0,012$). Für intrakranielle Blutungen kann wegen der niedrigen Fallzahl ($n=2$) dieser Unterschied nicht bewertet werden.

4.2.5 Antikörperkonzentration und Therapie

Die Abbildung 12A zeigt den Zusammenhang zwischen der Antikörperkonzentration des maternalen Anti-HPA-1a-Antikörpers und der Gabe von Thrombozytenkonzentraten (THK), wobei zwischen keinem, einem oder mehr als einem THK unterschieden wurde.

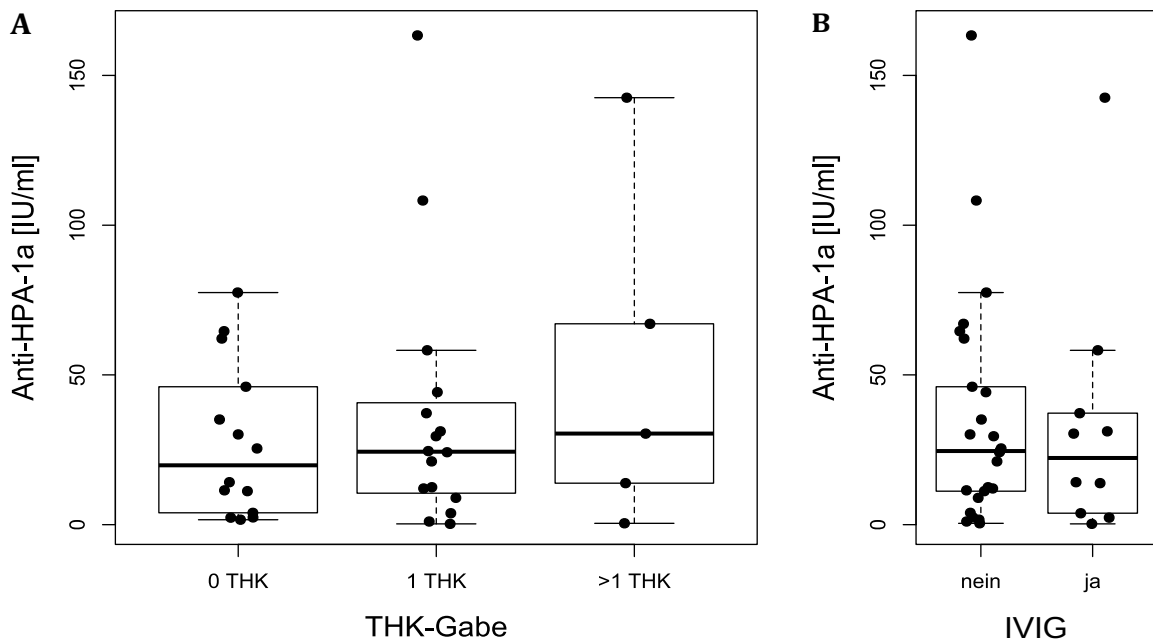
Es besteht kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern ($p=0,816$; Kruskal-Wallis H-Test). Auch in Bezug auf die Therapie mit intravenösen Immunglobulinen besteht kein signifikanter Unterschied der Antikörperkonzentration ($p=0,844$; Wilcoxon-Rangsummentest). Der Zusammenhang wird in der Abbildung 12B dargestellt.

Abbildung 11: Zusammenhang zwischen Antikörperkonzentration und Blutungszeichen



Zusammenhang Antikörperkonzentration zu Petechien (A), zu Hämatomen (B) und zu ICH (C)
ICH = Intrakranielle Hämorrhagien, IU = Internationale Einheiten

Abbildung 12: Zusammenhang zwischen Antikörperkonzentration und Therapie

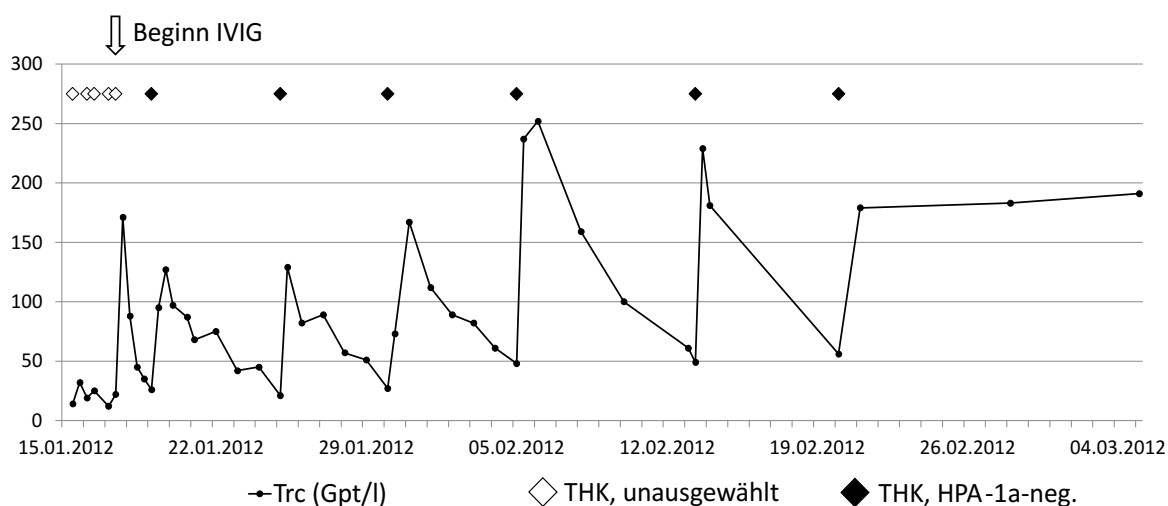


Zusammenhang zwischen HPA-1a-Antikörperkonzentration und Transfusionsstrategie (A) und zwischen HPA-1a-Antikörperkonzentration und Gabe von intravenösem Immunglobulin (B)
IVIG = intravenöse Immunglobuline, IU = internationale Einheiten, THK = Thrombozytenkonzentrate

4.2.6 NAIT mit initial nicht festgestelltem Anti-HPA-1a

Bei einem männlichen Neugeborenen wurde im Jahr 2012 eine schwere Thrombozytopenie beobachtet, obwohl direkt nach der Geburt serologisch kein thrombozytärer Antikörper im maternalen Serum nachgewiesen werden konnte. Dabei handelte es sich um das erstgeborene Kind einer HPA-1a-negativen 30-jährigen Frau, die während der Schwangerschaft keine Auffälligkeiten aufwies. Zur Geburt (34+3 SSW) zeigte das männliche Frühgeborene multiple Petechien am Kopf und mehrere Hämatome an den unteren Extremitäten. Die APGAR-Werte (1 min, 5 min bzw. 10 min postnatal) betrugen 7, 8 und 9. Außer einer pulmonalen Adaptationsstörung - am ehesten bedingt durch die Frühgeburtlichkeit - waren zunächst keine weiteren Komplikationen beobachtet worden, vor allem keine Infektzeichen. In der ersten Blutbildanalyse fiel eine schwere Thrombozytopenie auf (14 Gpt/l), so dass umgehend ein Thrombozytenkonzentrat transfundiert wurde. Am dritten Lebenstag erreichte die Thrombozytenzahl ihren Nadir mit 12 Gpt/l, so dass zusätzlich ab dem fünften Thrombozytenkonzentrat eine begleitende intravenöse Gabe von Immunglobulinen (1 g/kg Körpermasse pro Tag) veranlasst und anschließend vor jeder weiteren Plättchengabe wiederholt wurde. Ab dem sechsten Thrombozytenkonzentrat wurden nur noch HPA-1a-negative Präparate transfundiert. Unter dieser kombinierten Therapie stabilisierten sich die Plättchenwerte zunehmend, ab dem 44. Lebenstag waren sie normwertig. Der Verlauf und die Transfusionsstrategie wird in Abbildung 13 gezeigt.

Abbildung 13: Verlauf der Thrombozytenzahl und Transfusionsstrategie



Gpt = Gigapartikel, IVIG = intravenöse Immunglobuline, THK = Thrombozytenkonzentrat, Trc = Thrombozytenzahl

Die sonografische Bildgebung des Schädels ergab zu keiner Zeit den Verdacht auf intrakranielle Blutungen, bei den ophthalmologischen Untersuchungen konnten jedoch beidseits strichförmige bis flächige Blutungen der Retina nachgewiesen werden. Diese waren im weiteren Verlauf

rückläufig und das Neugeborene konnte am 37. Lebenstag aus der stationären Behandlung entlassen werden.

Bei Verdacht auf NAIT wurden kindliche, mütterliche und väterliche Proben untersucht. Die Antikörperdiagnostik erfolgte mittels etabliertem MAIPA-Verfahren⁶⁵, wobei unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern gerichtet gegen die Glykoproteine IIb/IIIa, Ia/IIa, Ib/IX und V sowie gegen β 2-Mikroglobulin keine plättchenspezifischen Antikörper oder solche gegen HLA-Klasse-I-Merkmale im mütterlichen Serum detektiert werden konnten. Das Crossmatch mit väterlichen Thrombozyten im indirekten MAIPA-Ansatz war ebenfalls unauffällig. Auch zusätzliche Testungen mit einem kommerziellem ELISA-Ansatz (PAKPLUS® von LIFECODES, Immucor) oder mit einem modifizierten Plättchensuspensions-Immunofluoreszenztest (PSIFT) - wie beschrieben von von dem Borne et al.⁷⁶ - blieben unauffällig. Bei der molekulargenetischen Bestimmung der wichtigsten HPA-Allele mittels kommerzieller SSP-PCR (HPA Ready Gene, Fa. Inno-train) wurde eine HPA-1a-Inkompatibilität zwischen Mutter und Kind bestätigt. In der erweiterten Diagnostik konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Mutter homozygot für das Allel *DRB3*01:01* ist. In der mikroskopischen Untersuchung von kindlichen, mütterlichen und väterlichen Blutaussstrichen konnten - abgesehen von der Thrombozytopenie des Kindes - keine weiteren Auffälligkeiten beobachtet werden. Bis zum 68. postnatalen Tag wurden Proben der Mutter eingeschickt und untersucht: Plättchenspezifische Antikörper konnten zu keiner Zeit nachgewiesen werden.

Fünf Jahre später stellte sich die Mutter zu einer genetischen Beratung bei erneutem Kindeswunsch vor. Zu diesem Zeitpunkt konnte im indirekten MAIPA ein stark reagierender Antikörper gegen HPA-1a nachgewiesen werden. Somit konnte abschließend die Diagnose einer durch Anti-HPA-1a vermittelten NAIT beim ersten Kind gestellt werden.

5 Diskussion

Mit den beiden Studien (FNAIT-Studie und Anti-HPA-1a-Studie) sollte einerseits untersucht werden, ob sich im Vergleich zu historischen Daten Veränderungen bei den serologischen Befunden und vor allem bei den Antikörperspezifitäten fetaler und neonataler Alloimmunthrombozytopenien ergeben haben und andererseits, ob es bei Fällen mit involviertem Anti-HPA-1a einen Zusammenhang zwischen der maternalen Antikörperkonzentration und der Klinik bzw. Thrombozytenzahl der Neugeborenen gibt, um somit eventuell einen geeigneten Surrogatmarker für die Risikostratifizierung zukünftiger NAIT-Fälle zu finden. In den beiden Studien wurden insgesamt 292 Fälle mit Verdacht auf FNAIT und insbesondere 35 durch Anti-HPA-1a verursachte neonatale Alloimmunthrombozytopenien vorgestellt.

5.1 Allgemeine Erkenntnisse der FNAIT-Studie

Für eine Subpopulation (61 Einsendungen) konnte eine Inzidenz von etwa 31,5 NAIT-Fällen auf 100.000 Geburten ($\sim 1:3.177$) bestimmt werden. Aufgrund des retrospektiven Charakters der FNAIT-Studie muss dieser Wert jedoch kritisch betrachtet werden. Eine Vielzahl von Fällen bleibt wegen fehlender systematischer Bestimmung von Blutbild und plättchenspezifischen Alloantikörpern bei allen Geburten unerkannt. Daher überrascht es nicht, dass sich der Wert sehr von den in prospektiven Analysen angegebenen Inzidenzen von etwa 1:800 bis 1:2.000 unterscheidet.³ Diese Diskrepanz konnten auch Davoren et al. in ihrer retrospektiven Analyse von 1992 bis 2000 beobachten. Sie ermittelten in der irischen Bevölkerung eine NAIT-Inzidenz von etwa 1:16.500 Geburten.⁷⁷

Insgesamt wurde in der aktuellen Studie bei mehr männlichen Neugeborenen eine alloimmune Thrombozytopenie diagnostiziert (Geschlechterverhältnis männlich zu weiblich 1,55). Dieses Ungleichgewicht wurde auch in weiteren Publikationen beschrieben wie zum Beispiel in der bereits 1989 erschienenen Arbeit von Mueller-Eckhardt et al. (Verhältnis 1,44)⁷⁸, in der von Tiller et al. aus dem Jahr 2013 (Verhältnis 2)⁶ und in der von Sachs et al. aus dem Jahre 2020 (Verhältnis 2,6).⁷⁹ Auch bei Fällen mit intrakraniellen Blutungen waren männliche Neugeborene häufiger als weibliche betroffen. Die genauen Ursachen für dieses Ungleichgewicht konnten bisher nicht eruiert werden.

5.2 Vergleich mit historischen Daten

Um die in der FNAIT-Studie gefundenen Plättchen-relevanten Antikörper mit bekannten Daten zu vergleichen, wurden folgende Publikationen analysiert: Kroll et al. aus dem Jahre 1998,

Davoren et al. aus dem Jahre 2004 und Ghevaert et al. aus dem Jahre 2007.⁸⁰⁻⁸² Die Tabelle 11 fasst die wichtigsten Daten zusammen. Es handelt sich dabei um Daten aus Deutschland, Wisconsin (USA) bzw. Südengland (UK) mit einer jeweils vergleichbaren ethnischen Zusammensetzung der zugrunde liegenden Population.

Tabelle 11: Vergleich serologischer NAIT-Befunde mit historischen Daten

HPA-Spezifität	FNAIT-Studie		Kroll et al. ⁸⁰		Davoren et al. ⁸¹		Ghevaert et al. ⁸²	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Solitär	51	94,4	404	97,3	1126	96,9	193	96,5
HPA-1a	43	79,6	304	73,3	922	79,3	150	75,0
HPA-1b	1	1,9	3	0,7	43	3,7	1	0,5
HPA-2a								
HPA-2b			3	0,7	1	0,1		
HPA-3a	1	1,9	8	1,9	20	1,7	2	1,0
HPA-3b					9	0,8		
HPA-4a					2	0,2		
HPA-4b			1	0,2	2	0,2		
HPA-5a			2	0,5	12	1,0	1	0,5
HPA-5b	3	5,6	79	19,0	109	9,4	31	15,5
HPA-6bw					1	0,1		
HPA-8bw			1	0,2				
HPA-12bw			1	0,2				
HPA-13bw			1	0,2				
HPA-14bw			1	0,2				
HPA-15a	2	3,7						
HPA-15b							8	4,0
GP Ia/IIa	1	1,9						
GP IV (CD36)					5	0,4		
Ak-Gemisch	3	5,6	11	2,7	36	3,1	7	3,5
HPA-1a + 5b	1	1,9	11	2,7	22	1,9	5	3,0
HPA-1b + 3a					4	0,3		
HPA-1b + 5a					1	0,1		
HPA-1b + 5b					5	0,4		
HPA-3a + 5b					1	0,1		
HPA-3b + 2b					1	0,1		
HPA-5b + 15b	2	3,7					2	1,0
HPA-1a + 3a + 2b					1	0,1		
HPA-1b + 3a + 5a					1	0,1		
Detektrionsrate	54	21,4%	415	NV	1162	31,0%	200	17,4%

Ak = Antikörper, CD = Cluster of differentiation, GP = Glykoprotein, NV = nicht verfügbar, bedingt durch fehlende Angabe der insgesamt untersuchten Proben

Studien aus dem südamerikanischen, afrikanischen und asiatischen Raum wurden wegen der abweichenden Allelfrequenzen bezüglich der wichtigsten HPA-Systeme nicht berücksichtigt. Warum dieses sinnvoll ist, zeigt beispielhaft die 2004 publizierte Arbeit von Ohto et al.⁸³ Bei dieser großen Studie aus dem asiatischen Raum mit insgesamt 24.630 untersuchten maternalen Proben wurden die meisten Fälle einer FNAIT durch Anti-HPA-5b (168 Fälle) und Anti-HPA-4b

(49 Fälle) verursacht. Die letztgenannte Spezifität ist in Populationen europäischer Herkunft eine absolute Rarität, was vor allem daran liegt, dass die Phänotypfrequenz für das korrespondierende Alloantigen nahe bei Null liegt.

In der aktuellen FNAIT-Studie und bei den oben genannten drei historischen Publikationen wurde in den meisten der serologisch bestätigten Fälle nur eine plättchenbezogene Allospezifität gefunden, ein Gemisch aus mehreren HPA-Antikörpern war selten: aktuell 5,6% (mit 95%-Konfidenzintervall: 1,3% - 15,7%), historisch 2,7%-3,5%. Dabei ist auffällig, dass Anti-HPA-5b der häufigste Antikörper in Seren ist, in denen mehr als eine Spezifität gefunden wurde: Bei Kroll et al., Ghevaert et al. und auch bei der aktuellen FNAIT-Studie enthielten alle Antikörpergemische ein Anti-HPA-5b, bei Davoren et al. kam es in 83,3% aller Fälle vor. In allen vier Studien waren die am häufigsten gefundenen Antikörper solche, die gegen HPA-1a oder HPA-5b gerichtet waren. Der Anteil für Anti-HPA-1a war in allen vier Studien relativ konstant und lag insgesamt zwischen 75,9% und 81,5%, für Fälle mit solitärem Antikörpernachweis zwischen 73,3% und 79,6%. Warum Antikörper gegen HPA-1a bei fetalen und neonatalen Alloimmunthrombozytopenien (und auch bei der PTP) um ein Vielfaches häufiger vorkommen als solche gegen HPA-1b, ist noch nicht komplett geklärt. Bei transfundierten Patienten scheint das Verhältnis eher umgekehrt zu sein, wie zum Beispiel die Arbeit von Kiefel et al. aus dem Jahre 2001 zeigt: In den 20 Fällen mit plättchenspezifischen Antikörpern wurden solche gegen HPA-1b sechs Mal nachgewiesen, gegen HPA-1a nur in einem Fall.⁸⁴ In den meisten Fällen mit nachgewiesenem Anti-HPA-1b (n=4) waren damals Männer betroffen, eine gleichzeitige Typisierung von HLA-DR fand zum damaligen Zeitpunkt nicht statt. HLA-Klasse-II-Merkmale scheinen jedoch einen Einfluss auf die Alloimmunisierung bei Müttern zu haben, die in FNAIT-Fälle involviert sind, wie die Arbeit von Wu et al. zeigt.⁸⁵ Für die humorale Immunantwort - also für die Bildung von Antikörpern gegen körperfremde Strukturen - sind sowohl adäquate B- als auch T-Zellantworten nötig. Für letztgenannte muss eine entsprechende Antigenpräsentation durch spezialisierte Zellen erfolgen, was nur durch eine ausreichend starke Bindung des körperfremden Peptids im Klasse-II-MHC-Molekül möglich ist. Wu und Kollegen konnten zeigen, dass die für den HPA-1-Polymorphismus verantwortliche Aminosäure an Position 33 des Integrins $\beta 3$ einen enormen Einfluss auf diese Bindungsfähigkeit hat. Leucin (HPA-1a) sorgt für einen Anker in der Peptidbindungsstelle des MHC-Moleküls DR52a, während Prolin (HPA-1b) dieses nicht vermag. Ahlen et al. konnten in ihrer Arbeit bestätigen, dass bei Vorhandensein von Leucin an Position 33 und dessen Präsentation über DR52a entsprechende T-Zellantworten generiert werden, die zur Aktivierung von B-Lymphozyten führen.⁸⁶ Dass DR52a bzw. das zugrunde liegende Allel *HLA-DRB3*01:01* einen Einfluss auf die Alloimmunisierung in FNAIT-Fällen hat, gilt heutzutage als unumstritten: Wienzek-Lischka et al. konnten dies in ihrer aus dem Jahre 2017 stammenden Publikation erneut zeigen⁸⁷, die systematische Analyse von Kjeldsen-Kragh et al. bestätigt diese Annahme: Bei Müttern, die das Allel *HLA-DRB3*01:01* nicht tragen, liegt das Quotenverhältnis

(englisch: *odds ratio*) für eine Alloimmunisierung gegen HPA-1a bei 0,05 (95%-Konfidenzintervall: 0-0,6).⁸⁸ Diese beiden Punkte - starke Assoziation zwischen FNAIT und DR52a sowie erhöhte Bindungsfähigkeit und somit Antigenpräsentation über DR52a - bieten eine mögliche Erklärung für die deutliche Überpräsentation von Antikörpern gegen HPA-1a in sowohl der aktuellen als auch in den historischen Studien. Eine HLA-Klasse-II-Typisierung bei transfundierten Patienten mit nachgewiesenen Alloantikörpern gegen die beiden Antigene aus dem HPA-1-System könnte zusätzliche Erkenntnisse zum beobachteten Ungleichgewicht bringen.

Für die Antikörperspezifität Anti-HPA-5b ist ein deutlicher Unterschied zwischen der aktuellen FNAIT-Studie und den historischen Daten zu erkennen. In den damaligen Arbeiten wurde diese Spezifität als solitärer Antikörper in 9,4% bis 19% der Fälle gefunden, während sie in der aktuellen Studie in nur 5,6% der Fälle vorkam (95%-Konfidenzintervall: 1,4%-16,5%). Bezogen auf die Studie von Kroll et al. ist dieser Unterschied sogar signifikant ($p=0,012$; exakter Test nach Fisher). Eine mögliche Ursache für die in der FNAIT-Studie gefundene Unterrepräsentation von Anti-HPA-5b könnte sein, dass Neugeborene mit niedrigen Plättchenwerten zunehmend sorgfältiger auf eine andere Ursache einer Thrombozytopenie untersucht werden, bevor eine thrombozytenimmunologische Untersuchung veranlasst wird. Eine weitere Erklärung wäre, dass in der aktuellen Studie auch Antikörper gegen das HPA-15-System einbezogen worden sind. Berry et al. schlussfolgerten aus ihren Daten, dass HPA-15-Alloantigene eine ähnliche Immunogenität aufweisen wie die aus dem HPA-5-System.⁸⁹ In der aktuellen FNAIT-Studie wurde nur in drei Seren Anti-HPA-5b als alleinige Spezifität gefunden, in drei Fällen kam es zusammen mit anderen plättchenspezifischen Antikörpern vor, davon zwei Mal mit Anti-HPA-15b. Diese Kombination wurde in der Studie von Ghevaert et al., in der im Gegensatz zu Kroll et al. und Davoren et al. ebenfalls Antikörper gegen HPA-15 untersucht worden sind, auch in zwei von sieben Fällen mit Antikörpermischungen gefunden.⁸²

Warum Antikörper gegen HPA-15a und HPA-15b überhaupt eine Alloimmunthrombozytopenie und auch Refraktärzustände nach Thrombozytengabe auslösen können, ist aktuell noch nicht vollständig geklärt, da das die Alloantigene tragende Glykoprotein CD109 bisher nur auf aktivierten Thrombozyten nachgewiesen wurde.^{48,49} Hier scheint ein deutlich komplexerer immunologischer Pathomechanismus - eventuell unter Einbeziehung anderer Zellen - vorzuliegen. Zumindest wurde CD109 auch auf aktivierten T-Lymphozyten, hämatopoetischen Vorläuferzellen, aus denen sich auch Megakaryozyten entwickeln, und auf Endothelzellen nachgewiesen.⁴⁹

Auch die geringe Häufigkeit von gegen den Glykoproteinkomplex Ib/IX gerichteten Antikörpern ist noch nicht völlig geklärt. In der aktuellen Studie wurde kein solcher Antikörper gefunden, in den historischen Daten waren sie ebenfalls eine Rarität (0,1%-0,7%). Das könnte daran liegen,

dass die Alloantigene weniger immunogen sind oder die korrespondierenden Antikörper weniger stark durch den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) transportiert werden, wie Kaplan, Bertrand und Ni in ihrer Übersichtsarbeit zusammenfassen.³ Es ist auch denkbar, dass die Symptome deutlich schwächer im Vergleich zu anderen Alloantikörpern ausfallen und somit perinatal gar nicht bemerkt werden, oder - genau umgekehrt - so schwerwiegend sind, dass sie bereits während der Schwangerschaft frühzeitig zum intrauterinen Fruchttod führen. Darüber hinaus wird der Glykoproteinkomplex Ib/IX/V nur auf Thrombozyten und Megakaryozyten exprimiert.^{90,91} Das Fehlen dieser Proteinen auf Trophoblasten könnte somit auch ein Grund für die seltene Alloimmunisierung gegen Merkmale des HPA-2-Systems sein, wie Xu et al. in ihrer Arbeit vermuten.⁹¹

Ein weiterer interessanter Aspekt von Übersichtsarbeiten mit plättchenspezifischen fetomaternalen Inkompatibilitäten ist die Detektionsrate, d. h. der Anteil serologisch bestätigter NAIT-Fälle im Verhältnis zur Gesamtzahl eingesandter Proben. Die Rate liegt in der aktuellen FNAIT-Studie in dem Bereich von früheren Untersuchungen (aktuell 21,4%, historisch 17,4%-31%). Vergleicht man aber die Studien unter dem Gesichtspunkt der Berücksichtigung von Glykoprotein IV (GP IV, CD36), fällt auf, dass die Detektionsrate höher ist, wenn auch GP IV einbezogen wurde (ohne GP IV 17,4%-21,4%, mit GP IV 31%). Eine Isoimmunisierung bei entsprechender GP-IV-Defizienz wird vor allem bei Personen mit asiatischer oder afrikanischer Herkunft beobachtet.^{58,92} Aufgrund weiter zunehmender globaler Migrationsbewegungen erscheint es sinnvoll, dieses Glykoprotein bei entsprechendem Verdacht auch in die Diagnostik einzubeziehen. Eine einfach durchzuführende Screeninguntersuchung könnte der Nachweis von fehlendem löslichen CD36 im Plasma entsprechender Mütter sein, wie zum Beispiel von Phuangtham et al. vorgeschlagen.⁹³ Ein weiteres wichtiges Mittel zur Erhöhung der Detektionsrate ist das Crossmatch aus paternalen Thrombozyten und maternalem Serum. Der in Kapitel 4.1.4 beschriebene Fall zeigt eindrucksvoll, dass nur mithilfe dieses Ansatzes ein Antikörper gegen ein niederfrequentes Antigen auf dem Glykoproteinkomplex Ia/IIa bestimmt werden konnte. Auch wurde der erst vor Kurzem von Hopkins et al. publizierte erste Fall einer Anti-HPA-6b-bedingten NAIT im Vereinigten Königreich nur durch die Verwendung paternaler Thrombozyten nachgewiesen.⁹⁴ Beide Aspekte, das heißt Berücksichtigung von GP IV und Durchführung eines Crossmatch-Ansatzes, sind bereits in die Empfehlung der thrombozytenimmunologischen Arbeitsgruppe der *International Society of Thrombosis and Haemostasis* zur Diagnostik beim Verdacht auf FNAIT eingeflossen.²²

5.3 Intrakranielle Hämorrhagien

Die am meisten gefürchtete Komplikation fetaler und neonataler Thrombozytopenien ist das Auftreten intrakranieller Hämorrhagien (ICH). Sie wurden in der FNAIT-Studie in insgesamt drei

Fällen beobachtet. Zwei Mal wurde ein Anti-HPA-1a nachgewiesen, ein Mal ein Anti-HPA-1b. Bei 54 NAIT-Fällen mit plättchenspezifischen Alloantikörpern entspricht dieses einer Rate von 5,6%. Dieser Wert ist niedriger als die von Ghevaert et al. beschriebenen 13% aus dem Jahre 2007.⁸² Dieses könnte daran liegen, dass zu dem damaligen Zeitpunkt wichtige Erkenntnisse aus der Studie von Kjeldsen-Kragh et al. in die Organisation der Geburtsabläufe gefährdeter Kinder eingeflossen sind. Die Autoren konnten mit ihren Daten zeigen, dass eine geplante Sectio caesarea etwa zwei bis vier Wochen vor dem eigentlich errechneten Geburtstermin statistisch signifikant seltener zu schweren Blutungszeichen bei den Neugeborenen führte.²⁴ Die Autoren begründeten dies folgendermaßen: Bei an Hämophilie leidenden Kindern führt die natürliche Geburt deutlich häufiger zu intrakraniellen Blutungen. Das heißt, dass der vaginale Geburtsweg als deutlich traumatischer als der Kaiserschnitt angesehen wird. Durch die Verkürzung der Schwangerschaft ist darüber hinaus der Fetus weniger lang dem maternalen Antikörper ausgesetzt. Zusätzlich kann sich die angeschlossene Blutbank bei einem geplanten Geburtstermin besser darauf vorbereiten, kompatible und ausreichend viele Thrombozytenpräparate vorzuhalten. Dadurch sollen länger andauernde Thrombozytopenien unter dem kritischen Wert von 30 Gpt/l vermieden werden. Eine Limitation der FNAIT-Studie bezüglich der Rate intrakranieller Blutungen war jedoch die nicht aktive Abfrage neonataler Blutungszeichen. Vielmehr konnten und sollten die anfordernden Kliniker auf dem zugehörigen Anforderungsschein entsprechende klinische Komplikationen mitteilen. Folglich könnte die Anzahl nicht erfasster ICH höher als die angegebenen 5,6% sein. Unabhängig davon zeigte die aktuelle FNAIT-Studie, dass Anti-HPA-1a weiterhin der am häufigsten gefundene Antikörper bei NAIT-Fällen mit intrakraniellen Blutungen ist.

5.4 Fetomaternale Inkompatibilität

Bei 40 Fällen der FNAIT-Studie war der Verdacht auf genau solche intrakranielle Hämorrhagien der Auslöser für eine erweiterte Diagnostik („FAIT-Abklärung“, siehe auch Abbildung 4 im Kapitel 3.1.2 Einschluss- und Ausschlusskriterien der FNAIT-Studie). Hier waren es keine erniedrigten Thrombozytenzahlen oder direkten Blutungszeichen, sondern intrauterin gefundene Auffälligkeiten bei der sonografischen Feindiagnostik, die zur Abklärung einer fetomaternalen Inkompatibilität führten. Die mittels SSP-PCR bestimmten maternalen Allelfrequenzen wurden mit historischen Daten verglichen. Für die Systeme HPA-1, 2, 3, 4 und 5 wurde dabei die Publikation von Kiefel et al. aus dem Jahre 1993 genutzt, da sie trotz des serologischen Ansatzes die größte Anzahl von Probanden für eine vergleichbare Population aufweist.⁷⁵ Für HPA-15 wurde die Arbeit von Ertel et al. aus dem Jahre 2005 genutzt.⁵⁷ Die 95%-Konfidenzintervalle für die involvierten 40 Fälle zeigen, dass es keine statistisch signifikanten Unterschiede zu den vorbeschriebenen Allelfrequenzen gab, die zugehörigen p-Werte lagen

dabei zwischen 0,616 und 1 (Binomialtest). Im Gegensatz zu den Fällen mit postnataler Abklärung einer Thrombozytopenie lag somit kein Ungleichgewicht für ein HPA-Alloantigen vor.

Die Detektionsrate für plättchenspezifische Antikörper in dieser 40 Fälle umfassenden Untergruppe war mit 2,5% sehr gering: Es wurde nur in einem einzigen maternalen Serum ein Anti-HPA-5b gefunden. Ob dieser den in der 27. SSW gefundenen Hydrocephalus beim Feten verursacht hat, ist unklar. Eine Typisierung des Feten bezüglich HPA-5b wurde nicht durchgeführt, und weitere anamnestische Daten - vor allem zu vorherigen Schwangerschaften - lagen nicht vor. In der Publikation von Refsum et al. aus dem Jahre 2018 wurde eine ähnliche Studiengruppe betrachtet: Alle nach der 32. Schwangerschaftswoche geborenen Kinder mit intrakraniellen Blutungen, die in Schweden von 2003 bis 2012 in dem zugehörigen Register erfasst worden sind, wurden dafür analysiert.⁹⁵ Von insgesamt 286 betroffenen Neugeborenen konnte in 105 Fällen das zugehörige maternale Serum untersucht werden. Die dort gefundene relative Häufigkeit von plättchenspezifischen Antikörpern ist mit 2,9% vergleichbar hoch wie die in der hier vorliegenden Untergruppe der FNAIT-Studie. In drei Fällen wurden plättchenspezifische Antikörper nachgewiesen (Anti-HPA-1a, Anti-HPA-5b und ein Gemisch aus Antikörpern gegen HPA-5b und HPA-15a). Während bei den Fällen mit Anti-HPA-1a und Anti-HPA-15a schwere Thrombozytopenien (<50 Gpt/l) beim Kind auftraten, war die Plättchenzahl im Fall des solitären Anti-HPA-5b nur moderat erniedrigt. Mögliche kausale Zusammenhänge konnten jedoch nicht weiter untersucht werden, da HPA-Typisierungen der Neugeborenen auch in jener Studie nicht vorlagen. Die Autoren konnten aber zeigen, dass bei Fällen mit intrakraniellen Blutungen schwere Thrombozytopenien insgesamt nur selten auftraten (8,5%) und dass klassische Gründe wie Asphyxia neonatorum und traumatische Entbindungen viel häufiger anzufinden waren. Intrakranielle Blutungen bei FNAIT-Fällen mit nachgewiesenem Antikörper gegen HPA-5b sind jedoch beschrieben worden.^{82,96} Die retrospektive Untersuchung von Rousseau, Goldman und David aus dem Jahre 2004 weist allerdings darauf hin, dass Anti-HPA-5b eine geringere klinische Relevanz als zum Beispiel Anti-HPA-1a hat.⁹⁷ Bei den in ihrer Studie vorgestellten 31 Fällen waren 78% aller Fälle asymptomatisch. In keinem Fall lag eine intrakranielle Blutung vor. Andere Blutungszeichen und schwerere Thrombozytopenien wurden dann beobachtet, wenn neben Anti-HPA-5b auch ein Antikörper gegen HPA-1a im maternalen Serum vorlag. Allerdings hat die Studie auch gezeigt, dass bei der einzigen Folgeschwangerschaft mit solitärem Anti-HPA-5b die Thrombozytopenie beim nächstem Geschwisterkind ausgeprägter war (Nadir: 27 Gpt/l im Vergleich zu 83 Gpt/l). Die Autoren zeigten auch, dass die Detektionsrate an Anti-HPA-5b-bedingten NAIT-Fällen vor allem dann hoch war, wenn die Bestimmung der Thrombozytenzahl aus Nabelschnurblut routinemäßig durchgeführt wurde, was auf einen Zufallsbefund hinweisen könnte. Dazu passend kamen Alm et al. in ihrer erst kürzlich erschienenen Übersichtsarbeit über den Einfluss von Anti-HPA-5b in vermuteten FNAIT-Fällen zu dem Ergebnis, dass diese Antikörperspezifität keine schweren Thrombozytopenien oder

Blutungskomplikationen verursacht.⁹⁸ Darüber hinaus fanden sie nur schwache Hinweise dafür, dass ein kleiner Teil der schwangeren Frauen mit nachgewiesenem Anti-HPA-5b ein Neugeborenes mit einer milden Thrombozytopenie zur Welt bringt.

Bei der geringen Detektionsrate in der hier untersuchten Untergruppe der FNAIT-Studie könnte man annehmen, dass eine thrombozytenserologische Abklärung bei Müttern mit intrauterin gefundenen Auffälligkeiten in den sonografischen Vorsorgeuntersuchungen nicht zielführend sei. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass die Anzahl von 40 Fällen sehr klein ist. Außerdem wurden in der Literatur Fälle mit einer bereits während der Schwangerschaft auftretenden intrakraniellen Blutung und späteren neurologischen Komplikationen beschrieben.²⁴ Diese und die daraus resultierenden Kosten für das Gesundheitssystem könnten durch eine genaue Diagnosestellung bei nachfolgenden Schwangerschaften eventuell vermieden werden. Ob jedoch eine primärprophylaktische Untersuchung zur Vermeidung von plättchenspezifischen Alloimmunisierungen zielführend ist, muss aufgrund der geringen Anzahl von HPA-Antikörpern bei Neugeborenen mit intrakraniellen Blutungen kritisch betrachtet werden. Die Autoren der oben beschriebenen Studie von Refsum et al. sind der Auffassung, dass es kosteneffizienter sei, Komplikationen wie die Neugeborenen-Asphyxie und traumatische Entbindungen zu vermeiden als ein Screening-Programm für HPA-Alloimmunisierungen zu etablieren.⁹⁵

5.5 Einfluss von HLA-Klasse-I-Antikörpern

Neben dem einzigen Fall eines Anti-HPA-5b wurden in der oben genannten ausgewählten Subpopulation der FNAIT-Studie bei neun Fällen (22,5%) HLA-Klasse-I-Antikörper nachgewiesen. Diese Häufigkeit wurde mit einer ähnlichen Dimension (23,8%) auch in der oben beschriebenen Studie von Refsum et al. bei Neugeborenen mit intrakraniellen Blutungen beschrieben.⁹⁵ Von den neun Fällen zur „FAIT-Abklärung“ gelang der Nachweis von HLA-Klasse-I-Antikörpern insgesamt acht Mal im indirekten MAIPA-Ansatz mit standardmäßig verwendeten Testthrombozyten, in einem Fall nur im Crossmatch mit paternalen Blutplättchen. Bei Folgeuntersuchungen konnte hierbei die Allospezifität Anti-HLA-A23 bestimmt werden. Zu dem damaligen Zeitpunkt wurde für den HLA-spezifischen Ansatz des indirekten MAIPA-Tests ein Poolansatz mit Plättchen von acht bekannten Thrombozytenspendern gewählt, die für HLA-A und HLA-B typisiert waren. Dadurch sollten die häufigsten Antigenspezifitäten abgedeckt werden. Darüber hinaus lief beim regelmäßig durchgeführten Crossmatch zwischen maternalem Serum und paternalen Thrombozyten ebenfalls ein Ansatz mit einem monoklonalen Antikörper gegen das β 2-Mikroglobulin. Somit war ein Vergleich der mit diesen beiden Untersuchungsansätzen gefundenen Häufigkeiten von HLA-Klasse-I-Antikörpern möglich. Unter der Annahme, dass die eingesandten paternalen Proben stets die Väter in den aktuellen und vorherigen Schwangerschaften waren, sollte der HLA-Crossmatch-Ansatz die sensitivere Methode

darstellen, da Schwangerschaften ein deutlich höheres Risiko zur Alloimmunisierung gegen HLA-Klasse-I-Merkmale aufweisen als zum Beispiel vorherige Transfusionen.⁹⁹

In der Tat wurden in der gesamten FNAIT-Studie elf der 79 nachgewiesenen HLA-Klasse-I-Antikörper nur im Crossmatch-Ansatz gefunden. Die daraus abgeleitete Sensitivität für den HLA-Ansatz im indirekten MAIPA-Test beträgt somit 86,1%. Eine höhere Sensitivität könnte durch die Verwendung eines weiteren Poolansatzes oder durch die Erhöhung der Spenderanzahl mit Aufnahme weiterer HLA-Klasse-I-Merkmale im Poolansatz erreicht werden. Nach dem Ende der FNAIT-Studie wurde im thrombozytenserologischen Labor in der Tat ein neunter Spender in den Pool aufgenommen, um somit das Spektrum an Alloantigenen zu erhöhen. Zukünftige Auswertungen müssen zeigen, ob sich dadurch die Sensitivität tatsächlich erhöht hat. Luminex-basierte Testansätze haben ebenfalls eine hohe Detektionsrate für HLA-Klasse-I-Antikörper, sind aber in der Gesamtschau deutlich kostenintensiver als der HLA-Ansatz des indirekten MAIPA-Tests. Außerdem konnte in der Studie von Jackman et al. gezeigt werden, dass HLA-Antikörper, die nur im Luminex-basierten Testverfahren detektiert wurden, nicht zu einer erhöhten Refraktärität nach Thrombozytengabe führten.¹⁰⁰ Der HLA-Ansatz des indirekten MAIPA-Tests scheint somit eine kostensparende und sichere Alternative darzustellen.

Darüber hinaus wird der Einfluss von HLA-Klasse-I-Antikörpern bei fetalen und neonatalen Alloimmunthrombozytopenien kontrovers diskutiert. In der Literatur wurden bereits viele vermutete FNAIT-Fälle publiziert, die einen kausalen Zusammenhang zwischen gegen paternale HLA-Klasse-I-Merkmale gerichtete Alloantikörper und neonataler Thrombozytopenie postulierten. Andere Ursachen konnten häufig nicht sicher ausgeschlossen werden, so dass ein zufälliger Nachweis dieser Antikörper ebenfalls möglich ist. In der 2020 erschienenen ersten systematischen Analyse zu diesem Sachverhalt von Sachs et al. kamen die Autoren zum Schluss, dass HLA-Klasse-I-Antikörper nicht zum klinischen Bild einer FNAIT führen.⁷⁹ Sie stellten dabei nochmal heraus, dass eine Refraktärität nach Thrombozytengabe definitiv durch Antikörper gegen HLA-Merkmale verursacht werden kann, da in diesem von ihnen genannten *host-vs-graft*-Szenario die HLA-Antikörper nur gegen die allogenen Thrombozyten gerichtet sind. Im umgekehrten, also sogenannten *graft-vs-host*-Szenario, scheinen die vielfach exprimierten löslichen und auf fast allen Körperzellen vorkommenden HLA-Merkmale eine protektive Wirkung auf die autologen Thrombozyten des Kindes auszuüben.

5.6 Einfluss von RhD auf NAIT-Fälle mit Anti-HPA-1a

Ein überraschender Befund dieser Arbeit ist der niedrigere Anteil von RhD-negativen Müttern bei Anti-HPA-1a-bedingten NAIT-Fällen. Eine solche Beobachtung ist bisher nicht beschrieben worden. Der gefundene Unterschied ist statistisch signifikant ($p=0,039$ bei der Annahme einer Phänotypfrequenz von 16,5% für RhD-negativ in der allgemeinen Bevölkerung). Um

auszuschließen, dass es sich um einen Zufallsbefund handelt, sollte diese Fragestellung in einer neuen Stichprobe überprüft werden.

Sollte dieser Befund bestätigt werden können, stellt sich die Frage, warum RhD-negative Frauen offenbar seltener im Rahmen einer Schwangerschaft gegen HPA-1a immunisiert werden. Es ist eher unwahrscheinlich, dass das Antigen RhD bzw. sein Fehlen einen direkten Einfluss auf HPA-1a bzw. dagegen gerichtete Antikörper hat. Die zugehörigen Gene liegen auf verschiedenen Chromosomen (*RHD* auf Chromosom 1, *ITGB3* auf Chromosom 17).^{101,102} Hinzu kommt, dass RhD nur auf Erythrozyten und erythroiden Vorläuferzellen exprimiert wird.¹⁰³ Eine mögliche Erklärung für die wenigen RhD-negativen Mütter könnte die bei ihnen routinemäßig vorgesehene Immunprophylaxe mit polyklonalem Anti-D sein. Die Injektion erfolgt in vielen Ländern nicht nur postpartal, sondern bereits während der Schwangerschaft (in Deutschland in SSW 27+0 bis 29+6)³⁵, um die Immunisierungswahrscheinlichkeit gegen RhD zu reduzieren.¹⁰⁴ Es wurden darüber hinaus Einzelfallbeschreibungen mit einer Koinzidenz von maternalem Anti-D und Anti-HPA-1a publiziert, bei denen die Thrombozytopenie des Neugeborenen deutlich milder als erwartet ausgefallen ist.^{105,106} Seit mehr als 25 Jahren kommt polyklonales Anti-D humanen Ursprungs auch bei der autoimmunen Thrombozytopenie (AITP) zum Einsatz.^{107,108} Der Wirkmechanismus hierbei und auch bei der Unterdrückung der Primärimmunisierung gegen RhD im Rahmen der klassischen Anti-D-Prophylaxe ist noch nicht völlig geklärt. Eine einfache Hypothese bei der AITP wäre das Ausschöpfen der Kapazitäten des retikulo-endothelialen Systems durch opsonierte Erythrozyten, so dass Blutplättchen weniger stark abgebaut werden.¹⁰⁷ Coopamah, Freedman und Semple konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass Anti-D-Immunglobuline der Klasse G über ihren Fc-Part einen leukozytären Oxidationssturm auslösen, der anschließend die Erythrozytaphagozytose unterdrückt.¹⁰⁹ Dabei stieg die Konzentration des anti-inflammatorischen Zytokins Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist deutlich an. Dies wäre eine mögliche Erklärung für den inhibitorischen Einfluss von Anti-D auf Primärimmunisierungen. Die Studie von Kaufman et al. aus dem Jahre 2013 unterstützt diese These der nicht-spezifischen Immunsuppression.¹¹⁰ Die Autoren konnten zeigen, dass sich RhD-negative Mütter, die planmäßig eine präpartale Anti-D-Prophylaxe erhalten haben, signifikant seltener gegen HLA-Merkmale immunisierten. Falls therapeutisch verabreichtes Anti-D wirklich einen Einfluss auf den Anteil von RhD-negativen Müttern mit Anti-HPA-1a-Antikörpern haben sollte, könnte durch zukünftige prospektive Studien analysiert werden, welcher Effekt (Inhibition der Primärimmunisierung oder eher Abschwächung der Thrombozytopenie) im Vordergrund steht. Hierfür bietet sich die in den Niederlanden geplante Studie mit dem Namen *HPA-screening in pregnancy* (HIP) an, die bereits von Winkelhorst et al. vorgestellt wurde.¹¹¹ Aus vor allem organisatorischen Gründen werden hierbei nur Mütter eingeschlossen, die RhD-negativ oder Rhc-negativ sind. Da in den Niederlanden aktuell zwar eine Anti-D- aber (noch)

keine Anti-c-Immunprophylaxe durchgeführt wird, wäre eine entsprechende Analyse der sich daraus ableitenden Subpopulationen, die in etwa gleichgroß sein sollten, höchst interessant.

5.7 Allgemeine Erkenntnisse der Anti-HPA-1a-Studie

Die HIP-Studie weist weitere wichtige Vorteile auf: Sie ist prospektiv, verblindet und rein beobachtend geplant, so dass eine Vielzahl an grundlegenden Daten fetomaternaler Inkompatibilitäten ohne iatrogene Beeinflussung analysiert werden kann. Die Informationen dieser Studie sollen primär dazu dienen, eine zukünftige Risikostratifikation zum Erkennen vor allem schwerwiegender NAIT-Fälle zu etablieren. Im Mittelpunkt stehen dabei solche, die durch Alloantikörper gegen HPA-1a ausgelöst werden. Die in der aktuellen Anti-HPA-1a-Studie gewonnenen Daten waren zwar rein retrospektiv, konnten aber auch zeigen, dass vor allem gesunde Kinder betroffen waren: Das Geburtsgewicht lag im Mittel bei $3.115 \text{ g} \pm 718 \text{ g}$, die Körperlänge bei $49 \text{ cm} \pm 3 \text{ cm}$. Der Median des APGAR-Wertes nach einer Minute lag bei 9 (Interquartilsabstand: 8-9), und in keinem einzigen Fall konnte eine fortgeschrittene oder gar schwere Azidose bei der Bestimmung des pH-Wertes aus der Nabelschnurarterie ermittelt werden. Somit waren es vor allem Blutungszeichen, die zur weiteren Abklärung führten: In 62,8% aller Fälle wurden Petechien beobachtet, in 28,6% traten Hämatome auf und in 5,7% sogar intrakranielle Blutungen, wobei bei zwei weiteren Neugeborenen solche nicht sicher ausgeschlossen werden konnten. In 60% der Fälle wurde mindestens ein Thrombozytenkonzentrat transfundiert. Dabei wurden stets unausgewählte Präparate appliziert. Dass darunter stabile Plättchenwerte erreicht wurden, deckt sich mit der 2006 publizierte Studie von Kiefel et al. mit einer vergleichbaren Studiengröße. Dort konnte mit diesem Vorgehen bei 24 von 27 Neugeborenen eine moderate oder sogar signifikante Anhebung des Thrombozytenwertes erzielt werden.²⁶

Es konnte zudem in der Anti-HPA-1a-Studie gezeigt werden, dass mehr als die Hälfte der Kinder Thrombozytenzahlen unter 30 Gpt/l aufwiesen, was als kritischer Wert für intrakranielle Blutungen angesehen wird.³ Bei etwa jedem neunten Kind lag der Nadir für den Plättchenwert sogar unterhalb von 10 Gpt/l, was zusätzlich dafür spricht, dass Anti-HPA-1a die Antikörperspezifität mit den schwersten Verläufen von NAIT-Fällen in Populationen europäischer Herkunft ist und somit im Fokus einer Risikostratifikation stehen sollte.

5.8 Einfluss der Antikörperkonzentration von Anti-HPA-1a

Seit Jahren wird zur Vorhersage des Schweregrades einer FNAIT ein passender Surrogatmarker gesucht. Dabei wurde auch immer wieder die Antikörperhöhe - sei es als Titer oder als Konzentration - in den Mittelpunkt gestellt, teilweise mit sehr gegensätzlichen Erkenntnissen.

Die Abbildung 10 im Kapitel 4.2.2 zeigt den in der Anti-HPA-1a-Studie vorliegenden Zusammenhang zwischen Plättchenwert und Antikörperkonzentration. Eine signifikante Korrelation konnte dabei weder für die erstgemessene noch für die minimale Thrombozytenzahl gefunden werden ($\tau=-0,081$, $p=0,495$ bzw. $\tau=-0,078$, $p=0,513$; Kendalls Tau). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen sowohl Ghevaert et al. als auch Sainio et al. in ihren jeweiligen Arbeiten, die ebenfalls 97 bzw. 72 Fälle einer durch Anti-HPA-1a-bedingten FNAIT untersuchten.^{69,112} Bei beiden Studien bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen Antikörperkonzentration und Thrombozytenzahl. Im Gegensatz dazu konnte u. a. in folgenden Arbeiten eine gewisse Korrelation zwischen beiden Größen gefunden werden: Bertrand et al. im Jahre 2006, Killie et al. im Jahre 2007, Bertrand, Petermann und Kaplan im Jahre 2014 (allesamt retrospektiv) sowie Killie et al. im Jahr 2008 und Bessos et al. im selben Jahr (beide prospektiv/unausgewählt).¹¹³⁻¹¹⁷ Dabei wurden unterschiedliche Schwellenwerte für die Antikörperkonzentration ausgegeben, die jeweiligen diagnostischen Parameter wie zum Beispiel positiver und negativer Vorhersagewert wiesen jedoch eine hohe Spannweite auf. Im Jahr 2019 wurde dieser Sachverhalt durch Kjær et al. in einem Review systematisch analysiert.¹¹⁸ Dafür schlossen die Autoren eine Vielzahl an Studien ein, unter anderem auch die oben genannten. Sie kamen dabei zu folgenden Erkenntnissen:

- Die Quantifizierung von HPA-1a-Antikörpern zur Korrelationsanalyse ist am besten durch den glykoproteinspezifischen indirekten MAIPA-Test möglich, reine ELISA-Verfahren und der PIFT eignen sich nicht dafür, da ebenfalls im Serum vorhandene HLA-Klasse-I-Antikörper das Resultat verfälschen können.
- Unter bestimmten Bedingungen kann die Höhe der Antikörperkonzentration zur Auswahl des Geburtswegs und zur Bereithaltung HPA-kompatibler Thrombozytenkonzentrate herangezogen werden.
- Bei Folgeschwangerschaften mit vorherigen Fällen einer FNAIT besteht eine signifikante Korrelation zwischen maternaler Antikörperkonzentration und fetaler Plättchenzahl ($p<0,05$). Das Ausmaß der Schwere der fetalen bzw. neonatalen Alloimmunthrombozytopenie kann aufgrund niedriger positiver und negativer Vorhersagewerte jedoch nicht sicher im Vorfeld bestimmt werden.

Die maternale Antikörperkonzentration kann zusammengefasst zwar unter bestimmten Voraussetzungen das Ausmaß der Thrombozytopenie beim Neugeborenen abschätzen, als praxistauglicher Vorhersagewert genügt sie aber nicht.

Der im Kapitel 4.2.6 beschriebene Fall ist ein gutes Beispiel dafür, dass schwere neonatale Thrombozytopenien sogar dann auftreten können, wenn keine im indirekten MAIPA-Test messbare Antikörperkonzentration vorliegt. Er zeigt ebenfalls eindrucksvoll, dass der serologische Nachweis thrombozytärer Antikörper nicht das alleinige Mittel zur Diagnose-

stellung einer NAIT sein kann. Bei entsprechenden klinischen Kriterien (gesundes Neugeborenes ohne Infektzeichen mit isolierter Thrombozytopenie) und vor allem bei nachgewiesenen HPA-1a-Inkompatibilitäten zwischen Mutter und Kind sollte stets an eine alloimmun bedingte Thrombozytopenie des Neugeborenen gedacht werden, auch wenn kein plättchenspezifischer Alloantikörper gefunden werden kann. Eine mögliche Erklärung für den initial nicht gelungenen Nachweis des Antikörpers gegen HPA-1a könnte in seiner geringen Avidität, d. h. geringen Bindungsfähigkeit gegenüber dem Alloantigen, liegen. Socher et al. haben in ihrer Arbeit über niedrig-avide HPA-1a-Alloantikörper zwei ähnliche Fälle beschrieben.¹¹⁹ Dort gelang der Nachweis nur mithilfe der Oberflächen-Plasmonenresonanz-Technologie (englisch = *surface plasmon resonance*, SPR). Die Autoren vermuteten, dass die zahlreichen Waschprozesse im MAIPA-Ansatz (siehe Kapitel 3.2.2, Abschnitt Testdurchführung) für die fehlende Detektion solch niedrig-avider Antikörper verantwortlich sein könnten. In der aktuellen FNAIT-Studie war in 135 von 252 Fällen der indirekte MAIPA-Ansatz unauffällig. Davon waren sieben Mütter (5,2%) für das HPA-1a-Antigen negativ. Das sind etwas mehr als doppelt so viele Fälle wie statistisch zu erwarten wäre (95%-Konfidenzintervall: 2,34%-10,5%, $p=0,037$ bei angenommener Auftretenswahrscheinlichkeit von 2,3%; Binomialtest). Es ist somit gut vorstellbar, dass hierbei niedrig-avide oder aus anderen Gründen nicht nachweisbare Antikörper gegen HPA-1a zum klinischen Bild der NAIT beigetragen haben, ohne dass sie im MAIPA-Ansatz detektiert wurden. In der Studie von Peterson et al. mit 61 vergleichbaren Fällen konnte in immerhin 18 „MAIPA-negativen“ maternalen Proben (29,5%) ein in der SPR-Technologie reagierender Anti-HPA-1a-Antikörper nachgewiesen werden.¹²⁰ Dass solch niedrig-avide Antikörper zur Zerstörung von Plättchen führen, wurde bereits im Mausmodell gezeigt.^{120,121} Die SPR-Technologie ist jedoch ein aufwendiges Verfahren, wofür nur die isolierte IgG-Fraktion des maternalen Serums genutzt werden kann und darüber hinaus gereinigte Glykoproteine für den Testansatz benötigt werden. Somit eignet sich diese Methode eher weniger für die Routine-Diagnostik, sondern bleibt aktuell nur Speziallaboren vorenthalten.

5.9 Zukünftige Risikobewertung

Abgesehen von der Thrombozytopenie wird das klinische Bild der FNAIT vor allem durch Blutungszeichen definiert. In der Anti-HPA-1a-Studie konnte zwar keine Korrelation zwischen Antikörperkonzentration und Thrombozytenzahl gefunden werden, dafür ergab sich aber ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe der maternalen Antikörperkonzentration und den Blutungszeichen beim Neugeborenen: In Fällen mit Petechien und Hämatomen war die Konzentration des Anti-HPA-1a-Antikörpers überzufällig höher ($p=0,031$ bzw. $p=0,012$; Wilcoxon-Rangsummentest). Einschränkend muss jedoch angemerkt werden, dass die Fallzahl relativ klein ist, für intrakranielle Blutungen konnte deswegen auch keine Aussage

getroffen werden. Dennoch stehen diese Beobachtungen im Einklang mit den Ergebnissen der Studie von Sainio et al. aus dem Jahre 2013. Die Autoren konnten sowohl für milde (v. a. Petechien) als auch für schwerwiegende Blutungen (vor allem ICH) ebenfalls eine statistisch signifikante Korrelation zur maternalen Antikörperkonzentration aufzeigen ($p=0,002$ bzw. $p=0,035$).¹¹² In seiner Übersichtsarbeit aus dem Jahre 2020 kommt Sachs ebenfalls zu der Erkenntnis, dass die im MAIPA-Test bestimmte Anti-HPA-1a-Antikörperkonzentration in Zukunft einen Anteil an der Risikostratifikation von immunisierten Müttern haben könnte.¹²² Allerdings haben seiner Meinung nach zwei weitere Faktoren ein ebenso hohes oder sogar höheres Potential für die Risikobewertung: das Glykolisierungsmuster von Anti-HPA-1a und die Funktionsfähigkeit von verschiedenen Antikörper-Subtypen. Beim letztgenannten wird es vor allem der Einfluss auf Endothelzellen sein, der seiner Meinung nach eine Abschätzung bezüglich des Risikos für intrakranielle Hämatomate ermöglichen könnte. Zum erstgenannten Faktor: Der Fc-Teil von IgG ist für die biologische Aktivität des Antikörpers verantwortlich. Dabei scheint auch die angeheftete Zuckerkette relevant zu sein.¹²³ Kapur et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass in FNAIT involvierte Anti-HPA-1a-IgG1-Antikörper wenig Fucose im Fc-Part aufweisen.¹²⁴ Darüber hinaus schien der Fucose-Anteil auch indirekt proportional mit der Schwere des klinischen Bildes und vor allem mit dem Auftreten von intrakraniellen Blutungen zu korrelieren ($p=0,02$). Dieser Zusammenhang konnte in einer Studie mit 166 Anti-HPA-1a-bedingten FNAIT-Fällen in Finnland bestätigt werden.¹²⁵ Weitere Autoren wie zum Beispiel Kjeldsen-Kragh und Bengtsson betrachten die Fc-Fukosylierung ebenso als interessanten Kandidaten für die Risikostratifizierung.⁴⁰ In der letztgenannten Arbeit wird auch der oben genannte Punkt der Antikörpersubtypen erwähnt: Anti-HPA-1a-Antikörper scheinen nicht einheitlich zu sein. Die polyklonal reagierenden Antikörper können nochmals unterteilt werden: Zum Typ 1 gehören solche, die nur mit den Aminosäuren reagieren, die mit dem HPA-1-Polymorphismus in der PSI-Domäne benachbart sind. Die Antikörper, die auch Aminosäuren aus der EGF-1-Domäne zur Bindung benötigen, werden zum Typ II gezählt.¹²⁶ Letztgenannte scheinen dabei einen inhibitorischen Einfluss auf die Liganden-Rezeptor-Funktion des GP-Komplexes IIb/IIIa auszuüben. Eine daraus resultierende abgeschwächte Fibrinogen-Bindung könnte einen Grund für eine erhöhte Blutungsneigung darstellen. Laut Sachs sind diese inhibierenden Antikörper zwar selten, sollten aber bei der Risikostratifikation berücksichtigt werden.¹²² Darüber hinaus konnten Santoso et al. in ihrer 2016 erschienenen Arbeit zeigen, dass die Bindung der HPA-1a-Antikörper teilweise auch von Aminosäuren der zugehörigen α -Kette im Sinne eines Compound-Antigens abhängig sind.¹²⁷ Dabei unterschieden die Autoren drei Untergruppen: Anti- $\beta 3$, Anti- $\alpha \nu \beta 3$ und Anti- $\alpha \text{IIb} \beta 3$. Während erstgenannte Spezifität nur eine entsprechende Peptidsequenz auf der $\beta 3$ -Kette benötigt, brauchen die beiden letztgenannten ebenso Bindungsstellen auf der $\alpha \nu$ - bzw. αIIb -Kette des GP-Komplexes IIb/IIIa. Das Integrin $\alpha \text{IIb} \beta 3$ kommt - wie in Kapitel 2.3.1 dargestellt - vor allem auf Thrombozyten vor (Fibrinogenrezeptor), $\alpha \nu \beta 3$ -Integrine werden

ebenfalls auf Thrombozyten - wenn auch in deutlich geringer Anzahl - exprimiert, werden aber vor allem auf Endothelzellen gefunden (Vitronektin-Rezeptor).⁴⁶ Damit könnte auch erklärt werden, wie Anti-HPA-1a-Antikörper in FNAIT-Fällen zur Störung der endothelialen Integrität und auch zu intrakraniellen Blutungen unabhängig vom Schweregrad der Thrombozytopenie beitragen. Vor allem der Subtyp Anti- $\alpha v\beta 3$ kam in der Studie von Santoso et al. überzufällig häufig bei Fällen mit intrakraniellen Blutungen vor.¹²⁷ Diese Erkenntnisse müssen aber noch in unabhängigen, größeren und idealerweise prospektiven Studien bestätigt werden, bevor ein routinemäßiger Einsatz in der Diagnostik erfolgen kann. Die Kombination der drei Faktoren Glykolysierungsmuster, Subtypen-Bestimmung und Antikörperkonzentration von Anti-HPA-1a könnte aus aktueller Sicht ein potentiell möglicher Ansatz für eine zukünftige Risikobewertung von fetalen und neonatalen Alloimmunthrombozytopenien sein. Sollte sich diese Annahme in zukünftigen Studien bestätigen, muss jedoch noch gezeigt werden, ob die Untersuchungen durch Standard- oder Referenzlabore umgesetzt werden können.

6 Zusammenfassung

Die fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie ist eine seltene Erkrankung, was die geringe Anzahl von 292 Verdachtsfällen innerhalb von zwölf Jahren in der hier vorliegenden FNAIT-Studie erklärt. Obwohl inzwischen grundlegende Zusammenhänge bekannt sind, gibt es immer noch viele ungeklärte Fragen bei diesem Krankheitsbild. Unumstritten erscheint, dass Anti-HPA-1a neonatale Thrombozytopenien in Populationen europäischer Herkunft am häufigsten auslöst. In der FNAIT-Studie konnte diese Spezifität in über 80% der Fälle mit plättchenspezifischen Antikörpern gefunden werden. Sie scheint auch die schwersten Verläufe einer FNAIT zu verursachen: Bei jedem neunten Kind in der Anti-HPA-1a-Studie lagen die Thrombozytenwerte zwischenzeitlich unter 10 Gpt/l. Darüber hinaus konnte bei zwei von drei NAIT-Fällen mit intrakraniellen Blutungen ein Antikörper gegen HPA-1a nachgewiesen werden. Im Vergleich zu historischen Daten konnten in der FNAIT-Studie Antikörper mit der Allo-spezifität Anti-HPA-5b insgesamt seltener gefunden werden. Diese Spezifität wurde relativ betrachtet nur etwas häufiger detektiert als solche Antikörper, die gegen die beiden HPA-15-Alloantigene gerichtet sind. Andere Antikörperspezifitäten waren darüber hinaus selten. Eine weitere Auffälligkeit der hier vorliegenden FNAIT-Studie war, dass Mütter, die in Anti-HPA-1a-induzierte neonatale Alloimmunthrombozytopenien involviert waren, seltener RhD-negativ typisiert wurden als zu erwarten wäre. Ob diese gefundene Unterrepräsentation einen Hinweis auf eine mögliche Beeinflussung von Therapie bzw. Prophylaxe geben könnte, muss in Studien mit größeren Fallzahlen (wie z. B. in der HPA-in-pregnancy-Studie von Winkelhorst et al.) und auch prospektiven Untersuchungen genauer analysiert werden.

Für durch Anti-HPA-1a verursachte FNAIT-Fälle gibt es bisher keinen guten Surrogatmarker, der die Schwere des Krankheitsbildes vorhersagen kann. Das liegt höchstwahrscheinlich daran, dass der Pathomechanismus der FNAIT deutlich komplexer zu sein scheint als zum Beispiel der von Anti-D-bedingten Fällen eines MHN. Dennoch wird es auch in Zukunft wichtig sein, das Risiko für schwerwiegende Verläufe so früh wie möglich einschätzen zu können, um eine entsprechende Prophylaxe oder Therapie durchzuführen. Es wurden bereits zahlreiche Versuche unternommen, um eine Korrelation zwischen Antikörperhöhe - sei es als Titer oder Konzentrationsangabe - und dem klinischen Bild der Alloimmunthrombozytopenie beim Kind herzustellen. Die in der hier vorliegenden Anti-HPA-1a-Studie ermittelte postpartale Antikörperkonzentration schien zwar keinen Einfluss auf den Schweregrad der neonatalen Thrombozytopenie zu haben, aber es bestand eine signifikante Korrelation zwischen Anti-HPA-1a-Konzentration und Blutungszeichen. Diese relativ einfach durchzuführende Untersuchungsmethode könnte somit zukünftig Bestandteil einer Risikostratifizierung werden. Die Ergebnisse dieser Studie konnten aber auch zeigen, dass eine alleinige Betrachtung der Anti-HPA-1a-Antikörperkonzentration nicht

ausreichend zu sein scheint, um insgesamt die Schwere des Verlaufs einer fetalen oder neonatalen Alloimmunthrombozytopenie vorherzusagen. Zusätzliche Parameter, die aktuell Thema vielversprechender Studien sind, könnten dazu beitragen: Hierzu gehören vor allem der Grad der Fucosylierung des Fc-Teils von Anti-HPA-1a-IgG, die Bestimmung von Antikörper-Subtypen und die damit einhergehende Funktionsfähigkeit von verschiedenen Anti-HPA-1a-Antikörpern.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
ABD	Untersuchung auf die Blutgruppenmerkmale A, B und RhD
AITP	Autoimmunthrombozytopenie
ASS	Acetylsalicylsäure
AVG	Assistierte vaginale Geburt
BG	Blutgruppe
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i> = „Unterscheidungsgruppe“
CMV	Cytomegalievirus
CPAP	<i>continuous positive airway pressure</i> = kontinuierlicher positiver Atemwegsdruck
DAF	<i>Decay accelerating factor</i> = Komplementzerfall-beschleunigender Faktor
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> = Desoxyribonukleinsäure
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> = Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i> = epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> = enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
EONT	<i>early-onset neonatal thrombocytopenia</i> = früh einsetzende neonatale Thrombozytopenie
Fa.	Firma
FcγR	Immunglobulin G bindender Fc-Rezeptor
FcRn	Neonataler Fc-Rezeptor
FAIT	Fetale Alloimmunthrombozytopenie
FNAIT	Fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie
GAH	<i>goat-anti-human</i> = Ziege-gegen-Mensch
GAM	<i>goat-anti-mouse</i> = Ziege-gegen-Maus
GP	Glykoprotein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
Gpt	Gigapartikel
GvHD	<i>graft versus host disease</i> = Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung
HIP	<i>HPA-screening in pregnancy</i> = HPA-Früherkennung in der Schwangerschaft (Studienname)
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HPA	Humanes Plättchen-Antigen
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> = Meerrettichperoxidase
ICH	Intrakranielle Hämorrhagie(n)
IQA	Interquartilsabstand
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M

Abkürzung	Erklärung
ISBT	<i>International Society of Blood Transfusion</i> = Internationale Gesellschaft für Bluttransfusion
IU	<i>international unit</i> = internationale Einheit
IVIG	Intravenöse Immunglobuline
LONT	<i>late-onset neonatal thrombocytopenia</i> = spät einsetzende neonatale Thrombozytopenie
MAH	<i>mouse-anti-human</i> = Maus-gegen-Mensch
MAIPA	Monoklonale antikörperspezifische Immobilisierung von Plättchen-Antigenen
MHN	Morbus haemolyticus neonatorum
moAb	<i>monoclonal antibody</i> = Monoklonaler Antikörper
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> = Boten-Ribonukleinsäure
MRT	Magnet-Resonanz-Tomografie
NAIT	Neonatale Alloimmunthrombozytopenie
NEC	Nekrotisierende Enterokolitis
NIN	Neonatale Immunneutropenie
NSA	Nabelschnurarterie
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> = Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> = Polymerase-Kettenreaktion
PIFT	Plättchen-Immunfluoreszenztest
poAb	<i>polyclonal antibody</i> = polyklonaler Antikörper
PSI	Plexin-Semaphorin-Integrin
PTP	Posttransfusionelle Purpura
REF	Referenzmaterial (bezieht sich auf Anti-HPA-1a-Standard der WHO mit Nr. 03/152)
RES	Retikuloendotheliales System
RhD	Antigen D aus dem Rh-System (ISBT-Nr.: 004.001)
SC	Sectio caesarea
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> = Einzelnukleotid-Polymorphismus
SPR	<i>surface plasmon resonance</i> = Oberflächen-Plasmonenresonanz
SSP	<i>sequence specific primer</i> = sequenzspezifischer Primer
SSW	Schwangerschaftswoche
SVG	Spontane vaginale Geburt
TAR	<i>thrombocytopenia with absent radius</i> = Thrombozytopenie-Radiusaplasie (Syndrom)
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> = Tris-gepufferte Salzlösung
TGF- β	<i>Transforming Groth Factor beta</i> = Transformierender Wachstumsfaktor beta
THK	Thrombozytenkonzentrat
Trc	Thrombozyten
vWF	von-Willebrand-Faktor
WHO	<i>World Health Organization</i> = Weltgesundheitsorganisation

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ursachen fetaler und neonataler Thrombozytopenien.....	8
Tabelle 2: Fetomaternale Inkompatibilitäten.....	11
Tabelle 3: Vermutete Pathomechanismen der FNAIT.....	13
Tabelle 4: Vor- und Nachteile verschiedener Thrombozytenquellen.....	16
Tabelle 5: Die sechs wichtigsten HPA-Systeme.....	21
Tabelle 6: Antikörperspezifitäten bei HPA-1a-negativen und HPA-1a-positiven Müttern.....	40
Tabelle 7: Plättchenspezifische Alloantikörper in vermuteten NAIT-Fällen.....	42
Tabelle 8: Maternale HPA-Merkmale bei 252 Fällen mit vermuteter NAIT.....	42
Tabelle 9: Maternale HPA-Merkmale bei 40 Fällen zur „FAIT-Abklärung“	43
Tabelle 10: Übersicht zu den 35 durch Anti-HPA-1a verursachten NAIT-Fällen.....	46
Tabelle 11: Vergleich serologischer NAIT-Befunde mit historischen Daten.....	55

9 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Algorithmus zur Abklärung neonataler Thrombozytopenien.....	9
Abbildung 2: Perinataler Transfer von IgG durch den neonatalen Fc-Rezeptor.....	12
Abbildung 3: Aufbau des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta 3$	23
Abbildung 4: Flussdiagramm zur Datenakquirierung der FNAIT-Studie.....	29
Abbildung 5: Prinzip des indirekten MAIPA-Tests.....	31
Abbildung 6: Kurvenverläufe von drei Seren im Vergleich zum Referenzmaterial.....	36
Abbildung 7: Zusammenhang zwischen RhD-Status der Mutter und Anti-HPA-1a.....	39
Abbildung 8: Zusammenhang zwischen neonataler Thrombozytenzahl und Therapie.....	48
Abbildung 9: Häufigkeitsverteilung der ermittelten Antikörperkonzentrationen.....	49
Abbildung 10: Neonatale Thrombozytenzahl und maternale Anti-HPA-1a-Konzentration.....	50
Abbildung 11: Zusammenhang zwischen Antikörperkonzentration und Blutungszeichen.....	51
Abbildung 12: Zusammenhang zwischen Antikörperkonzentration und Therapie.....	51
Abbildung 13: Verlauf der Thrombozytenzahl und Transfusionsstrategie.....	52

10 Literaturverzeichnis

1. Castle V, Andrew M, Kelton J, Giron D, Johnston M, Carter C. Frequency and mechanism of neonatal thrombocytopenia. *The Journal of Pediatrics*. 1986;108(5):749-755. doi:10.1016/S0022-3476(86)81059-9
2. Wiedmeier SE, Henry E, Sola-Visner MC, Christensen RD. Platelet reference ranges for neonates, defined using data from over 47 000 patients in a multihospital healthcare system. *Journal of Perinatology*. 2009;29(2):130-136. doi:10.1038/jp.2008.141
3. Kaplan C, Bertrand G, Ni H. 45 - Alloimmune Thrombocytopenia. In: Michelson AD, ed. *Platelets (Fourth Edition)*. Academic Press; 2019:833-848. doi:10.1016/B978-0-12-813456-6.00045-X
4. Chakravorty S, Roberts I. How I manage neonatal thrombocytopenia. *British Journal of Haematology*. 2012;156(2):155-162. doi:10.1111/j.1365-2141.2011.08892.x
5. Noris P, Pecci A. Hereditary thrombocytopenias: a growing list of disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2017;2017(1):385-399. doi:10.1182/asheducation-2017.1.385
6. Tiller H, Kamphuis MM, Flodmark O, et al. Fetal intracranial haemorrhages caused by fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: an observational cohort study of 43 cases from an international multicentre registry. *BMJ Open*. 2013;3(3):e002490. doi:10.1136/bmjopen-2012-002490
7. Winkelhorst D, Kamphuis MM, Kloet LC de, Zwaginga JJ, Oepkes D, Lopriore E. Severe bleeding complications other than intracranial hemorrhage in neonatal alloimmune thrombocytopenia: a case series and review of the literature. *Transfusion*. 2016;56(5):1230-1235. doi:10.1111/trf.13550
8. Cremer M, Sola-Visner M, Roll S, et al. Platelet transfusions in neonates: practices in the United States vary significantly from those in Austria, Germany, and Switzerland. *Transfusion*. 2011;51(12):2634-2641. doi:10.1111/j.1537-2995.2011.03208.x
9. Curley A, Stanworth SJ, Willoughby K, et al. Randomized Trial of Platelet-Transfusion Thresholds in Neonates. *New England Journal of Medicine*. 2019;380(3):242-251. doi:10.1056/NEJMoa1807320
10. Loghem JJ van, Dorfmeijer H, Hart M van der, Schreuder F. Serological and Genetical Studies on a Platelet Antigen (Zw). *Vox Sanguinis*. 1959;4(2):161-169. doi:10.1111/j.1423-0410.1959.tb04032.x
11. Juskewitch JE, Norgan AP, Goey SRD, et al. How do I ... manage the platelet transfusion-refractory patient? *Transfusion*. 2017;57(12):2828-2835. doi:10.1111/trf.14316
12. Harrington WJ, Sprague CC, Minnich V, Moore CV, Aulvin RC, Dubach R. Immunologic mechanisms in idiopathic and neonatal thrombocytopenic purpura. *Annals of Internal Medicine*. 1953;38(3):433-469. doi:10.7326/0003-4819-38-3-433
13. Kumpel BM, Sibley K, Jackson DJ, White G, Soothill PW. Ultrastructural localization of glycoprotein IIIa (GPIIIa, β 3 integrin) on placental syncytiotrophoblast microvilli: implications for platelet alloimmunization during pregnancy. *Transfusion*. 2008;48(10):2077-2086. doi:10.1111/j.1537-2995.2008.01832.x
14. Kumpel BM, Manoussaka MS. Placental immunology and maternal alloimmune responses. *Vox Sanguinis*. 2012;102(1):2-12. doi:10.1111/j.1423-0410.2011.01533.x
15. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nature Reviews Immunology*. 2007;7(9):715-725. doi:10.1038/nri2155
16. Wiener E, Abeyakoon O, Benchetrit G, Lyall M, Keler T, Rodeck CH. Anti-HPA-1a-mediated platelet phagocytosis by monocytes in vitro and its inhibition by Fc gamma receptor (Fc γ R) reactive reagents. *European Journal of Haematology*. 2003;70(2):67-74. doi:10.1034/j.1600-0609.2003.00025.x

17. Liu ZJ, Bussel JB, Lakkaraja M, et al. Suppression of in vitro megakaryopoiesis by maternal sera containing anti-HPA-1a antibodies. *Blood*. 2015;126(10):1234-1236. doi:10.1182/blood-2014-11-611020
18. Dahl J, Refsum E, Ahlen MT, et al. Unraveling the role of maternal anti-HLA class I antibodies in fetal and neonatal thrombocytopenia—Antibody specificity analysis using epitope data. *Journal of Reproductive Immunology*. 2017;122:1-9. doi:10.1016/j.jri.2017.06.003
19. Sharon R, Amar A. Maternal anti-HLA antibodies and neonatal thrombocytopenia. *Lancet*. 1981;1(8233):1313. doi:10.1016/s0140-6736(81)92481-8
20. King KE, Kao KJ, Bray PF, et al. The role of HLA antibodies in neonatal thrombocytopenia: a prospective study. *Tissue Antigens*. 1996;47(3):206-211. doi:10.1111/j.1399-0039.1996.tb02542.x
21. Cooling LLW, Kelly K, Barton J, Hwang D, Koerner TAW, Olson JD. Determinants of ABH expression on human blood platelets. *Blood*. 2005;105(8):3356-3364. doi:10.1182/blood-2004-08-3080
22. Petermann R, Bakchoul T, Curtis BR, Mullier F, Miyata S, Arnold DM. Investigations for fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: communication from the SSC of the ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2018;16(12):2526-2529. doi:10.1111/jth.14294
23. Santoso S, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. Blood Group A and B Determinants Are Expressed on Platelet Glycoproteins IIa, IIIa, and Ib. *Thrombosis and Haemostasis*. 1991;65(2):196-201. doi:10.1055/s-0038-1647483
24. Kjeldsen-Kragh J, Killie MK, Tomter G, et al. A screening and intervention program aimed to reduce mortality and serious morbidity associated with severe neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood*. 2007;110(3):833-839. doi:10.1182/blood-2006-08-040121
25. Lee K, Beaujean F, Bierling P. Treatment of Severe Fetomaternal Alloimmune Thrombocytopenia with Compatible Frozen-Thawed Platelet Concentrates. *British Journal of Haematology*. 2002;117(2):482-483. doi:10.1046/j.0007-1048.2002.03433.x
26. Kiefel V, Bassler D, Kroll H, et al. Antigen-positive platelet transfusion in neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT). *Blood*. 2006;107(9):3761-3763. doi:10.1182/blood-2005-06-2235
27. Massey GV, McWilliams NB, Mueller DG, Napolitano A, Maurer. Intravenous immunoglobulin in treatment of neonatal isoimmune thrombocytopenia. *The Journal of Pediatrics*. 1987;111(1):133-135. doi:10.1016/S0022-3476(87)80360-8
28. Kroll H, Maier RF. Perinatale und pädiatrische Transfusionsmedizin. In: Kiefel V, Mueller-Eckhardt C, eds. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie: Grundlagen – Therapie – Methodik*. 4th ed. Springer; 2011:419-448. doi:10.1007/978-3-642-12765-6_31
29. Crow AR, Lazarus AH. The Mechanisms of Action of Intravenous Immunoglobulin and Polyclonal Anti-D Immunoglobulin in the Amelioration of Immune Thrombocytopenic Purpura: What Do We Really Know? *Transfusion Medicine Reviews*. 2008;22(2):103-116. doi:10.1016/j.tmr.2007.12.001
30. Yougbaré I, Tai WS, Zdravic D, et al. Activated NK cells cause placental dysfunction and miscarriages in fetal alloimmune thrombocytopenia. *Nature Communications*. 2017;8. doi:10.1038/s41467-017-00269-1
31. Winkelhorst D, Murphy MF, Greinacher A, et al. Antenatal management in fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: a systematic review. *Blood*. 2017;129(11):1538-1547. doi:10.1182/blood-2016-10-739656
32. Tiller H, Ahlen MT, Akkøk ÇA, Husebekk A. Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia – The Norwegian management model. *Transfusion and Apheresis Science*. 2020;59(1):102711. doi:10.1016/j.transci.2019.102711
33. Wyckoff SL, Hudson KE. Targeting the neonatal Fc receptor (FcRn) to treat autoimmune diseases and maternal-fetal immune cytopenias. *Transfusion*. 2021;61(5):1350-1354. doi:10.1111/trf.16341

34. Devanaboyina SC, Khare P, Challa DK, Ober RJ, Ward ES. Engineered clearing agents for the selective depletion of antigen-specific antibodies. *Nature Communications*. 2017;8(1):15314. doi:10.1038/ncomms15314
35. Mutterschafts-Richtlinien - Gemeinsamer Bundesausschuss. Aufgerufen am 31. Oktober 2020. <https://www.g-ba.de/richtlinien/19/>
36. Kjær M, Geisen C, Akkøk ÇA, et al. Strategies to develop a prophylaxis for the prevention of HPA-1a immunization and fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion and Apheresis Science*. 2020;59(1). doi:10.1016/j.transci.2019.102712
37. Tiller H, Killie MK, Chen P, et al. Toward a prophylaxis against fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: induction of antibody-mediated immune suppression and prevention of severe clinical complications in a murine model. *Transfusion*. 2012;52(7):1446-1457. doi:10.1111/j.1537-2995.2011.03480.x
38. Development of a prophylactic treatment for the prevention of fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia (FNAIT) | PROFNAIT Project | FP7 | CORDIS | European Commission. Aufgerufen am 8. November 2020. <https://cordis.europa.eu/project/id/305986>
39. Prophylix AS Rare disease programs acquired by Rallybio. Aufgerufen am 31. Oktober 2020. http://www.prophylix.com/Prophylix_Press_Release_English_2019.pdf
40. Kjeldsen-Kragh J, Bengtsson J. Fetal and Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia—New Prospects for Fetal Risk Assessment of HPA-1a-Negative Pregnant Women. *Transfusion Medicine Reviews*. 2020;34(4):270-276. doi:10.1016/j.tmr.2020.09.004
41. von dem Borne AEGK, Décary F. ICSH/ISBT Working Party on Platelet Serology. *Vox Sanguinis*. 1990;58(2):176-176. doi:10.1111/j.1423-0410.1990.tb02085.x
42. Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, et al. Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sanguinis*. 2003;85(3):240-245. doi:10.1046/j.1423-0410.2003.00331.x
43. Platelet Antigen Database | HPA | Versiti. Aufgerufen am 3. November 2020. <https://www.versiti.org/medical-professionals/precision-medicine-expertise/platelet-antigen-database#hpa-database>
44. Bledzka K, Qin J, Plow EF. 12 - Integrin α IIb β 3. In: Michelson AD, ed. *Platelets (Fourth Edition)*. Academic Press; 2019:227-241. doi:10.1016/B978-0-12-813456-6.00012-6
45. Li R. 10 - The Glycoprotein Ib-IX-V Complex. In: Michelson AD, ed. *Platelets (Fourth Edition)*. Academic Press; 2019:193-211. doi:10.1016/B978-0-12-813456-6.00010-2
46. Clemetson KJ, Clemetson JM. 9 - Platelet Receptors. In: Michelson AD, ed. *Platelets (Fourth Edition)*. Academic Press; 2019:169-192. doi:10.1016/B978-0-12-813456-6.00009-6
47. Kiefel V, Santoso S. Alloantigene von Thrombozyten. In: Kiefel V, Mueller-Eckhardt C, eds. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie: Grundlagen – Therapie – Methodik*. Springer; 2011:177-187. doi:10.1007/978-3-642-12765-6_13
48. Schuh AC, Watkins NA, Nguyen Q, et al. A tyrosine703serine polymorphism of CD109 defines the Gov platelet alloantigens. *Blood*. 2002;99(5):1692-1698. doi:10.1182/blood.V99.5.1692
49. Mii S, Enomoto A, Shiraki Y, Taki T, Murakumo Y, Takahashi M. CD109: a multifunctional GPI-anchored protein with key roles in tumor progression and physiological homeostasis. *Pathology International*. 2019;69(5):249-259. doi:10.1111/pin.12798
50. Sutherland DR, Yeo E, Ryan A, Mills GB, Bailey D, Baker MA. Identification of a Cell-Surface Antigen Associated With Activated T Lymphoblasts and Activated Platelets. *Blood*. 1991;77(1):84-93. doi:10.1182/blood.V77.1.84.84

51. Freson K. 8 - The Platelet Proteome. In: Michelson AD, ed. *Platelets (Fourth Edition)*. Academic Press; 2019:155-167. doi:10.1016/B978-0-12-813456-6.00008-4
52. Cattaneo M. 48 - Inherited Disorders of Platelet Function. In: Michelson AD, ed. *Platelets (Fourth Edition)*. Academic Press; 2019:877-904. doi:10.1016/B978-0-12-813456-6.00048-5
53. Dunois-Lardé C, Capron C, Fichelson S, Bauer T, Cramer-Bordé E, Baruch D. Exposure of human megakaryocytes to high shear rates accelerates platelet production. *Blood*. 2009;114(9):1875-1883. doi:10.1182/blood-2009-03-209205
54. Vollenberg R, Jouni R, Norris PAA, et al. Glycoprotein V is a relevant immune target in patients with immune thrombocytopenia. *Haematologica*. 2019;104(6):1237-1243. doi:10.3324/haematol.2018.211086
55. Jung SM, Moroi M. Signal-transducing Mechanisms Involved in Activation of the Platelet Collagen Receptor Integrin $\alpha 2\beta 1$. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(11):8016-8026. doi:10.1074/jbc.275.11.8016
56. Rahman M, Ortega-Lopez A, Powers A. Sudden Development of Thrombocytopenia After Reversal of Anticoagulation for Surgery. *Laboratory Medicine*. 2016;47(1):48-51. doi:10.1093/labmed/lmv005
57. Ertel K, Al-Tawil M, Santoso S, Kroll H. Relevance of the HPA-15 (Gv) polymorphism on CD109 in alloimmune thrombocytopenic syndromes. *Transfusion*. 2005;45(3):366-373. doi:10.1111/j.1537-2995.2005.04281.x
58. Lee K, Godeau B, Fromont P, et al. CD36 deficiency is frequent and can cause platelet immunization in Africans. *Transfusion*. 1999;39(8):873-879. doi:10.1046/j.1537-2995.1999.39080873.x
59. Bierling P, Godeau B, Fromont P, et al. Posttransfusion purpura-like syndrome associated with CD36 (Naka) isoimmunization. *Transfusion*. 1995;35(9):777-782. doi:10.1046/j.1537-2995.1995.35996029165.x
60. Curtis BR, Ali S, Glazier AM, Ebert DD, Aitman TJ, Aster RH. Isoimmunization against CD36 (glycoprotein IV): description of four cases of neonatal isoimmune thrombocytopenia and brief review of the literature. *Transfusion*. 2002;42(9):1173-1179. doi:10.1046/j.1537-2995.2002.00176.x
61. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Published 2021. Aufgerufen am 2. April 2021. <https://www.R-project.org>
62. Hedderich J, Sachs L. *Angewandte Statistik*. 16th ed. Springer Spektrum; 2018. Aufgerufen am 13. Mai 2021. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-662-56657-2>
63. McDonald JH. *Handbook of Biological Statistics*. 3rd ed. Sparky House Publishing; 2014. <http://biostathandbook.com/>
64. Agresti A, Coull BA. Approximate is Better than "Exact" for Interval Estimation of Binomial Proportions. *The American Statistician*. Published online March 22, 2012. doi:10.1080/00031305.1998.10480550
65. Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Mueller-Eckhardt C. Monoclonal antibody--specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood*. 1987;70(6):1722-1726. doi:10.1182/blood.V70.6.1722.1722
66. Kiefel V. The MAIPA assay and its applications in immunohaematology. *Transfusion Medicine*. 1992;2(3):181-188. doi:10.1111/j.1365-3148.1992.tb00153.x
67. Anti-HPA-1a (International Standard). Aufgerufen am 19. Oktober 2020. https://www.nibsc.org/products/brm_product_catalogue/detail_page.aspx?catid=03/152
68. Bertrand G, Jallu V, Gouet M, et al. Quantification of human platelet antigen-1a antibodies with the monoclonal antibody immobilization of platelet antigens procedure. *Transfusion*. 2005;45(8):1319-1323. doi:10.1111/j.1537-2995.2005.00195.x

69. Ghevaert C, Campbell K, Stafford P, et al. HPA-1a antibody potency and bioactivity do not predict severity of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*. 2007;47(7):1296-1305. doi:10.1111/j.1537-2995.2007.01273.x
70. Wilcoxon F. Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bulletin*. 1945;1(6):80-83. doi:10.2307/3001968
71. Kruskal WH, Wallis WA. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association*. 1952;47(260):583-621. doi:10.1080/01621459.1952.10483441
72. Conover W, ed. *Practical Nonparametric Statistics*. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc.; 1999. <https://3lib.net/book/3373663/ecd922>
73. Kendall MG. A New Measure of Rank Correlation. *Biometrika*. 1938;30(1/2):81-93. doi:10.2307/2332226
74. Wagner FF, Kasulke D, Kerowgan M, Flegel WA. Frequencies of the Blood Groups ABO, Rhesus, D Category VI, Kell, and of Clinically Relevant High-Frequency Antigens in South-Western Germany. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 1995;22(5):285-290. doi:10.1159/000223144
75. Kiefel V, Kroll H, Bonnert J, et al. Platelet alloantigen frequencies in Caucasians: a serological study. *Transfusion Medicine*. 1993;3(3):237-242. doi:10.1111/j.1365-3148.1993.tb00121.x
76. von dem Borne AEGK, Verheugt FWA, Oosterhof F, Riesz E von, Rivière AB de la, Engelfriet CP. A Simple Immunofluorescence Test for the Detection of Platelet Antibodies. *British Journal of Haematology*. 1978;39(2):195-207. doi:10.1111/j.1365-2141.1978.tb01089.x
77. Davoren A, McParland P, Barnes CA, Murphy WG. Neonatal alloimmune thrombocytopenia in the Irish population: a discrepancy between observed and expected cases. *Journal of Clinical Pathology*. 2002;55(4):289-292.
78. Mueller-Eckhardt C, Kiefel V, Grubert A, et al. 348 cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Lancet*. 1989;1(8634):363-366. doi:10.1016/s0140-6736(89)91733-9
79. Sachs UJ, Wienzek-Lischka S, Duong Y, et al. Maternal antibodies against paternal class I human leukocyte antigens are not associated with foetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *British Journal of Haematology*. 2020;189(4):751-759. doi:10.1111/bjh.16419
80. Kroll H, Kiefel V, Santoso S. Clinical Aspects and Typing of Platelet Alloantigens. *Vox Sanguinis*. 1998;74(S2):345-354. doi:10.1111/j.1423-0410.1998.tb05441.x
81. Davoren A, Curtis BR, Aster RH, McFarland JG. Human platelet antigen-specific alloantibodies implicated in 1162 cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*. 2004;44(8):1220-1225. doi:10.1111/j.1537-2995.2004.04026.x
82. Ghevaert C, Campbell K, Walton J, et al. Management and outcome of 200 cases of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*. 2007;47(5):901-910. doi:10.1111/j.1537-2995.2007.01208.x
83. Ohto H, Miura S, Ariga H, Ishii T, Fujimori K, Morita S. The natural history of maternal immunization against foetal platelet alloantigens. *Transfusion Medicine*. 2004;14(6):399-408. doi:10.1111/j.1365-3148.2004.00535.x
84. Kiefel V, König C, Kroll H, Santoso S. Platelet alloantibodies in transfused patients. *Transfusion*. 2001;41(6):766-770. doi:10.1046/j.1537-2995.2001.41060766.x
85. Wu S, Maslanka K, Gorski J. An integrin polymorphism that defines reactivity with alloantibodies generates an anchor for MHC class II peptide binding: a model for unidirectional alloimmune responses. *The Journal of Immunology*. 1997;158(7):3221-3226.

86. Ahlen MT, Husebekk A, Killie MK, Skogen B, Stuge TB. T-cell responses associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia: isolation of HPA-1a-specific, HLA-DRB3*0101-restricted CD4+ T cells. *Blood*. 2009;113(16):3838-3844. doi:10.1182/blood-2008-09-178475
87. Wienzek-Lischka S, König IR, Papenkort EM, et al. HLA-DRB3*01:01 is a predictor of immunization against human platelet antigen-1a but not of the severity of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*. 2017;57(3):533-540. doi:10.1111/trf.13950
88. Kjeldsen-Kragh J, Fergusson DA, Kjaer M, et al. Fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia: a systematic review of impact of HLA-DRB3*01:01 on fetal/neonatal outcome. *Blood Advances*. 2020;4(14):3368-3377. doi:10.1182/bloodadvances.2020002137
89. Berry JE, Murphy CM, Smith GA, et al. Detection of Gov system antibodies by MAIPA reveals an immunogenicity similar to the HPA-5 alloantigens. *British Journal of Haematology*. 2000;110(3):735-742. doi:10.1046/j.1365-2141.2000.02170.x
90. Li R, Emsley J. The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2013;11(4):605-614. doi:10.1111/jth.12144
91. Xu X, Fu Y, Kiefel V, Santoso S. Fetal and neonatal immune thrombocytopenia caused by maternal alloantibodies and isoantibodies in Caucasian and Asian populations: a narrative review. *Annals of Blood*. 2021;6(0). doi:10.21037/aob-21-47
92. Flesch BK, Scherer V, Opitz A, et al. Platelet CD36 deficiency is present in 2.6% of Arabian individuals and can cause NAIT and platelet refractoriness. *Transfusion*. 2021;61(6):1932-1942. doi:10.1111/trf.16398
93. Phuangtham R, Santoso S, Leelayuwat C, Komvilaisak P, Ding H, Romphruk AV. Frequency of CD36 deficiency in Thais analyzed by quantification of CD36 on cell surfaces and in plasma. *Transfusion*. 2020;60(4):847-854. doi:10.1111/trf.15737
94. Hopkins M, Brookes J, Watson D, et al. The first reported case of neonatal alloimmune thrombocytopenia due to low-frequency human platelet antigen-6b antibodies in the United Kingdom. *Transfusion*. 2021;61(9):2788-2794. doi:10.1111/trf.16563
95. Refsum E, Håkansson S, Mörtberg A, Wikman A, Westgren M. Intracranial hemorrhages in neonates born from 32 weeks of gestation—low frequency of associated fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: a register-based study. *Transfusion*. 2018;58(1):223-231. doi:10.1111/trf.14394
96. Kaplan C, Morel-Kopp MC, Kroll H, et al. HPA-5b (Bra) neonatal alloimmune thrombocytopenia: clinical and immunological analysis of 39 cases. *British Journal of Haematology*. 1991;78(3):425-429. doi:10.1111/j.1365-2141.1991.tb04459.x
97. Rousseau J, Goldman M, David M. HPA-5b (Bra) neonatal alloimmune thrombocytopenia in Quebec: incidence and clinical outcome in 31 cases. *Transfusion*. 2004;44(6):844-848. doi:10.1111/j.1537-2995.2004.03304.x
98. Alm J, Duong Y, Wienzek-Lischka S, et al. Anti-human platelet antigen-5b antibodies and fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia; incidental association or cause and effect? *British Journal of Haematology*. (online ahead of print). doi:10.1111/bjh.18173
99. Middelburg R a., Porcelijn L, Lardy N, Briët E, Vrielink H. Prevalence of leucocyte antibodies in the Dutch donor population. *Vox Sanguinis*. 2011;100(3):327-335. doi:10.1111/j.1423-0410.2010.01420.x
100. Jackman RP, Deng X, Bolgiano D, et al. Low-level HLA antibodies do not predict platelet transfusion failure in TRAP study participants. *Blood*. 2013;121(16):3261-3266. doi:10.1182/blood-2012-12-472779
101. Marsh WL, Chaganti RSK, Gardner FH, Mayer K, Nowell PC, German J. Mapping Human Autosomes: Evidence Supporting Assignment of Rhesus to the Short Arm of Chromosome No. 1. *Science*. 1974;183(4128):966-968. doi:10.1126/science.183.4128.966

102. Sosnoski DM, Emanuel BS, Hawkins AL, et al. Chromosomal localization of the genes for the vitronectin and fibronectin receptors alpha subunits and for platelet glycoproteins IIb and IIIa. *The Journal of Clinical Investigation*. 1988;81(6):1993-1998. doi:10.1172/JCI113548
103. Satchwell TJ, Bell AJ, Pellegrin S, et al. Critical band 3 multiprotein complex interactions establish early during human erythropoiesis. *Blood*. 2011;118(1):182-191. doi:10.1182/blood-2010-10-314187
104. Chilcott J, Lloyd Jones M, Wight J, et al. A review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of routine anti-D prophylaxis for pregnant women who are rhesus-negative. *Health Technology Assessment*. 2003;7(4). doi:10.3310/hta7040
105. Klüter H, Germer U, Gortner L, Kirchner H, Gembruch U. Coincidence of Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia and Maternal Anti-D Immunization: Case Report. *British Journal of Haematology*. 1998;102(5):1387-1387. doi:10.1046/j.1365-2141.1998.00986.x
106. Husebekk A, Jægtvik S, Aune B, Øian P, Dahl LB, Skogen B. Does anti-D protect platelets from anti-HPA 1a mediated destruction? *British Journal of Haematology*. 1999;106(3):835-835. doi:10.1046/j.1365-2141.1999.01654.x
107. Salama A, Mueller-Eckhardt C, Kiefel V. Effect of intravenous immunoglobulin in immune thrombocytopenia: Competitive inhibition of reticuloendothelial system function by sequestration of autologous red blood cells? *The Lancet*. 1983;322(8343):193-195. doi:10.1016/S0140-6736(83)90175-7
108. Meyer O, Kiesewetter H, Hermesen M, et al. Replacement of intravenous administration of anti-D by subcutaneous administration in patients with autoimmune thrombocytopenia. *Pediatric Blood & Cancer*. 2006;47(S5):721-722. doi:10.1002/pbc.21006
109. Coopamah MD, Freedman J, Semple JW. Anti-D initially stimulates an Fc-dependent leukocyte oxidative burst and subsequently suppresses erythrophagocytosis via interleukin-1 receptor antagonist. *Blood*. 2003;102(8):2862-2867. doi:10.1182/blood-2003-04-1029
110. Kaufman RM, Schlumpf KS, Wright DJ, Triulzi DJ. Does Rh immune globulin suppress HLA sensitization in pregnancy? *Transfusion*. 2013;53(9):2069-2077. doi:10.1111/trf.12049
111. Winkelhorst D, Vos TW de, Kamphuis MM, et al. HIP (HPA-screening in pregnancy) study: protocol of a nationwide, prospective and observational study to assess incidence and natural history of fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia and identifying pregnancies at risk. *BMJ Open*. 2020;10(7):e034071. doi:10.1136/bmjopen-2019-034071
112. Sainio S, Javela K, Tuimala J, Koskinen S. Usefulness of maternal anti-HPA-1a antibody quantitation in predicting severity of foetomaternal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion Medicine*. 2013;23(2):114-120. doi:10.1111/tme.12018
113. Bertrand G, Martageix C, Jallu V, Vitry F, Kaplan C. Predictive value of sequential maternal anti-HPA-1a antibody concentrations for the severity of fetal alloimmune thrombocytopenia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2006;4(3):628-637. doi:https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01809.x
114. Killie MK, Husebekk A, Kaplan C, Taaning E, Skogen B. Maternal human platelet antigen-1a antibody level correlates with the platelet count in the newborns: a retrospective study. *Transfusion*. 2007;47(1):55-58. doi:10.1111/j.1537-2995.2007.01063.x
115. Bertrand G, Petermann R, Kaplan C. Prediction of IVIG treatment efficiency in fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood*. 2014;124(4):654-655. doi:10.1182/blood-2014-04-569541
116. Killie MK, Husebekk A, Kjeldsen-Kragh J, Skogen B. A prospective study of maternal anti-HPA 1a antibody level as a potential predictor of alloimmune thrombocytopenia in the newborn. *Haematologica*. 2008;93(6):870-877. doi:10.3324/haematol.12515

117. Bessos H, Killie MK, Matviyenko M, Husebekk A, Urbaniak SJ. Direct comparison between two quantitative assays in the measurement of maternal anti-HPA-1a antibody in neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT). *Transfusion and Apheresis Science*. 2008;39(3):221-227. doi:10.1016/j.transci.2008.09.006
118. Kjær M, Bertrand G, Bakchoul T, et al. Maternal HPA-1a antibody level and its role in predicting the severity of Fetal/Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia: a systematic review. *Vox Sanguinis*. 2019;114(1):79-94. doi:10.1111/vox.12725
119. Socher I, Andrei-Selmer C, Bein G, Kroll H, Santoso S. Low-avidity HPA-1a alloantibodies in severe neonatal alloimmune thrombocytopenia are detectable with surface plasmon resonance technology. *Transfusion*. 2009;49(5):943-952. doi:10.1111/j.1537-2995.2008.02065.x
120. Peterson JA, Kanack A, Nayak D, et al. Prevalence and clinical significance of low-avidity HPA-1a antibodies in women exposed to HPA-1a during pregnancy. *Transfusion*. 2013;53(6):1309-1318. doi:10.1111/j.1537-2995.2012.03903.x
121. Bakchoul T, Kubiak S, Krautwurst A, et al. Low-avidity anti-HPA-1a alloantibodies are capable of antigen-positive platelet destruction in the NOD/SCID mouse model of alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*. 2011;51(11):2455-2461. doi:10.1111/j.1537-2995.2011.03171.x
122. Sachs UJ. Prospects for risk stratification of anti-HPA-1a alloimmunized pregnant women. *Transfusion and Apheresis Science*. 2020;59(1). doi:10.1016/j.transci.2019.102709
123. Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, et al. The Absence of Fucose but Not the Presence of Galactose or Bisecting N-Acetylglucosamine of Human IgG1 Complex-type Oligosaccharides Shows the Critical Role of Enhancing Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(5):3466-3473. doi:10.1074/jbc.M210665200
124. Kapur R, Kustiawan I, Vestrheim A, et al. A prominent lack of IgG1-Fc fucosylation of platelet alloantibodies in pregnancy. *Blood*. 2014;123(4):471-480. doi:10.1182/blood-2013-09-527978
125. Sonneveld ME, Natunen S, Sainio S, et al. Glycosylation pattern of anti-platelet IgG is stable during pregnancy and predicts clinical outcome in alloimmune thrombocytopenia. *British Journal of Haematology*. 2016;174(2):310-320. doi:10.1111/bjh.14053
126. Zhi H, Ahlen MT, Thinn AMM, et al. High-resolution mapping of the polyclonal immune response to the human platelet alloantigen HPA-1a (PLA1). *Blood Advances*. 2018;2(21):3001-3011. doi:10.1182/bloodadvances.2018023341
127. Santoso S, Wihadmadayati H, Bakchoul T, et al. Antiendothelial $\alpha\beta 3$ Antibodies Are a Major Cause of Intracranial Bleeding in Fetal/Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2016;36(8):1517-1524. doi:10.1161/ATVBAHA.116.307281

11 Thesen

1. Die im Rahmen der Dissertation vorgestellte Methode der Konzentrationsbestimmung im indirektem MAIPA-Test ist eine für die Quantifizierung von Anti-HPA-1a-Antikörpern der Immunglobulinklasse IgG gut geeignete ELISA-Technik.
2. Die fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie ist eine seltene Erkrankung, die in den meisten Fällen mild verläuft. Schwere Verläufe mit intrakraniellen Veränderungen und neurologischen Spätfolgen werden bei Europäern hauptsächlich durch Anti-HPA-1a verursacht.
3. Die relativen Häufigkeiten der Antikörperspezifitäten, die eine FNAIT verursachen können, haben sich im Vergleich zu historischen Daten kaum verändert. Der Antikörper Anti-HPA-5b wurde jedoch in der aktuellen Studie seltener nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass seit einigen Jahren auch Antikörper gegen Alloantigene aus dem HPA-15-System berücksichtigt werden.
4. Zur Beurteilung einer möglichen Alloimmunthrombozytopenie sollte stets die molekulargenetische Bestimmung der wichtigsten plättchenspezifischen Alloantigene erfolgen, um Inkompatibilitäten, vor allem im HPA-1-System frühzeitig zu erkennen. Bei niedrig-aviden Alloantikörpern kann es vorkommen, dass sie erst nach mehreren Wochen oder gar erst Jahren detektiert werden können. Eine zukünftige Alternative könnte die Oberflächen-Plasmonenresonanz-Technologie darstellen, die jedoch sehr aufwendig ist.
5. Bei der Testung von Anti-HLA-Klasse-I-Antikörpern im indirekten MAIPA-Ansatz scheint ein Poolansatz mit acht bekannten Spendern eher nicht ausreichend zu sein. Es sollte betrachtet werden, inwiefern entsprechende Modifikationen eine Steigerung der diagnostischen Effizienz erbringen könnten.
6. Mütter, die in einer durch Anti-HPA-1a verursachten NAIT involviert waren, sind seltener RhD-negativ als solche, bei denen kein Anti-HPA-1a nachgewiesen werden konnte.

7. Das Crossmatch aus paternalen Thrombozyten und maternalen Serum ist ein geeignetes Mittel zur Detektion von Antikörpern gegen niederfrequente Antigene, welche bei Routineuntersuchungen oftmals nicht nachgewiesen werden. Dieses Verfahren eignet sich auch zur Detektion neuer Antigene.
8. Es besteht kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der postpartal gemessenen Konzentration des maternalen Anti-HPA-1a-Antikörpers und der neonatalen Thrombozytenzahl.
9. Zwischen dem Vorhandensein von sowohl Petechien als auch Hämatomen beim Neugeborenen und der maternalen Anti-HPA-1a-Antikörperkonzentration konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang gezeigt werden.

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nico Greger
Geburtsdatum: 23.12.1980 in Rostock, Deutschland
Nationalität: Deutsch

Schulbildung

Sep 1987 – Aug 1991 Grundschule Evershagen
Sep 1991 – Jun 1999 Ostseegymnasium Rostock
Abschluss: Abitur mit der Note 1,2

Grundwehrdienst/Zivildienst

Sep 1999 – Jul 2000 Zivildienst an der „Schule zur Individuellen Lebensbewältigung“

Studium

Okt 2000 – Nov 2008 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
Aufnahme in die Studienstiftung des Deutschen Volkes
Abschluss: Staatsexamen mit der Note „gut“

Auslandsaufenthalt

Okt 2004 – Jul 2005 Studium an der Université Henri Poincaré in Nancy im
Rahmen des Erasmusprogramms

Beruflicher Werdegang

2009 – 2012 Arzt in den Blutspendezentren Schwerin und Rostock der Haema AG
2012 – 2014 Assistenzarzt an der Klinik für Innere Medizin III,
Hämatologie/Onkologie/Palliativmedizin, Universitätsmedizin Rostock
2014 – 2017 Assistenzarzt am Institut für Transfusionsmedizin,
Universitätsmedizin Rostock
01.03.2017 Erfolgreiche Prüfung für den Facharzt Transfusionsmedizin
2017 – 2019 Facharzt für Transfusionsmedizin am Institut für Transfusionsmedizin,
Universitätsmedizin Rostock
19.07.2019 Ernennung zum Oberarzt und stellvertretenden Institutsleiter
am Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsmedizin Rostock
2019 – 2020 Oberarzt und stellv. Institutsleiter am Institut für Transfusionsmedizin,
Universitätsmedizin Rostock
2020 – 2023 Abteilungsleiter Patientendiagnostik am Zentralinstitut Springe,
DRK-Blutspendedienst NSTOB
2023 – Oberarzt am Institut für Transfusionsmedizin,
Universitätsmedizin Rostock

Wissenschaftliche Beiträge

DGTI 2016	Erstautor des Posters „Autoanti-Jk(a) induces autoimmune hemolytic anemia in a patient with multiple myeloma“
DGTI 2017	Erstautor des Posters „NAIT due to HPA-1a-incompatibility with initially undetectable alloantibody“
DGTI 2019	Erstautor des Posters „Frequency of RHCE-Variants in 14,284 patients and donors by serological testing“
DGTI 2020	Erstautor des Posters „Post-transfusion purpura due to anti-HPA-1b“
DGTI 2021	Erstautor des Posters „A serological update of neonatal alloimmune thrombocytopenia“ Erstautor des Posters „Impact of anti-HPA-1a concentration on severity of NAIT“ Erstautor des Posters „Anti-Co(a) in a patient with a predicted CO*01.-04 allele“
DGTI 2022	Erstautor des Posters „NAIT due to a presumably new alloantibody directed against Gp Ia/IIa“ Erstautor des Posters „Case report of a patient with a newly detected Bombay phenotype“
2017	Erstautor des Beitrags „Autoanti-Jk ^a als Auslöser einer Autoimmunhämolyse bei Multiplem Myelom“ in Transfusionsmedizin; DOI: doi.org/10.1055/s-0043-104616
2017	Co-Autor „A population-based longitudinal study on the implication of demographic changes on blood donation and transfusion demand“ in Blood Advances; DOI: doi.org/10.1182/bloodadvances.2017005876
2018	Studien-Prüfer bei „O- product transfusion, inventory management, and utilization during shortage: the OPTIMUS study“ in Transfusion; DOI: doi.org/10.1111/trf.14547
2022	Erstautor des Beitrags „Immunhämatologische Diagnostik bei einer Patientin mit bekannten multiplen Alloantikörpern“ in hämotherapie - Beiträge zur Transfusionsmedizin; Ausgabe 39/2022

13 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Nico Greger, geb. 23.12.1980, die hier vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt zu haben. Hilfe, die über die meines Promotionsbetreuers hinaus ging, habe ich stets an den entsprechenden Stellen offen gelegt. Ich habe nur Quellen und Literatur verwendet, die ich auch angegeben habe.

Nico Greger
Springe, 03.06.2022

14 Danksagung

Mein allergrößter Dank gilt meinem Doktorvater und ehemaligem Leiter des Instituts für Transfusionsmedizin an der Universitätsmedizin Rostock Herrn Prof. Dr. med. Volker Kiefel. Dieses betrifft nicht nur die Betreuung beim Anfertigen dieser Dissertationsschrift, sondern auch die Zeit meiner Weiterbildung zum Facharzt für Transfusionsmedizin. Durch seine Unterstützung und Erfahrung habe ich einen fundamentalen Einblick in das Fachgebiet und vor allem in die thrombozytenimmunologische Diagnostik gewinnen können und somit auch meine Leidenschaft für die Immunhämatologie entdeckt. Auch möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Transfusionsmedizin bedanken, die mich während meiner Zeit dort begleitet und unterstützt haben. Ein besonderer Dank geht dabei an Frau Bianca Lange und Frau Inga Schönberner-Richter aus dem thrombozytenserologischen Labor, die während meiner experimentellen Arbeit stets ein offenes Ohr für mich hatten.

Ferner möchte ich mich bei meinem damaligen Kommilitonen Christian Dahlke bedanken, der mir auch weit nach dem Studium ein guter Freund geblieben ist. Ebenso gilt ein großer Dank Steffen Kuhl. Bereits seit der Schulzeit verbindet mich mit ihm eine außergewöhnliche Freundschaft. Ein ganz besonderer Dank gilt darüber hinaus natürlich meiner Partnerin Anja Sandmann und ihrer Familie, die mich bereits vor Jahren in ihr Leben eingeschlossen und mich seitdem bei allen Projekten unterstützt haben. Und als letztes möchte ich mich bei meinen Großeltern bedanken, die immer für mich da gewesen waren.